

Université Pierre et Marie Curie
Ecole doctorale Cerveau, Cognition, Comportement
Neuroscience Paris Seine

**Mécanismes du maintien de l'hyper-réactivité
noradrénergique et sérotoninergique induite par
l'exposition répétée à l'amphétamine**

Par **Ana Clara Bobadilla Asensio**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le **Dr. Jean-Pol Tassin**

Présentée et soutenue publiquement le 28 mai 2014 devant le jury composé de :

Dr. Denis HERVÉ	Président du jury
Dr. Serge AHMED	Rapporteur
Prof. Umberto SPAMPINATO	Rapporteur
Dr. Jean-Christophe CORVOL	Examineur
Dr. Susan S. SARA	Examineur
Dr. Jean-Pol TASSIN	Directeur de thèse

A Lina et Agustín

Le thérapeute : Ce serait quoi, pour vous, le contraire de la drogue?

Le patient : ... Ce serait de penser...

Extrait de Soigner les toxicomanes, Morel, Hervé et Fontaine, 1997

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Docteur Denis Hervé de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je tiens à remercier le Docteur Serge Ahmed et le Professeur Umberto Spampinato d'avoir accepté de juger ce travail. Enfin, j'exprime ma gratitude aux Docteurs Jean-Christophe Corvol et Susan Sara pour leur participation au jury de thèse en tant qu'examineurs. A tous, merci pour votre présence et le temps que vous avez consacré à ce travail.

J'aimerais chaleureusement remercier le Dr. Jean-Pol Tassin pour son encadrement tout au long de cette thèse. Jean-Pol, tu m'as donné un sujet, des hypothèses et des idées d'expériences quand je n'en avais pas, et tu m'as appris à en formuler de nouvelles au cours de ces quatre années de travail commun. Le voyage a été laborieux et rempli de surprises, mais à l'inéluctable question "Tu recommencerais ta thèse avec lui?? ", je répondrais "OUI !" presque sans hésitation.

Je tiens à remercier Gérard "Gégé" Godeheu, pour son aide mais aussi pour sa présence et son soutien moral. Merci Gérard pour ton attitude toujours positive et tes encouragements, ce travail n'aurait pas été le même sans toi. Comme toujours, tu avais raison : on y arrive !

Que le Dr. Laurence Lanfumey trouve ici mes remerciements les plus sincères. Laurence, tu as été présente dès le début lors des moments les plus agréables et les plus durs. Merci pour tes conseils et ton aide. Ton énergie (et ta patience !) consacrées à former les étudiants, ta philosophie vis-à-vis de la recherche et ta motivation sont une inspiration.

Merci à François Tronche pour l'intérêt qu'il a manifesté pour nos travaux et pour l'évolution de ma thèse.

Je remercie également le Dr. Carole Escartin, ma toute première encadrante lors du stage de M1. Merci de m'avoir convaincue que les astrocytes servent bien à quelque chose, et de m'avoir montré l'exemple d'une vie professionnelle et personnelle remarquable.

Merci aux collègues du Collège de France. Merci à Yves Giovanni d'avoir accepté une collaboration avec une amatrice, à Anne-Marie Godeheu pour sa gentillesse et son aide, et aux membres de l'équipe de Laurent Venance pour leur accueil. En particulier, merci à toi Elodie pour ton franc-parler et ton optimisme rare vis-à-vis du futur. Après tout, rien n'est si compliqué!

Diana, thank you for your friendship. In the end, we survived a pretty good amount of experiences together, and I will always value your peculiar balance between kindness and strength. For me, you customize the slogan "sharing a coke with a friend".

Une grande pensée pour les deux libanaises du B2 ! Layal, l'hyperactive, la passionnée, et la très bonne amie. Merci pour tes petites et grandes intentions, je réalise la chance que j'ai eue d'apprendre à te connaître et à (forcément !) t'apprécier. Samah, quel phénomène ! Merci pour les nombreux fous-rires, pour tes opinions souvent originales (et souvent non partagées) et pour m'avoir démontré que les premières impressions ne sont pas toujours les bonnes.

Je tiens également à remercier Camille, ma voisine des derniers mois. Merci pour les bons moments, les conversations improbables et les pétales de plombs pendant l'écriture. Impossible dorénavant d'ouvrir Photobooth sans une pensée pour toi !

Je dois à Sheela d'avoir dégusté un gin tonic sur un rooftop à San Diego. Oui, la classe. Merci pour ta présence au labo et ton dynamisme, le B2 serait beaucoup plus en bazar sans toi...

Pour son grand travail de relecture ainsi que pour ses questions judicieuses, un grand merci à Marie Pascale Martres. Avec ou sans légion d'honneur, tu assures !

Merci à Lydie, Marie, Saucisse, Christelle et Claire pour leur compagnie et tous les moments partagés ensemble. Nos débats philosophiques sur la beauté et son corollaire direct, Leonardo Di Caprio, resteront dans les mémoires...

Merci à Emilie, Christophe et Jacques pour m'avoir démontré que j'étais plus forte que ce que je ne pensais.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du laboratoire PMSNC (intégré aujourd'hui à l'Institut Neurosciences Paris Seine) pour avoir créé un espace de travail agréable et convivial. Je pense notamment à Sakina, Stéphanie, Julien, Hervé, Anthony, Jean-Marie, Daniel, Kévin, Kätlin, Lisa, Elsa, Thomas, Laurianne, Fabrice, Carlos, Hélène, Jean-Luc, et tout ceux que j'oublie....

J'ajoute, pour terminer, quelques mots destinés à ma famille et mes amis proches :

A Salma, Typhaine, Alexis, Gaby, Sarah, Juliette, Janek, Cira, Godefroy, Maria Jésus, Susana, Marine et Mathieu : merci pour votre amitié et votre patience. Plus de rendez-vous décalés à cause d'une expérience qui dégénère, c'est promis. Sachez qu'en acceptant de brèves sorties de dernière minute, vous avez sauvé une doctorante !

Gracias a toda la familia del País Vasco. No os puedo nombrar a todos, ya que, por suerte, la familia es grande y llena de gente cariñosa y generosa. En una palabra, vascos.

Cruzando el charco, me gustaría agradecer a toda la familia de Argentina. Mis primeros agradecimientos se los mando a la tía Lina y el tío Agustín, a los cuales dedico este manuscrito. Gracias por vuestro cariño. Mi niñez está marcada por anécdotas con vosotros, nuestra familia ha sufrido una gran pérdida. Gracias a todos los primos de por allí, porque aunque la comunicación no siempre es continua, sé que todos nos alegramos de nuestros logros y encajamos los daños unidos.

Maru, ¡que prima! Tus ánimos y apoyo incondicional (del cual no sé si soy merecedora) siempre me han ayudado. Gracias por tus palabras cariñosas que siempre llegaban directo al corazón.

Jose, Analia y las nenas, gracias por vuestro apoyo durante esta tesis. Vuestra presencia física o de corazón siempre me ayudo a pasar los momentos más difíciles. Jose, gracias por demostrar, con el ejemplo, que la carrera de científico puede ser muy divertida e interesante.

Juliana, merci pour toute ton aide, tes conseils, et tes efforts pour me faire ressembler à quelque chose tout au long de cette thèse. Merci de me faire croire que chaque réussite, c'est parce que je le vaux bien !

Gracias abuela, por tu cariño incondicional y por ser un modelo de vida tan bien llevada. Siempre me acordaré de uno de los mejores consejos que me has dado: “Cuando parece imposible, ¡Adelante con los faroles!”

Papá, tu apoyo y cariño los demuestras cotidianamente en pequeños detalles: millones de idas y vueltas, tu paciencia para todo y tus ganas de compartir lo que te gusta. Gracias por todo

Por último, unas palabras para la persona que más me ha ayudado, en esta tesis y en el resto, gracias a ti mamá. Has sido un modelo de fuerza, de coraje, de pasión por tu trabajo y de amor a los tuyos. No puedo escribir aquí todas las cosas que has hecho por mí, ya que una tesis no sería suficiente. Solo deseo, en un futuro, saber educar y ayudar a mis hijos como lo supiste hacer tú. Te quiero mucho.

Liste de publications

Publication n°1 : Empreinte cachée dans la sensibilisation comportementale

Bobadilla, AC, Godeheu, G, Tassin, JP

Statut : Soumis

Publication n°2 : Altération persistante de la voie de signalisation des autorécepteurs α_{2A} -Adrénrgiques et sensibilisation comportementale à l'amphétamine.

Bobadilla*, AC, Doucet*, EL, Houades, V, Lanteri, C, Godeheu, G, Lanfumeey, L, Sara, SJ, et Tassin, JP

Statut : Publié, Biol Psychiatry. 2013 Jul 15;74(2):90-8.

Publication n°3 : Les animaux sensibilisés à l'amphétamine présentent une altération persistante de la voie de signalisation des autorécepteurs 5-HT_{1A}.

Bobadilla*, AC, Doucet*, EL, Godeheu, G, Lanteri, C, Lanfumeey, L, et Tassin, JP

Statut : En cours de rédaction

Publication n°4 : L'exposition répétée au MDMA induit une plasticité à long terme des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques

Lanteri, C, Doucet, EL, Hernandez Vallejo, SJ, Godeheu, G, Bobadilla, AC, Salomon, L, Lanfumeey, L, et Tassin, JP

Statut : Publié, Mol Psychiatry. 2013 Aug 20. doi: 10.1038/mp.2013.97. [Epub ahead of print]

* Ces auteurs ont participé de manière équivalente à ce travail

Liste de communications écrites (Posters)

Noradrenergic and serotonergic inhibitory feed-backs alter amphetamine-induced behavioural sensitization.

Bobadilla AC, Godeheu G, Doucet EL, Tassin JP

15th biennial meeting of the ebps - La Rochelle 2013

Repeated amphetamine impairs α_{2A} -adrenergic autoreceptors in the long run.

Bobadilla AC, Doucet, E, Godeheu, G, Lanteri, C, Lanfumey, L, Tassin, JP

11th meeting of the French Society for Neurosciences - Lyon 2013

Noradrenergic and serotonergic autoreceptors adaptations in amphetamine-induced behavioral sensitization: neurochemistry and behavior.

Bobadilla, AC, Doucet, EL, Godeheu, G, Lanteri, C, Lanfumey, L and Tassin, JP

8th FENS Forum of Neuroscience - Barcelona 2012

Serotonergic inhibitory feed-back in amphetamine-induced behavioural sensitisation.

Bobadilla, AC, Godeheu, G, Doucet, EL, Lanteri, C and Tassin, JP

Journée scientifique des doctorants de 2^{ème} année de l'ED3C - Paris 2012

Noradrenergic inhibitory feed-back contributes to amphetamine-induced behavioural sensitisation.

Bobadilla, AC, Doucet, EL, Godeheu, G, Lanteri, C and Tassin, JP

10^{ème} meeting of the French Society of Neurosciences - Marseille 2011

Do noradrenergic and serotonergic inhibitory feed-backs intervene in amphetamine-induced behavioural sensitisation?

Bobadilla, AC, Godeheu, G, Lanfumey, L and Tassin, JP

Journée scientifique des doctorants de 1^{ère} année de l'ED3C - Paris 2011

Long-term desensitization of 5HT_{1A} autoreceptors in amphetamine sensitized mice.

Bobadilla, AC, Tassin, J-P

13th Meeting Young Researchers in Life Sciences – Paris 2010

Liste de communications orales

Repeated amphetamine induces long-lasting dysfunction of α_{2A} -adrenergic autoreceptors.

Bobadilla AC, Doucet EL, Houades V, Lanteri C, Godeheu G, Lanfumey L, Sara SJ, Tassin J-P

Neuroscience 2013 Nanosymposium presentation - San Diego 2013

Noradrenaline and drugs of abuse: a love story.

Bobadilla AC,

21th colloquium of the Brain, Cognition and Behaviour Doctoral School - Roscoff 2013

Abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HTP : 5-hydroxytryptophane
6-OH-DA : 6-hydroxy-dopamine
AADC : aromatic L-amino acid decarboxylase
ou décarboxylase des acides aminés
aromatiques
AC: adénylyl cyclase
AMPA : récepteur glutamatergique à l' α -
amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-
propionate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ATV: aire tegmentale ventrale
BNST : bed nucleus of the stria terminalis ou
noyau du lit de la strie terminale
COMT : catéchol-O-méthyltransférase
CPF : cortex préfrontal
CPP : conditioned place preference ou
préférence de place conditionnée
CREB : C-AMP Response Element-binding
protein ou protéine se fixant au CRE
CRF : corticotropin-releasing factor ou
corticolibérine
CRF_{1/2} : récepteurs de la corticolibérine de
type 1/2
DA : dopamine
DAG : diglycéride
DAT : transporteur dopaminergique
DBH : dopamine- β -hydroxylase
DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
DSM: diagnostic and statistical manual of
mental disorders ou manuel diagnostique et
statistique des troubles mentaux

EMCDDA: European Monitoring Centre for
Drugs and Drug Addiction
ERK : extracellular signal-regulated kinases
GABA_{A/B} : récepteur de l'acide gamma-
aminobutyrique de type A/B
Glu : glutamate
IP₃ : inositol-triphosphate
LC : locus coeruleus
LHb : habénula latérale
LTD : long term depression ou dépression à
long terme
LTP : long term potentiation ou
potentialisation à long terme
MAO : monoamine oxydase
MAP: mitogen-activated protein
MDMA : 3,4-méthylène-dioxy-
methamphétamine
MSN : medium spiny neurons ou neurones
épineux moyens
NA : noradrénaline
NAc : noyau accumbens
NET : transporteur noradrénergique
NMDA : récepteur glutamatergique N-methyl-
D-aspartate
NTS : noyau du tractus solitaire
PCA : para-chloro-amphétamine
PGi : noyau paragigantocellulaire
PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PPT : noyau pedonculopontin du tegmentum
RD : raphé dorsal
RM : raphé médian

SNC : système nerveux central

SERT : transporteur sérotoninergique

SN : substance noire

TH : tyrosine hydroxylase

THC : Δ -9-tétrahydrocannabinol

TPH : tryptophane hydroxylase

PV: pallidum ventral

Sommaire

Introduction

I. La dépendance aux drogues

1. Substances et classifications 1
2. Qu'est-ce qu'un toxicomane ? 7
 - a. Définitions 8
 - b. Thèses et théories sur la toxicomanie 11
 - c. Le toxicomane : victime ou coupable ? 16
 - d. Traitements cliniques actuels 17
 - e. Modéliser l'addiction 19

II. Support biologique

1. Effets périphériques et centraux 28
2. Système effecteur et système modulateur 28
3. Système dopaminergique et circuit de récompense 29
4. Système noradrénergique 39
5. Système sérotoninergique 49
6. Interaction entre les systèmes noradrénergique et sérotoninergique : hypothèse du découplage 62

Problématiques 73

Publications

1. Publication n°1 79
2. Publication n°2 91
3. Publication n°3 111
4. Publication n°4 135

Discussion

1. Avancées effectuées et liens avec la littérature 157
2. Limites du travail et généralisations 168
3. Perspectives 177

Conclusion 181

Références 185

Introduction

Introduction

I. La dépendance aux drogues

1. Substances et classifications

Les drogues sont inhérentes au problème de la toxicomanie. Ces substances ont une action chimique sur le cerveau qui peut modifier nos comportements et, dans certains cas, s'opposer aux fonctions vitales les plus primaires, comme dormir ou manger. Il existe de nombreuses définitions plus ou moins détaillées pour caractériser une drogue. Le dictionnaire Larousse la définit comme une « substance psychotrope naturelle ou synthétique, qui conduit au désir de continuer à la consommer pour retrouver la sensation de bien-être qu'elle procure ». Nous allons ici présenter les grandes catégories des substances psychotropes les plus consommées en précisant leur origine, les principaux effets et les voies d'administration les plus fréquentes. Les effets neurobiologiques sur les transmissions neuronales seront traités plus loin, dans la partie « support biologique ».

Plusieurs approches existent pour classer les drogues, en fonction de leurs effets, leur origine et leur histoire ou encore leur statut juridique. Nous commencerons par développer les drogues illicites les plus anciennes, celles qui ont été déclarées illicites parce qu'elles ont la capacité de modifier l'état de conscience: les opiacés, les psychostimulants et le cannabis. Puis nous verrons les deux grandes substances à consommation régulée mais autorisée: le tabac et l'alcool. Nous inclurons dans cette seconde partie quelques remarques sur les nouveaux produits de synthèse (les designer's drugs) potentiellement toxicomanogènes, en constant renouvellement.

LES OPIACÉS

Le groupe des opiacés englobe l'opium, extrait de la plante de pavot, et ses dérivés. Les effets de ces substances sont connus depuis des millénaires par l'Homme et ont fortement influencé l'Histoire, notamment lors des guerres de l'Opium au XIXème siècle. En 1912, les pays dominants de l'époque signent la convention internationale de l'opium, pour réguler la synthèse et la distribution de l'opium, ses dérivés et de la cocaïne.

Morphine

La morphine est un alcaloïde végétal isolé en 1804 et qui représente 10% de la composition de l'opium. Malgré son très fort potentiel toxicomanogène, la morphine est

quotidiennement utilisée en clinique pour son effet analgésique puissant. Actuellement, l'utilisation de morphine comme drogue récréative est limitée au profit de l'héroïne qui est le premier opioïde consommé en Europe.

Héroïne

L'héroïne fut synthétisée en 1898 par les laboratoires Bayer et proposée comme un traitement contre l'abus de morphine. Or l'héroïne n'est autre que de la morphine di-acétylée. Sa dégradation dans le cerveau produit directement de la morphine, ce qui explique certains effets comparables de ces deux drogues. La molécule d'héroïne a cependant la propriété de passer la barrière hémato-encéphalique 100 à 1000 fois plus vite que la morphine (Rook et al. 2006). La voie d'administration la plus courante de l'héroïne est l'injection intraveineuse, qui permet de ressentir les effets une trentaine de secondes après son administration. Les effets de cette substance peuvent se diviser en différentes phases. Une première phase de « rush » caractérisée par un plaisir intense, puis une phase de « high », de grande joie et enfin une phase de semi-conscience ou de sommeil.

Pour la morphine comme pour l'héroïne, une importante tolérance se développe lors de prises répétées, ce qui protège les toxicomanes d'effets graves comme la dépression respiratoire et leur permet d'augmenter les doses en espérant maintenir l'intensité des effets. Le sevrage des opiacés induit une dépendance physique caractérisée par une dysphorie et des symptômes intenses (diarrhées, vomissements, suées...) qui s'estompent en quelques jours. Notons qu'à l'occasion d'une reprise de consommation à la suite d'un sevrage involontaire d'une dizaine de jours ou plus (prison ou rupture de distribution), les protections dues à la désensibilisation des récepteurs opiacés ont disparu et les prises de doses identiques à celles d'avant le sevrage sont à l'origine des décès par overdose.

LES PSYCHOSTIMULANTS

Cocaïne

La cocaïne est un alcaloïde végétal extrait des feuilles de coca, déjà utilisé pour ses propriétés stimulantes par les civilisations précolombiennes il y a plus de 5000 ans. C'est en 1859 qu'Albert Niemann purifie cette molécule qui, dans les années 1900, devient un grave problème de santé publique fortement combattu par les autorités. La consommation (le plus souvent sous forme de poudre «sniffée») diminue alors jusque dans les années 1970, où la cocaïne est « redécouverte » et très consommée. A cette même époque, une nouvelle

voie d'administration se développe : la cocaïne mélangée à l'ammoniaque est transformée en cristaux solides (le crack) que l'on fume.

La cocaïne a un effet double. Lors de la première phase, appelée la phase de « high » ou de « rush », le consommateur est euphorique et ressent une grande énergie. Puis la seconde phase est dysphorique, avec un sentiment de grande tristesse et l'apparition d'idées noires.

Lors du sevrage, il est courant d'observer une phase de « crash » de quelques jours pendant lesquels l'ancien consommateur est irritable, anxieux et a des troubles du sommeil, suivie d'une phase plus longue d'anhédonie et de baisse d'énergie. Ces symptômes sont cependant sans commune mesure avec le sevrage physique fort aux opiacés, puisque la cocaïne, et les psychostimulants en général, présentent une dépendance plus psychique que physique.

Amphétamines

Le groupe des amphétamines comprend des substances ayant pour caractéristique commune une ressemblance structurale avec la phényléthylamine mais des effets hétérogènes qui peuvent être stimulants (amphétamines), hallucinogènes ou entactogènes (qui facilitent le contact) (MDMA). Leurs propriétés de stimulation du système nerveux central et sympathique ont servi à lutter contre l'asthme, la narcolepsie ou encore l'obésité. Postérieurement à la convention sur les substances psychotropes de 1971, ces traitements ont été réduits à cause du potentiel toxicomanogène des amphétamines. Certains produits appartenant aux amphétamines sont toutefois encore utilisés, notamment pour leurs effets paradoxaux dans le traitement des syndromes d'hyperactivité de l'enfant (méthylphénidate, la Ritaline®, par exemple).

L'amphétamine, extraite de l'Ephédra au début des années 1900 est habituellement ingérée et les effets ressentis lors de la prise se rapprochent beaucoup de la cocaïne, avec un cycle euphorie/dysphorie qui évolue avec les prises. Le sevrage peut induire des syndromes physiques légers, mais la dépendance est surtout psychique.

C'est au Japon en 1893 que fut synthétisée la méthamphétamine (Pervitine), un dérivé direct de l'amphétamine. Commercialisée en 1938, elle fut utilisée pendant la deuxième guerre mondiale pour doper les soldats. Les effets recherchés sont semblables à ceux de l'amphétamine, c'est-à-dire une euphorie et une diminution de la fatigue. Les effets de la méthamphétamine, consommée par voie orale, par injection intraveineuse, fumée ou sniffée sont beaucoup plus durables que ceux de l'amphétamine (effets de 1h pour l'amphétamine et de 8h-24h pour la méthamphétamine).

Le 3,4-méthylène-dioxy-méthamphétamine (MDMA ou ecstasy), est la substance la plus utilisée dans la catégorie des dérivés amphétaminiques entactogènes. Elle fut synthétisée en Allemagne en 1898 puis « redécouverte » en 1912 par les laboratoires Merck. Sa consommation a été au départ très restreinte à la prise récréative dans le milieu « techno » et s'est élargie à tous les milieux festifs dans les années 2000. Les effets recherchés par les consommateurs sont principalement des sensations d'euphorie et de bien-être, une augmentation de l'énergie et une désinhibition, d'où le terme d'entactogène. A ces effets succède une « descente » qui se caractérise par un sentiment dépressif de plusieurs jours. La voie d'administration la plus fréquente est l'ingestion, sous forme de comprimés (composés habituellement de diverses substances en plus de MDMA) ou de poudre (couramment appelé « parachutes »). L'arrêt de la consommation n'entraîne pas de symptômes de sevrage physique, cependant le consommateur en désintoxication présente une phase initiale d'irritabilité et d'angoisse. Plusieurs études ont montré que la prise répétée de MDMA a des effets neurotoxiques, en particulier sur les neurones sérotoninergiques (Stone, Hanson, et Gibb 1987; Logan et al. 1988; Ricaurte et al. 1988; O'Callaghan et Miller 1994; Granado et al. 2008; Ricaurte et al. 2002). Cette dégénérescence expliquerait l'apparition de dépression chez les consommateurs d'ecstasy.

CANNABIS

Le terme cannabis regroupe plusieurs éléments : les différentes variétés des plants de chanvre, ses dérivés et également la drogue illicite. La drogue, extraite de la plante, est composée de plus de 60 cannabinoïdes dont seulement quelques uns, comme le tétrahydrocannabinol (THC), confèrent au cannabis ses propriétés psychotropes. Les feuilles de cannabis sont le plus souvent fumées, seules ou mélangées au tabac ou ingérées. Les effets principaux sont de plonger le consommateur dans un état de béatitude, de relaxation et de bien-être. Le cannabis est la drogue illicite la plus populaire en Europe, surtout chez les jeunes européens scolarisés. En effet, on estime à 15.4 millions le nombre de citoyens européens (15-34 ans) ayant consommé du cannabis en 2013 (Observatoire européen des drogues et des toxicomanies, 2013). Contrairement aux autres drogues, l'arrêt du cannabis n'induit pas de sevrage physique ni psychique, ce qui encourage l'idée de drogue douce, avec un faible potentiel de dépendance. Pour ces raisons, le débat sur la légalisation du cannabis est toujours d'actualité. Les autorités semblent s'orienter vers une ouverture puisqu'en janvier 2014 une autorisation de mise sur le marché a été délivrée au Sativex®, médicament associant deux dérivés du cannabis, le THC et le cannabidiol. Ce

médicament devrait être commercialisé en 2015 et serait exclusivement prescrit pour soulager les contractures sévères de certains patients atteints de sclérose en plaques.

Toutes les drogues décrites ci-dessous ont la capacité de modifier l'état de conscience et la majorité possèdent un fort potentiel toxicomanogène. Elles ont donc été interdites à la consommation dans la plupart des pays occidentaux. Cependant, deux autres substances partagent également ses propriétés et sont accessibles à la vente réglementée mais peu contrôlée. En effet, le tabac n'a pas la capacité de modifier l'état de conscience mais est une des drogues les plus hautement toxicomanogènes, puisqu'elle induit un fort sevrage psychique lors de l'arrêt de la consommation. L'alcool induit également un sevrage psychique et physique, et est capable, aux doses les plus élevées, de modifier l'état de conscience (c'est d'ailleurs la propriété que certains recherchent lors de la consommation). Nous allons étudier plus en détail ces substances et les raisons de leur acceptation sociale, au contraire des drogues illicites.

TABAC

Le tabac est une plante cultivée par les Amérindiens depuis plus de 2000 ans. C'est lors de la découverte du nouveau monde que Christophe Colomb ramena la plante en Europe et, au milieu du XVI^{ème} siècle, ses supposées vertus médicinales favorisèrent sa propagation rapide en Europe et en Asie. Actuellement, le mélange de feuilles séchées de plante de tabac et de plus de 2500 autres composants (pesticides, additifs, goudrons,...) composent la cigarette que fument plus de 16 millions de personnes en France (chiffres de 2010, Tabac-info-service). Il est admis aujourd'hui que c'est la nicotine, alcaloïde végétal pouvant représenter jusqu'à 5% du poids des feuilles, qui est principalement responsable des propriétés toxicomanogènes du tabac. Néanmoins, à la suite de différentes études et des observations montrant une faible efficacité des substituts nicotiques (Berlin et al. 2014), le rôle d'autres substances présentes dans la fumée du tabac ont été envisagées. En particulier des inhibiteurs de monoamines oxydases (IMAOs), anti-dépresseurs présents dans la fumée du tabac à la suite des combustions de sucres, pourraient entrer en synergie avec la nicotine pour rendre le tabac un des produits actuels le plus toxicomanogène. Les fumeurs recherchent principalement les effets stimulant, anxiolytique et coupe-faim des cigarettes.

On considère que le tabagisme est responsable de 1 décès sur 7 par an en France (70000 par an), présentant un lourd problème de santé publique, et il est probable que la forte

taxation de l'Etat sur la vente et les lobbys des multinationales du tabac expliqueraient le maintien de cette drogue dans la légalité.

ALCOOL

L'alcool, obtenu le plus couramment par fermentation, est consommé par l'Homme depuis des millénaires. On trouve les premières références à l'alcool dans les écrits mésopotamiens, 4000 ans avant Jésus-Christ. Les boissons alcoolisées entraînent une détente, de l'enjouement et une désinhibition, du consommateur et, bien que sujette à une certaine réglementation, la consommation d'alcool est très largement répandue dans de nombreux pays (10 millions de consommateurs réguliers en France). L'alcool présente un risque de dépendance (physique et psychique), allonge le temps de réaction (20% des accidents de la route mortels en 2013 sont dus à l'alcool) et la prise trop régulière entraîne de nombreuses complications de santé telles que les cirrhoses ou les risques cardiovasculaires. Cette drogue, la plus consommée en France, est donc bien capable de modifier l'état de conscience mais elle reste pourtant licite et socialement très acceptée. Ce statut est vraisemblablement dû à l'ancrage de l'alcool dans la culture européenne mais également au fait du peu de résultats obtenus par les pays qui ont essayé d'en interdire la consommation. Aux Etats-Unis par exemple, la prohibition de 1919 à 1933 a abouti à un fort développement du marché noir et des violences qui y sont liées.

NOUVEAUX PRODUITS DE SYNTHÈSE NON REGULÉS

Les nouveaux produits de synthèse sont des substances qui reproduisent les effets des drogues illicites mais sur lesquelles il existe temporairement un vide juridique permettant la synthèse et la distribution du produit. La majorité des ventes sont effectuées sur internet, où l'accessibilité et la rapidité sont facilitées. Un des exemples les plus connus est le cas de la méphédronne, un composant aux effets semblables à ceux de l'amphétamine et du MDMA. La consommation de cette substance s'est largement développée en Europe en 2007 et n'a été réglementée dans l'ensemble de la communauté qu'en 2010. Actuellement, ce sont les cannabinoïdes synthétiques, principalement des agonistes des récepteurs cannabinoïdes, qui sont les plus développés.

Afin de lutter efficacement contre cette émergence de nouveaux produits, l'EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) a créé un système d'alerte précoce européen, l'Early Warning System (EWS). Ce système signale l'apparition d'en moyenne 1 substance par semaine et a recensé 73 nouvelles substances psychoactives non régulées en 2012 (Observatoire européen des drogues et des toxicomanies 2013).

La partie principale de ce travail (Publications n°2 et n°3) expose l'effet d'un traitement répété d'amphétamine sur les systèmes d'autorégulation noradrénergique et sérotoninergique. Le choix de cette substance est fondé sur l'effet démontré de l'amphétamine sur ces systèmes mais aussi sur la consommation actuelle élevée d'amphétamine et de méthamphétamine, surtout aux Etats-Unis. On compte en effet 1.7 millions de jeunes adultes (15-34 ans) ayant consommé des amphétamines au cours de l'année 2012 en Europe (Observatoire européen des drogues et des toxicomanies 2013) et 1.2 millions de consommateurs de méthamphétamine (moyenne d'âge de 19.7 ans) aux Etats-Unis en 2012 (NIDA National Institute on Drugs Abuse 2013).

Depuis des millénaires, l'Humanité manipule et utilise les drogues pour se soigner ou pour modifier les émotions. A l'exception du tabac, toutes les différentes catégories de substances (les opiacés, les stimulants, le cannabis ou l'alcool) ont pour caractéristique commune d'avoir des effets sur les perceptions de la réalité et la politique dominante consiste à interdire ces produits qui, en modifiant l'état de conscience, peuvent abolir le discernement et le contrôle de ses actes.

Il est courant, particulièrement dans le domaine de la prévention, d'associer la consommation de drogues et la dépendance. Paradoxalement, dans de nombreux cas, la prise de drogue est récréative et restreinte à des contextes bien définis. Il paraît donc clair que la prise répétée de drogues n'entraîne pas systématiquement de dépendance. Voyons ce qui caractérise cette dépendance et comment est défini un toxicomane.

2. Qu'est-ce qu'un toxicomane ?

La consommation de drogues peut être le premier pas vers la toxicomanie, mais cela n'est pas systématique. La formule du Professeur Olievenstein « la toxicomanie est la rencontre d'une personnalité, d'un produit et d'un moment socioculturel » souligne bien que la seule molécule ne peut rendre compte de toute la complexité de la toxicomanie. De nombreux facteurs concernant la consommation sont importants pour définir le degré d'emprise du produit sur la vie du consommateur. Ainsi, la répétition des prises, la durée des phases de consommation, la quantité de drogue consommée, ou encore le contexte sont autant d'indices qui permettent de classer les consommateurs à différents niveaux de dépendance. Voyons quelles sont les définitions caractérisant la toxicomanie, les

différentes théories pour expliquer cette maladie et les traitements actuels qui s'offrent aux toxicomanes. Certains de ces traitements ont été proposés suite à des expériences sur des modèles animaux, dont nous exposerons les principes, leurs avantages et leurs limites.

Notons que les termes toxicomanie, addiction et dépendance, seront par la suite employés indifféremment. Bien qu'étant considéré comme un anglicisme, le terme « addiction » est néanmoins d'origine française puisqu'au XIII^{ème} siècle c'était un terme juridique signifiant « être contraint de rembourser ses dettes ». Son utilisation est aujourd'hui totalement intégrée à la langue française, tant dans le langage courant que dans les discussions scientifiques. Contrairement aux termes de dépendance ou de pharmaco-dépendance, qui concernent le plus souvent une dépendance à une substance, l'addiction peut exister vis-à-vis d'une activité ou d'un comportement, on parle d' « addiction sans substance ».

a. Définitions

De manière analogue aux drogues, il est possible de définir la toxicomanie de nombreuses manières, selon l'importance que l'on souhaite donner au produit, au comportement ou à l'état psychologique du consommateur. La définition la plus pragmatique est peut-être celle de la récente édition du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-V, American Psychiatric Association 2013) , où sont listés les 11 critères qui caractérisent un toxicomane ([Tableau 1](#)). Il existe une correspondance entre le nombre de critères et les niveaux d'intensité de la maladie. Présenter 2 à 3 symptômes correspond à une dépendance légère, 4 à 5 symptômes à une dépendance moyenne, et la présence de 6 ou plus de symptômes équivaut à une dépendance sévère. Ainsi, lorsqu'un consommateur présente au moins 2 de ces critères pendant une période de plus de 12 mois, il est considéré comme présentant une dépendance, dont la sévérité dépend du nombre de critères.

Dans cet ouvrage de référence, le maintien des symptômes sur la durée a une importance particulière, puisque la prise de drogues est souvent phasique. La persistance peut donc révéler l'incapacité à arrêter la consommation et la vulnérabilité à la drogue.

Il est intéressant de noter que cette définition exclut du statut de toxicomane toute personne qui consomme des drogues de façon répétée mais dont la prise est contrôlée et n'affecte pas la vie sociale ou professionnelle. Donc la prise répétée n'est pas équivalente à la toxicomanie, et dans ce constat réside toute la difficulté de modéliser cette maladie. Il a été montré qu'environ 6 à 15% des consommateurs d'alcool, cannabis, héroïne, cocaïne et

autres psychostimulants peuvent être définis comme toxicomanes, selon les critères du DSM (Anthony, Warner, et Kessler 1994). Ce chiffre atteint 33% pour la dépendance au tabac. Les propriétés pharmacologiques d'une substance n'expliquent donc pas exclusivement le potentiel toxicomanogène du produit, d'autres facteurs jouent un rôle dans ce potentiel. Un de ces facteurs est la vulnérabilité génétique. Il a été montré que la prévalence de l'addiction est comparable chez les jumeaux homozygotes, mais pas chez les jumeaux hétérozygotes (Goldman, Oroszi, et Ducci 2005). Le stress a également une influence sur les comportements addictifs, de nombreux travaux décrivent la potentialisation des réponses aux drogues par le stress et inversement (pour revue: Piazza et Le Moal 1996). Ce stress peut être concomitant à l'exposition aux drogues ou peut avoir eu lieu dans le passé de l'individu. On observe en effet que les abus ou les expositions à des crimes violents dans l'enfance sont liés au risque de dépendance à une substance (Douglas et al. 2010). Enfin, le caractère impulsif d'un individu peut également être considéré comme un facteur prédictif d'un risque de perte de contrôle caractéristique de la toxicomanie (Jentsch et al. 2014; Perry et Carroll 2008).

Critères de dépendance à une substance

Mode d'utilisation inadapté d'une substance conduisant à une altération du fonctionnement ou une souffrance, cliniquement significative, caractérisé par la présence de deux (ou plus) des manifestations suivantes, à un moment quelconque d'une période continue de 12 mois :

- (1) difficultés à remplir ses obligations professionnelles, scolaires ou familiales à cause de la consommation répétée de substance
- (2) consommation répétée dans des situations potentiellement dangereuses
- (3) poursuite de la consommation malgré des problèmes relationnels ou sociaux persistants susceptibles d'avoir été causés ou exacerbés par la substance.
- (4) tolérance, définie par l'un des symptômes suivants :
 - a. besoin de quantités notablement plus fortes de la substance pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré
 - b. effet notablement diminué en cas d'utilisation continue d'une même quantité de la substance
- (5) sevrage caractérisé par l'une ou l'autre des manifestations suivantes :
 - a. syndrome de sevrage caractéristique de la substance (...)
 - b. la même substance (ou une substance très proche) est prise pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage
- (6) la substance est souvent prise en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévu
- (7) il y a un désir persistant, ou des efforts infructueux, pour diminuer ou contrôler l'utilisation de la substance
- (8) sensation de « craving », ou désir irrésistible de consommer de la substance
- (9) beaucoup de temps est passé à des activités nécessaires pour obtenir la substance (p. ex., consultation de nombreux médecins ou déplacement sur de longues distances), à utiliser le produit (p. ex., fumer sans discontinuer), ou à récupérer de ses effets
- (10) des activités sociales, professionnelles ou de loisirs importantes sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation de la substance
- (11) l'utilisation de la substance est poursuivie bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par la substance (par exemple, poursuite de la prise de cocaïne bien que la personne admette une dépression liée à la cocaïne, ou poursuite de la prise de boissons alcoolisées bien que le sujet reconnaisse l'aggravation d'un ulcère du fait de la consommation d'alcool)

Tableau 1 : Critères de dépendance à une substance, extrait du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, DSM-V (American Psychiatric Association 2013)

Bien que l'expression « dépendant à une substance » soit la plus utilisée pour caractériser les processus d'addiction, mentionnons ici que les cas de dépendance à plusieurs substances sont courants en clinique (poly-consommation) et aussi en laboratoire (une drogue en potentialise souvent une autre, même si elle appartient à une autre catégorie). Ce phénomène suggère une voie commune d'au moins une partie des systèmes touchés par l'addiction, malgré les mécanismes distincts des drogues. A l'inverse, on considère avec de plus en plus d'intérêt les addictions sans substance, comme le jeu pathologique, ou encore les « addictions » au sexe ou au travail. Il est encore prématuré de définir ces comportements comme toxicomanogènes, cependant les ressemblances avec certains critères de dépendance (non contrôle du comportement, altération d'autres activités, sevrage psychique) sont indiscutables. Ces pathologies pourraient déréguler le circuit de la récompense, également au cœur de l'addiction. L'amalgame entre les deux pathologies est aggravé par le fait qu'un grand nombre de patients atteints d'une addiction sans substance souffrent aussi d'une addiction avec substance. Par exemple, un peu plus de 73% de joueurs pathologiques ont des problèmes de consommation d'alcool (Petry, Stinson, et Grant 2005) et 60 % sont dépendants du tabac (Expertise collective de l'Inserm 2008).

b. Thèses et théories sur la toxicomanie

Renforcement positif

La thèse du renforcement positif (Wise et Bozarth 1987) stipule que les propriétés toxicomanogènes d'une substance sont dues à sa capacité à induire une activation du système de la récompense qui pousse l'individu à répéter le comportement récompensant. Ce concept pourrait s'appliquer lors des premières prises, lorsque le consommateur recherche le plaisir ou le rush. Cependant, au fur et à mesure des prises, la phase de déplaisir prend le pas sur celle du plaisir, surtout lorsque la consommation devient un abus. De plus, pour le tabac, une des drogues qui induit le plus de dépendance, les premières prises n'entraînent aucun plaisir mais au contraire du dégoût. Le renforcement positif ne peut donc pas, à lui seul, expliquer l'addiction.

Renforcement négatif

A l'inverse du cas précédent, le renforcement négatif se focalise sur l'effet des drogues lorsque leur prise est interrompue, c'est-à-dire sur le sevrage physique et psychique. Ainsi, la dysphorie, l'anhédonie et les malaises physiques ressentis lors de l'arrêt de la prise seraient le facteur motivationnel majeur du maintien de la prise de drogue (Koob et Bloom

1988). Cette thèse pourrait être facilement appliquée aux dépresseurs du SNC (opioïdes et alcool), pour lesquels le sevrage physique est très fort et pourrait expliquer la continuité des prises pour éviter la sensation de manque. Pour les psychostimulants, le manque serait surtout psychique, puisque l'arrêt de ces substances n'induit pas de symptômes physiques forts. Cependant, les benzodiazépines induisent un syndrome de sevrage robuste et ne sont pas considérées comme toxicomanogènes (bien qu'elles soient régulées par la législation des substances vénéneuses de part le développement d'une tolérance et des symptômes de sevrage). Donc le renforcement négatif ne serait pas spécifique aux substances toxicomanogènes.

Processus opposants et contre-adaptation

La théorie des processus opposants (Solomon et Corbit 1974) suggère que toute expérience affective ou émotionnelle induit une réaction positive ou négative, suivie d'une seconde réaction inverse et moins intense que la première. Les auteurs appliquent cette théorie à l'addiction, où les premières prises de drogues induisent une forte réponse positive et une réponse négative plus faible. Au fur et à mesure des prises répétées, la réponse positive diminue en faveur de la réponse négative (Figure 1). Cela correspondrait à l'expérimentation d'un plaisir intense lors des premières prises qui se transformerait en un sentiment négatif au fur et à mesure de la consommation. Le consommateur continuerait donc à consommer pour retrouver le pic hédonique de départ et sortir de la réponse négative. On retrouve ici la notion de renforcement positif puis de renforcement négatif, à la base des théories précédentes.

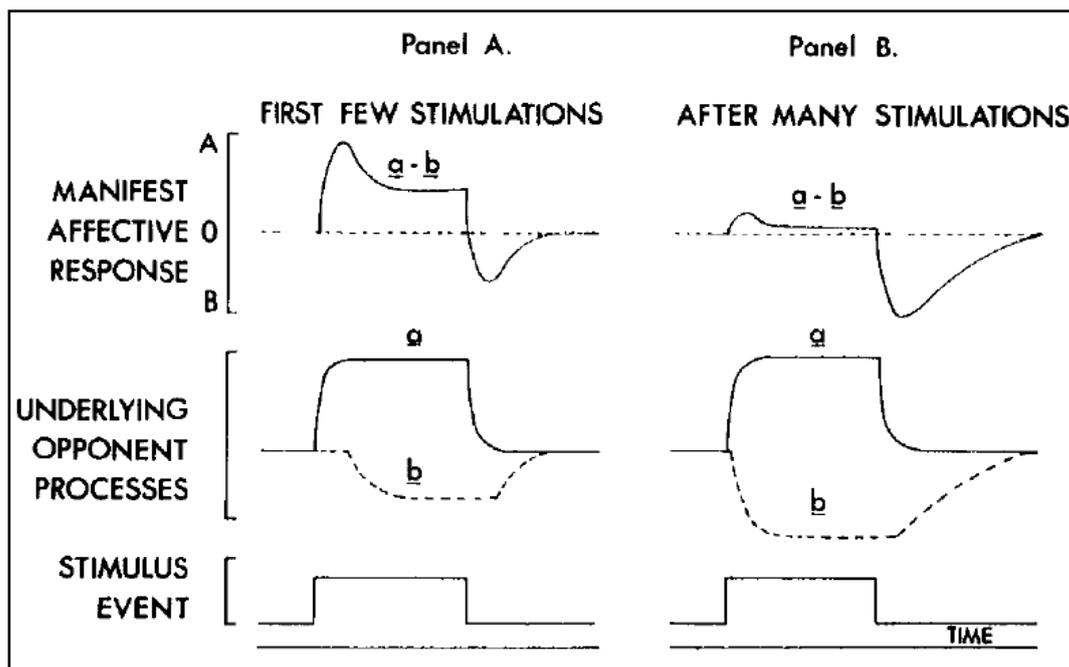


Figure 1 : Illustration de la théorie des processus opposants (d'après Solomon et Corbit, 1974). La réponse « a », en réponse au stimulus, va être suivie d'une réponse « b », qui s'amplifie après plusieurs stimulations. L'écart entre les réponses contraires (ou processus opposants) va se creuser avec les stimulations.

Cette théorie va être reprise et enrichie dans le modèle de la contre-adaptation (Koob et Le Moal 2001). Pour le cas spécifique des processus qui mènent à l'addiction, la première réponse à la drogue « a » est toujours positive et suivie d'une réponse négative « b » (**Figure 2, haut**). Comme pour la théorie des processus opposants, l'écart se creuse avec les prises en faveur de la réponse « b », mais au lieu de retourner à un niveau d'homéostasie (**Figure 2, bas**), des nouveaux états allostasiques s'installent. Ces états se définissent comme un maintien de la stabilité en dehors du point homéostasique standard. L'humeur va donc s'enfoncer à chaque prise dans un état allostasique qui modifie l'organisme entier pour rester dans un équilibre précaire. Ici encore, la prise serait un essai infructueux d'utiliser la réponse positive « a » pour retrouver l'état normal.

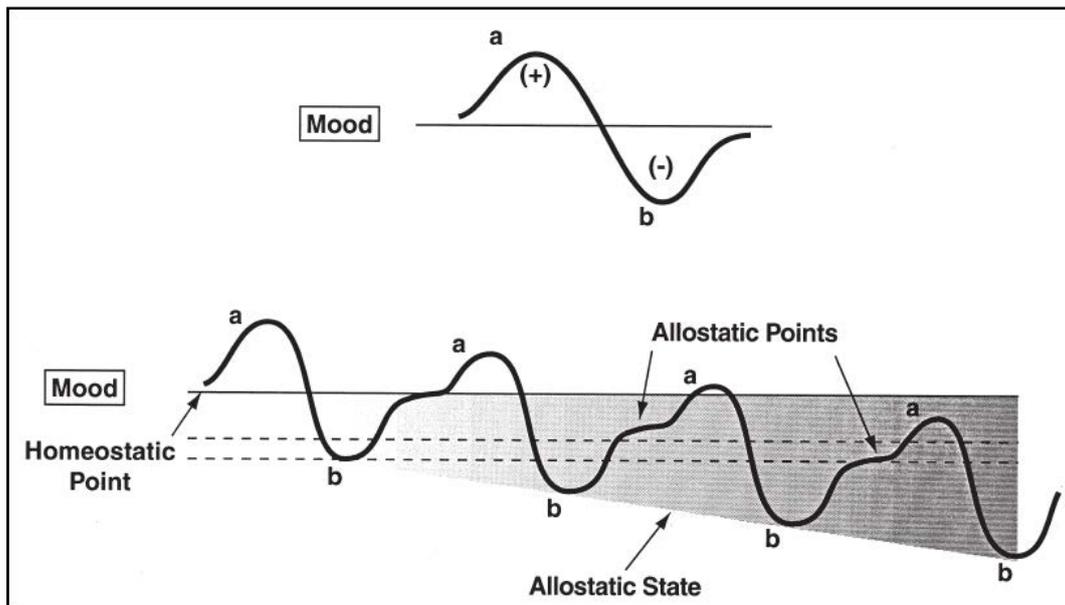


Figure 2 : Illustration du modèle de la contre-adaptation (d'après Koob et Le Moal, 2001). Haut : la prise de drogue induit une réponse « a » positive et « b » négative. Bas : la répétition des prises éloigne l'individu d'une régulation homéostatique de l'humeur pour définir des paliers d'allostasie de plus en plus bas.

Apprentissage aberrant

Une autre hypothèse propose que le passage entre une consommation contrôlée et l'addiction passerait par une modification des mécanismes de l'apprentissage. Ainsi, la prise répétée induirait un apprentissage associatif extrêmement fort entre des indices (un contexte, une seringue, une personne) et les effets récompensants des drogues. Cet apprentissage pousserait le toxicomane à poursuivre la consommation, même s'il souhaite arrêter définitivement (Robbins et Everitt 1999). Cette théorie paraît plausible au niveau anatomique, puisqu'il existe des liens entre le noyau accumbens (NAc) et l'hippocampe, structure ayant un rôle central dans la mémoire. De plus, le rôle de la dopamine (DA) ainsi que celui de CREB, un facteur de transcription dont l'expression est très régulée après des expositions aux drogues, a été mis en évidence dans les processus d'apprentissage (Robbins et Everitt 1999).

Sensibilisation de la motivation

Enfin, la théorie de la sensibilisation de la motivation (Robinson et Berridge 2008; Robinson et Berridge 1993; Robinson et Berridge 2003) propose que l'addiction est induite lorsque, chez certains individus, les drogues sensibilisent le système dopaminergique mesocorticolimbique, ce qui attribue une très forte motivation à des stimuli associés à la

récompense, le « wanting » (la recherche du produit) ou le manque, la volonté de consommer. Dans cette théorie, le « wanting » est différencié du « liking » (le goût pour le produit), c'est-à-dire des effets plaisants induits par les drogues. Chez un toxicomane, la volonté de consommer se renforcerait avec les prises alors que le plaisir diminuerait. L'apprentissage associatif aurait bien sûr un rôle dans l'attribution d'une trop forte motivation à la prise de drogues ou aux actes associés. La notion de « sensibilisation » du système dopaminergique est basée sur le modèle animal de la sensibilisation comportementale, que nous détaillerons par la suite.

Transition par étapes vers l'addiction

Dans les années 90, les cliniciens ont apporté deux notions fondamentales concernant les toxicomanes : 1) Tous les individus ne sont pas égaux vis-à-vis des conséquences addictives de la consommation de produit toxicomanogène, on parle de vulnérabilité et de protection, et 2) La toxicomanie s'installe progressivement selon trois étapes qui ont été définies comme l'usage récréatif, l'abus et enfin la dépendance. La proportion d'individus dans chaque stade diminue progressivement ; ainsi, pour cent usagers récréatifs, une quinzaine environ deviendront dépendants, cette proportion variant selon le produit consommé (Anthony, Warner, et Kessler 1994; Reynaud, Parquet, et Lagrue 1999) .

Récemment, l'équipe du Dr. Piazza, à Bordeaux, a développé la notion de passage vers l'addiction (Piazza et Deroche-Gamonet 2013) en se basant sur leur modèle d'auto-administration chez les rongeurs puis de caractérisation de trois critères, exposé un peu plus loin.

Lors de la première étape, la consommation de drogue est récréative et occasionnelle. Au niveau neurobiologique, un processus d'apprentissage se met en place, en hyper-stimulant les mêmes circuits que les récompenses naturelles. La drogue va donc être associée à un plaisir intense, c'est ce qui pourrait correspondre à l'usage récréatif.

Dans la deuxième étape, la consommation devient plus importante et plus fréquente, le temps de loisir consacré aux activités associées à la drogue est plus important, tout en gardant un comportement organisé dans son ensemble. Le passage entre la première étape et la deuxième nécessite une vulnérabilité individuelle résultant d'une sensibilisation de la transmission dopaminergique et d'une altération de la fonction préfronto-corticale. Dans cette étape, la drogue serait plus associée à une notion de désir et de besoin, notamment par la mise en place de processus d'habitude, une étape qui correspondrait à l'abus.

Enfin, la troisième et dernière étape est caractérisée par une perte de contrôle de la consommation. A ce niveau, le consommateur devient toxicomane et consacre la majorité de son temps à chercher et consommer la drogue, ce qui désorganise totalement son comportement. Au niveau neurobiologique, cette étape est caractérisée par une perte de plasticité synaptique persistante au niveau du système de la récompense. Pour le toxicomane, la drogue n'est plus associée au plaisir ni au désir, mais au besoin, et surtout au manque lorsque la drogue est absente. C'est la pharmacodépendance proprement dite.

Cette évolution est bien corrélée à la clinique et l'on retrouve la prise récréative sans notion d'addiction et une perte de contrôle progressive. Au niveau expérimental, le modèle d'auto-administration avec sélection de critères mis au point dans l'équipe du Dr. Piazza (Deroche-Gamonet, Belin, et Piazza 2004) permet de caractériser les altérations neurobiologiques spécifiques à chaque phase. Cependant, il faut noter que l'étude de ces altérations se limite dans cette approche au système dopaminergique ou dans quelques régions qui influencent directement la libération de dopamine.

La notion de transition par étapes vers l'addiction sera reprise dans la discussion, où nous intégrerons les résultats obtenus durant notre travail pour émettre de nouvelles hypothèses quant aux systèmes neurobiologiques touchés lors de la progression entre les trois paliers.

c. Le toxicomane : victime ou coupable ?

Dans toutes les thèses présentées ci-dessus, il est clair que l'addiction est une maladie, ce qui place le toxicomane dans un rôle passif, victime des modifications neurobiologiques induites par les drogues.

Cependant, la société présente une relation ambiguë face à l'addiction. En effet, des efforts importants sont voués à la recherche contre la maladie et au traitement clinique, et pourtant il est courant de rendre le toxicomane responsable de son état. Beaucoup soutiennent ainsi l'idée qu'avec de la volonté, tout le monde peut arrêter de consommer et guérir, ce qui paraît absurde pour d'autres maladies comme le cancer ou la maladie d'Alzheimer.

Une autre conception du problème propose d'étudier l'addiction, non pas comme une maladie, mais comme un choix volontaire (Heyman 2013). Selon les études exposant cette idée, la majorité des consommateurs de drogues illégales arrêtent la consommation à l'âge de 30 ans, sans aide thérapeutique d'un professionnel. Leur motivation est corrélée à des

raisons de choix personnel et non d'incapacité à contrôler les pulsions. Ainsi, la persistance de la consommation de drogue dépendrait des facteurs qui influencent la prise de décision. Continuer la prise serait le reflet d'une prise de décision dans un cadre local (par exemple consommer est plus plaisant qu'aller travailler), tandis que l'abstinence serait le fruit d'un choix dans un cadre global (au long terme, l'absentéisme peut causer la perte du travail).

Il est difficile de déterminer quelle vision de l'addiction est la plus proche de la réalité, mais l'hypothèse du choix volontaire a le mérite de questionner l'approche neurobiologique et de mettre en évidence les incohérences entre celle-ci et une société où le consommateur de drogues illégales est passible d'emprisonnement.

d. Traitements cliniques actuels

Actuellement, aucun traitement n'est capable, à lui seul, de faire sortir un toxicomane de l'état de dépendance. Les individus décidés à arrêter leur consommation se retrouvent donc dans une situation où leur volonté affronte en premier lieu les symptômes de sevrage physique, très douloureux pour les opiacés, puis le long sevrage psychique qui inclut la fatigue, l'anxiété, des symptômes aigus de dépression, ou le manque. C'est pour ces raisons que l'on compte environ 80% de taux de rechute pour les drogues, le taux spécifique pour l'arrêt du tabac, avec ou sans substituts nicotiniques, atteignant respectivement de 84 à 90 % de rechute (Brandon, Vidrine, et Litvin 2007; Hajek et al. 2013).

Malgré les recommandations officielles favorables à leur utilisation et leur grande accessibilité, les substituts nicotiniques ne semblent pas avoir un effet significatif sur le sevrage du tabac. Ce constat a encore été confirmé récemment par une étude qui analyse l'effet des patchs nicotiniques sur l'arrêt du tabac chez des femmes enceintes (Berlin et al. 2014). Dans le groupe recevant le patch nicotinique, l'abstinence totale n'est obtenue que dans 5.5% des cas. Dans le groupe placebo, ce chiffre atteint 5.1%. Pour les deux groupes, le temps de rechute est d'une quinzaine de jours. Quant à la cigarette électronique, une étude récente montre que son utilisation n'est pas associée à un taux de sevrage tabagique plus important (Grana, Popova, et Ling 2014). Néanmoins des recherches supplémentaires avec un plus grand nombre de sujets sont requises.

Pour les opiacés, il existe différents produits de substitution (méthadone, buprénorphine/Subutex). Ce sont des agonistes et/ou antagonistes des récepteurs opioïdes qui suppriment le manque sans induire l'effet euphorisant des drogues. Le toxicomane arrête de prendre la drogue mais reste soumis à sa dose du substituant.

Une ligne de recherche consiste à utiliser des inhibiteurs du système dopaminergique mésolimbique comme le vigabatrin, inhibiteur de l'enzyme qui dégrade le GABA. Le GABA libéré ayant une action inhibitrice sur l'activité des neurones dopaminergiques, son accumulation diminue la libération de DA induite par les prises de drogue (O'Brien 2008). Ces molécules présentent cependant un problème de spécificité, puisqu'elles ne touchent pas que la voie dopaminergique mésolimbique.

L'avancée la plus médiatique des dernières années dans le domaine du traitement de toxicomanes a sans doute été celle du baclofène. Cette molécule, agoniste des récepteurs GABA_B à effet myorelaxant, a été proposée par Olivier Ameisen comme médicament pouvant guérir définitivement l'alcoolisme en induisant chez les anciens alcoolodépendants une « indifférence à l'alcool » (Ameisen, 2008). Quelques études montrent un effet inhibiteur du baclofène sur la prise d'alcool chez l'homme (Addolorato et al. 2007; Addolorato et al. 2011), mais aussi sur l'auto-administration et la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne (Filip, Frankowska, et Przegaliński 2007; Frankowska, Nowak, et Filip 2009), la recherche d'héroïne (Spano et al. 2007) ou de nicotine (Fattore et al. 2009) chez le rongeur. L'effet du baclofène sur la voie dopaminergique mésolimbique reste complexe (Cruz et al. 2004). Actuellement (Mai 2014), deux essais cliniques de grande échelle (Bacloville et Alpadir) cherchent à montrer l'efficacité du baclofène contre l'alcoolisme, tandis que l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a récemment instruit une recommandation temporaire d'utilisation du baclofène dans le traitement de l'alcoolisme (ANSM 2014). Il n'y a pour l'instant aucun essai clinique pour étudier l'effet du baclofène sur l'addiction à d'autres substances.

Malgré la recherche constante de traitements pharmacologiques, rappelons qu'une part importante de la toxicomanie est psychologique et que par conséquent, toutes les thérapies non médicamenteuses qui accompagnent le toxicomane en sevrage peuvent diminuer significativement les taux de rechute.

Ce manque de médicaments pour traiter l'addiction contraste avec l'augmentation des efforts de la recherche et des chercheurs sur ce sujet. Regardons en détail les modèles les plus courants utilisés pour étudier l'addiction et leur validité face à la clinique.

e. Modéliser l'addiction

Comme cela a déjà été mentionné, il est très difficile de modéliser l'addiction chez l'animal, puisque c'est une maladie dans laquelle l'état psychologique de l'individu est déterminant. Cet aspect est en particulier difficilement observable chez les rongeurs. C'est pour cela que la majorité des modèles cherchent à déterminer les modifications neurobiologiques mesurables induites par des expositions aux drogues. Chaque modèle a néanmoins sa spécificité et a permis de faire avancer les connaissances.

A la fin de cette partie, un tableau récapitule les principales caractéristiques des modèles exposés ([Tableau 3](#)).

Préférence de place conditionnée (ou CPP pour « Conditioned Place Preference »)

Il existe de nombreuses variantes du protocole de la préférence de place conditionnée, mais l'expérience de base reste l'association d'un stimulus (administration d'une drogue, par exemple) à un contexte reconnaissable par l'animal (conditionnement classique). Si, lorsque l'animal est libre d'explorer entre le compartiment renforcé et le compartiment neutre, il passe plus de temps dans le compartiment associé à la drogue que dans le compartiment neutre, il est convenu que cela est dû à ce que la drogue a un effet récompensant. A l'inverse, si l'animal évite le compartiment où il a reçu le traitement, la drogue est considérée comme ayant un effet aversif. Toutes les drogues (cocaïne, amphétamine, méthamphétamine, morphine, nicotine, éthanol et cannabis) induisent une CPP (Bardo et Bevins 2000), mais celle-ci n'est pas spécifique aux drogues. Ainsi, d'autres récompenses naturelles, comme la nourriture, l'eau, l'exercice physique (roue) ou l'accouplement induisent également une CPP robuste. Malgré cette non-spécificité, ce modèle reste intéressant car il permet de tester les effets des drogues lors du sevrage (le jour du choix, l'animal ne reçoit généralement pas de drogue) et donne des informations sur les possibles effets aversifs. A ce stade nous pouvons conclure que ce modèle mesure, non pas une addiction, mais, comme son nom l'indique, une préférence, ou une satisfaction induite par le produit injecté.

Auto-administration

Le modèle d'auto-administration de drogues est considéré aujourd'hui comme l'un des meilleurs modèles prédictifs de la capacité toxicomanogène d'une substance. Il est d'ailleurs demandé explicitement aux entreprises pharmaceutiques de tester avec ce

paradigme tous leurs produits avant qu'ils puissent obtenir leur autorisation de mise sur le marché (AMM).

Le modèle se base sur un conditionnement opérant : l'animal apprend qu'un comportement (comme appuyer sur un levier ou placer le museau dans un trou) va induire une administration de drogue. Différentes voies d'administration sont possibles, les plus courantes étant, de par leur analogie chez l'Homme, les voies orale et intraveineuse. L'administration intra-crâniale a également été très utilisée car extrêmement utile pour identifier les régions cérébrales en lien avec l'auto-administration (O'Brien et Gardner 2005). Dans ce paradigme, l'animal apprend donc à répéter un comportement pour obtenir la drogue. L'expérimentateur peut choisir le type de renforcement, c'est-à-dire le rapport comportement/administration. On trouve ainsi un ratio fixe (un nombre défini de répétitions du comportement entraîne une récompense) ou variable (de plus en plus de comportements sont nécessaires pour obtenir la récompense). Le conditionnement peut être couplé à un indice (visuel ou auditif le plus souvent), qui associe la récompense après un apprentissage par association classique. L'animal doit donc répondre à l'indice, même en absence de la drogue.

On distingue 4 grandes phases d'auto-administration (Weinshenker et Schroeder 2007). Il y a d'abord la phase d'acquisition pendant laquelle l'animal apprend le comportement opérant, puis le maintien lorsque la prise de drogue devient stable. Il est possible par la suite d'induire l'extinction en remplaçant la drogue par une solution neutre, ce qui provoque la perte progressive du comportement opérant. Enfin, la phase de reprise a lieu quand le comportement opérant est restauré, à l'aide d'indices, de stress ou d'une injection non-contingente (forcée) de drogue.

Lorsque l'auto-administration de cocaïne est limitée à un accès court (1 heure par session), la prise de drogue reste faible et constante. Cependant, si l'accès est prolongé (6 heures par session), la prise augmente avec les sessions (Ahmed et Koob 1998). Cette prise intensifiée a été proposée comme un modèle pour le comportement de prise de drogue excessive, une étape clé dans la transition à l'addiction.

Toutes les drogues induisent une auto-administration, et, jusqu'à récemment, il était admis que l'auto-administration dans les modèles animaux était spécifique aux drogues. Cependant, des travaux comparant les propriétés récompensantes du sucre à celles de la cocaïne ont montré que des substances considérées comme non-toxicomanogènes (comme la saccharine ou le sucre) induisent également une auto-administration, plus forte que pour

la cocaïne (Lenoir et al. 2007). Comme le sucre n'est pas plus toxicomanogène que la cocaïne chez l'homme, il est probable que ce test ne modélise pas le potentiel addictif mais plutôt les propriétés agréables des substances auto-administrées. Or, comme suggéré dans l'hypothèse de la sensibilisation de la motivation, les effets plaisants peuvent être différenciés des effets de manque, qui sont ceux qui pourraient induire une prise non contrôlée des drogues.

Récemment, l'équipe de Véronique Deroche-Gamonet a élégamment développé le modèle d'auto-administration en développant une analogie avec l'utilisation de la drogue chez l'Homme (Deroche-Gamonet, Belin, et Piazza 2004; Piazza et Deroche-Gamonet 2013). Ce modèle reprend trois critères inhérents à la dépendance chez l'Homme, transposés en critères mesurables dans le modèle animal (**Tableau 2**).

Chez l'Homme	Chez l'animal (rats)
Le sujet a des difficultés à arrêter ou limiter la prise de drogue	Persistance du comportement d'obtention de la cocaïne malgré l'indication que la drogue n'est plus disponible.
Le sujet a une très forte motivation à prendre la drogue et se concentre dans les activités qui permettent son obtention et sa consommation	Mesure du point de rupture (breaking point), soit la quantité maximale d'effort fourni par l'animal pour obtenir la drogue dans un paradigme de ratio progressif
La consommation de la substance est maintenue malgré ses conséquences nuisibles	Mesure de la persistance de la prise de drogue lorsque celle-ci est associée à une punition

Tableau 2 : Tableau comparatif des critères chez l'Homme et leur transposition en comportements mesurables dans le modèle animal. Basé sur Deroche-Gamonet, Belin, et Piazza 2004.

Les résultats divisent les animaux en 3 groupes principaux :

- 1) Des animaux qui présentent les trois critères (17.2%) : ces animaux sont considérés comme « l'équivalence » des toxicomanes.
- 2) Des animaux qui ne présentent aucun des critères (41.4%) : bien qu'ils s'auto-administrent de la cocaïne, ces animaux ne persistent pas dans la prise de drogue lorsque celle-ci n'est pas disponible, demande trop d'effort ou lorsqu'elle est associée à un choc électrique.

- 3) Un groupe intermédiaire où les animaux présentent un ou deux critères. Ce groupe, bien que difficile à étudier, est intéressant car il peut représenter le deuxième palier de la théorie de la transition par étapes de l'addiction, lorsque l'usage de la drogue est intense.

Notons que le pourcentage d'animaux agissant comme l'équivalent des toxicomanes (17.2%) correspond au pourcentage d'individus considérés comme addicts parmi la population qui consomme des drogues (Anthony, Warner, et Kessler 1994), ce qui constitue la première étape de validation du modèle et des critères de sélection. Cependant, il n'est pas encore connu si les mêmes résultats sont obtenus avec d'autres drogues (notamment les opiacés), point déterminant pour utiliser ce modèle comme base d'étude du passage à la dépendance.

Il est important de souligner que, malgré le perfectionnement du modèle avec les trois critères décrits ci-dessous, le modèle de l'auto-administration peut encore être largement amélioré. En effet, lorsque les animaux ont le choix entre la cocaïne et une autre récompense, seulement 8.7% d'animaux continuent à s'auto-administrer de la cocaïne, et ce malgré une exposition antérieure à la drogue intense (Ahmed 2010). Ces résultats suggèrent que, plus que la modélisation d'un état addictif, le modèle d'auto-administration serait la résultante d'un manque de choix.

Sensibilisation comportementale

Le modèle de la sensibilisation comportementale est au cœur de la théorie de la sensibilisation de la motivation exposée précédemment (Robinson et Berridge 1993). Le modèle repose sur le fait que des injections répétées de toutes les drogues induisent une activité locomotrice qui se potentialise au cours des injections, à dose constante (Figure 3).

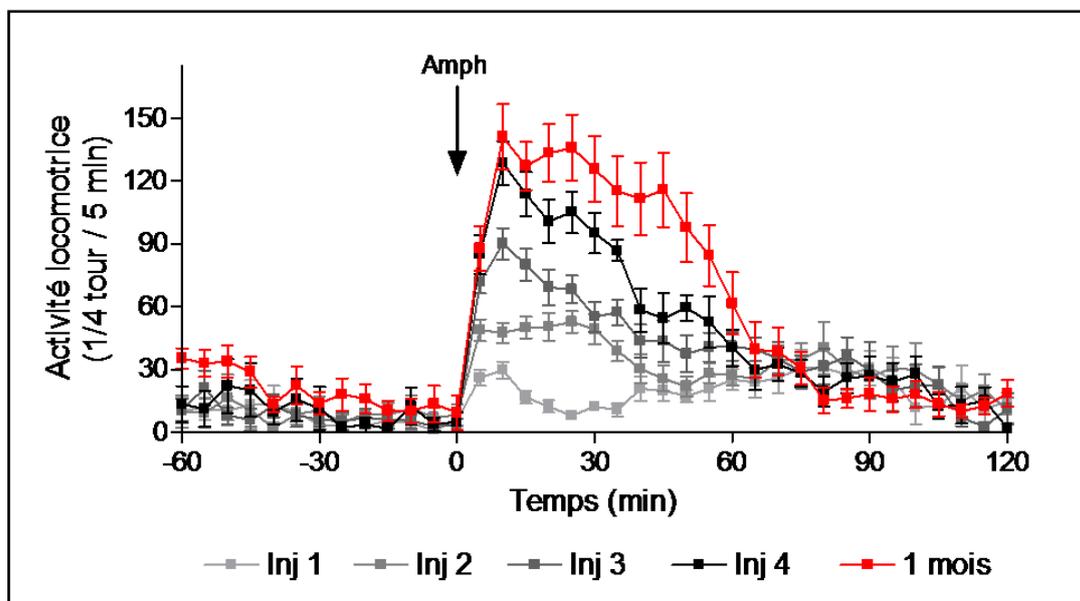


Figure 3 : Exemple d'une sensibilisation comportementale. Le protocole consiste à injecter 1 fois par jour pendant 4 jours consécutifs la même dose d'amphétamine (2 mg/kg, i.p.). A chaque nouvelle injection, la réponse locomotrice est augmentée. Cette réponse reste potentialisée jusqu'à au moins un mois de sevrage (courbe rouge).

La sensibilisation comportementale est divisée en deux phases : l'induction (ou initiation) et l'expression. L'induction regroupe les modifications moléculaires et/ou cellulaires immédiates qui induisent la sensibilisation comportementale et qui sont observables au fur et à mesure des injections. L'expression, vérifiée après un sevrage lors du jour test, concerne les conséquences à long-terme de ces modifications initiales (Kalivas et Stewart 1991; Steketee et Kalivas 2011). Comme nous le verrons dans la partie résultats (Publication n°2), il est possible, grâce à un traitement pharmacologique administré pendant la phase d'induction, de bloquer ces modifications cellulaires et donc de bloquer l'expression de la sensibilisation. Inversement, ne pas observer d'activité locomotrice pendant la phase d'induction ne présage pas du résultat de l'expression. Ainsi, associer des injections d'amphétamine avec des antagonistes des récepteurs dopaminergiques de type D2 bloque l'induction, mais le jour test les animaux sont sensibilisés (Vezina 1996).

La force de ce modèle réside dans la propriété commune de toutes les drogues à induire cette réponse potentialisée. L'idée qu'une voie commune soutient ce phénomène est renforcée par la sensibilisation croisée indiquant que certaines drogues se potentialisent entre elles. Ainsi, après des injections répétées d'amphétamine, les animaux répondent de manière sensibilisée à la cocaïne (Bonate, Swann, et Silverman 1997). La sensibilisation croisée entre l'amphétamine et la morphine a également été montrée (Vanderschuren et al. 1997; Vanderschuren et al. 1999a; Vezina et Stewart 1990), à l'exception d'une étude (Vanderschuren et al. 1999b). Notons que des animaux sensibilisés présentent une CPP plus forte que les contrôles, ainsi qu'une plus forte auto-administration (Vanderschuren et Pierce 2010), ce qui suggère que les réseaux touchés par le protocole de sensibilisation jouent un rôle également dans ces deux autres comportements. Concernant la validité de ce modèle par rapport à l'Homme, certaines études montrent une potentialisation de symptômes (niveaux d'activité et d'énergie, humeur ou quantité de parole) comparables à une sensibilisation comportementale à l'amphétamine (Strakowski et al. 1996; Strakowski et Sax 1998; Boileau et al. 2006).

Il a été montré que la sensibilisation comportementale se maintient à long terme (certains auteurs la mesurent après un an de sevrage : Paulson, Camp, et Robinson 1991). Ainsi, malgré l'aspect non-contingent des injections (administrées par l'expérimentateur), ce modèle permet d'étudier les modifications neurobiologiques à long-terme induites par l'exposition répétée aux drogues. C'est pour étudier ces modifications dans les systèmes noradrénergique et sérotoninergique que nous avons utilisé ce modèle. Néanmoins, le maintien de cette sensibilisation est ambigu, puisque il est courant dans la littérature d'assimiler l'activité locomotrice aux stéréotypies induites par des fortes doses de drogues. Afin de se concentrer sur la potentialisation locomotrice uniquement, nous avons réalisé une étude du maintien de la sensibilisation induite par l'amphétamine à faibles doses d' (Publication n°1).

Le modèle de la sensibilisation comportementale est confronté à deux limitations principales : premièrement, très peu d'injections de drogue (une seule à forte dose, dans certains travaux) suffisent pour induire la sensibilisation (Robinson, Becker, et Presty 1982; Magos 1969; Valjent et al. 2010). Ce résultat contraste avec la réalité clinique, puisque généralement de nombreuses expositions à la drogue précèdent l'entrée dans la dépendance. Ce modèle pourrait donc être intéressant dans les premières étapes de la prise, qui influencent mais qui ne définissent pas l'addiction (Vanderschuren et Pierce 2010). Secondement, le traitement répété de drogues potentialise la réponse à celles-ci

mais aussi à d'autres récompenses naturelles, ce qui va à l'encontre d'un des critères décrits dans le DSM, selon lequel le toxicomane éprouve un désintérêt pour les récompenses naturelles, sociales ou professionnelles (Vanderschuren et Pierce 2010). En effet, des animaux prétraités avec des drogues selon le modèle de sensibilisation montrent une facilitation du comportement sexuel (Fiorino et Phillips 1999), ainsi qu'une augmentation des comportements de poursuite sexuelle et de nourriture, et une augmentation de l'intérêt social (Nocjar et Panksepp 2007). Ces résultats suggèrent que la sensibilisation induit une augmentation des systèmes impliqués dans la motivation générale, non spécifique aux drogues.

Modèle	Administration de la drogue	Conditionnement	Avantages	Limites
Sensibilisation comportementale	Non- contingent (administré par expérimentateur)	Classique	<ul style="list-style-type: none"> • Maintenance à long terme • Commun à toutes les drogues • Sensibilisation croisée entre drogues • Symptômes comparables mesurés chez l'Homme 	<ul style="list-style-type: none"> • La volonté de l'animal n'est pas du tout prise en compte • A doses élevées, apparition de stéréotypies (comportement compétitif) • Non spécifique aux drogues (augmente la motivation aux récompenses naturelles)
Préférence de place conditionnée			<ul style="list-style-type: none"> • Animal testé en absence de drogue (pas d'effet pharmacologique le jour du test) • Valable pour montrer un effet récompensant ou aversif 	<ul style="list-style-type: none"> • La volonté de l'animal n'est pas du tout prise en compte • Non spécifique aux drogues
Auto-administration (AA)	Contingent	Opérant	<ul style="list-style-type: none"> • Volonté de l'animal prise en compte • Effets récompensants des drogues mis en évidence • Possibilité de modifier les conditions (short/long access, binge drinking,...) 	<ul style="list-style-type: none"> • Non spécifique aux drogues • Quand possible, ~90% des animaux préfèrent un choix alternatif
AA, sélection selon 3 critères			<ul style="list-style-type: none"> • Tous les avantages de l'AA • Bonne adéquation avec dépendance chez l'Homme • Distingue consommation et dépendance 	<ul style="list-style-type: none"> • Quid des autres drogues? • Procédure de sélection très longue (~2.5 mois d'AA)

Tableau 3 : Tableau comparatif des principaux modèles animaux utilisés dans l'étude de l'addiction. Le comportement compétitif fait référence à l'incompatibilité entre les stéréotypies et la locomotion. Le choix alternatif se rapporte aux expériences décrites par Lenoir et coll. (2007), qui montrent que 94% des animaux préfèrent le sucre ou le goût sucré à l'auto-administration de cocaïne lorsque le choix est possible. Les 3 critères définis par Deroche-Gamonet et coll. (2004) sont la persistance du comportement d'obtention de la cocaïne malgré l'indication que la drogue n'est plus disponible, la mesure du point de rupture et la mesure de la persistance de la prise de drogue lorsque celle-ci est associée à une punition.

On peut donc définir la toxicomanie comme une maladie complexe et aux effets à long-terme, qui n'est en aucun cas systématique lors de la prise de drogues. Les théories pour l'expliquer proposent des modifications au niveau du système de la récompense, de l'apprentissage associatif ou des changements du point homéostatique de l'humeur. Malgré un manque clair d'outils pharmacologiques pour traiter l'addiction, les études précliniques continuent à se développer, en utilisant des modèles fondés sur les réponses comportementales induites par les drogues ou sur des conditionnements opérants qui révèlent l'effet récompensant des drogues. Dans ce travail, nous avons utilisé le modèle de la sensibilisation comportementale, qui nous a paru adapté et le plus facile à mettre en œuvre pour étudier les modifications neurobiologiques à long-terme induites par l'amphétamine.

Toutes les études sur les modèles animaux ont permis de mettre en évidence un rôle de certains systèmes neuronaux et de leurs neurotransmetteurs dans l'addiction. Une importance particulière est donnée à la dopamine (DA), la noradrénaline (NA), la sérotonine (5-HT) et le glutamate (Glu). La partie suivante expose en détail ces transmissions et comment elles sont modifiées dans le contexte de l'addiction.

II. Support biologique

1. Effets périphériques et centraux

En plus des effets sur le système nerveux central que nous allons développer, les drogues ont aussi un impact sur le système nerveux périphérique, et en particulier sur le système nerveux autonome. Ainsi, l'amphétamine et la cocaïne activent le système nerveux sympathique en augmentant la noradrénaline libérée au niveau des terminaisons nerveuses innervant les organes. Cela se traduit par une augmentation de la pression artérielle, du rythme cardiaque, et une dilatation des bronches et des pupilles.

Bien que ces effets aient toute leur importance, en particulier pour le traitement, nous allons nous limiter dans ce travail aux effets sur le système nerveux central.

2. Système effecteur et système modulateur

Le système effecteur constitue plus de 99% de neurones du cerveau, et se divise en neurotransmetteurs excitateurs (glutamate et aspartate) et inhibiteurs (GABA et glycine).

Quelques articles montrent le rôle du GABA dans les réponses aux drogues. En effet, bloquer les récepteurs GABA_B inhibe la sensibilisation locomotrice induite par l'amphétamine de manière dose dépendante (Cedillo et Miranda 2013). De plus, les souris n'exprimant plus la sous-unité $\alpha 2$ du récepteur GABA_A ne présentent plus de sensibilisation comportementale à la cocaïne (Dixon et al. 2010), bien qu'il ne semble pas avoir d'effet de cette inactivation sur l'auto-administration ou sur le rétablissement de la recherche de cocaïne (Dixon et al. 2014). A ces résultats s'ajoutent les études menées sur le baclofène, agoniste du récepteur GABA_B. Comme détaillé précédemment, le baclofène diminue la prise d'alcool chez l'homme (Addolorato et al. 2011) et réduit plusieurs comportements murins induits par d'autres drogues, comme l'auto-administration et la sensibilisation comportementale à la cocaïne (Filip, Frankowska, et Przegaliński 2007; Frankowska, Nowak, et Filip 2009), la recherche d'héroïne (Spano et al. 2007) et de nicotine (Fattore et al. 2009).

La majorité des études se concentrent cependant sur le rôle de la transmission glutamatergique dans la réponse aux drogues. Dans le modèle de la sensibilisation comportementale, le blocage des récepteurs NMDA par le MK-801 inhibe le développement de la sensibilisation comportementale à l'amphétamine et à la cocaïne (Karler et al. 1989; Kalivas et Alesdatter 1993). De plus, les animaux n'exprimant plus la sous-unité NR1 du récepteur NMDA ne présentent plus de sensibilisation à la cocaïne, bien que celle-ci soit toujours observée pour l'amphétamine (Schenk, Valadez, McNamara, et al.

1993; Ramsey et al. 2008; Heusner et Palmiter 2005). En ce qui concerne les autres modèles, le blocage des récepteurs NMDA abroge l'auto-administration de cocaïne (Schenk, Valadez, Worley, et al. 1993) et la préférence de place à la morphine (Harris et al. 2004).

Il est donc clair que la transmission glutamatergique a une incidence fondamentale dans la réponse aux drogues, mais nous allons nous focaliser sur le système neuromodulateur qui, avec moins de 1% des neurones du cerveau, impacte néanmoins le système effecteur à tous les niveaux.

3. Système dopaminergique et circuit de récompense

La dopamine (DA) est synthétisée à partir de la L-tyrosine. L'acide aminé est transformé par l'enzyme limitante tyrosine hydroxylase (TH) en L-DOPA, à son tour décarboxylée en DA. Les deux sources principales de DA du SNC, l'aire tegmentale ventrale (ATV, noyau A10) et la substance noire (SN, noyau A9) se trouvent au niveau du mésencéphale (Figure 4). On distingue 3 voies dopaminergiques principales (Lindvall et Björklund 1978; Thierry et al. 1973; Fallon et Moore 1978):

- La voie nigrostriée : les neurones dopaminergiques de la substance noire qui projettent vers le striatum (caudé-putamen).
- La voie mésocorticale : les neurones dopaminergiques de l'ATV qui projettent vers les cortex cingulaire, préfrontal (CPF) et perirhinal.
- La voie mésolimbique : les neurones dopaminergiques de l'ATV qui projettent sur le noyau accumbens (NAc.), l'amygdale, l'hippocampe et le septum (structures limbiques).

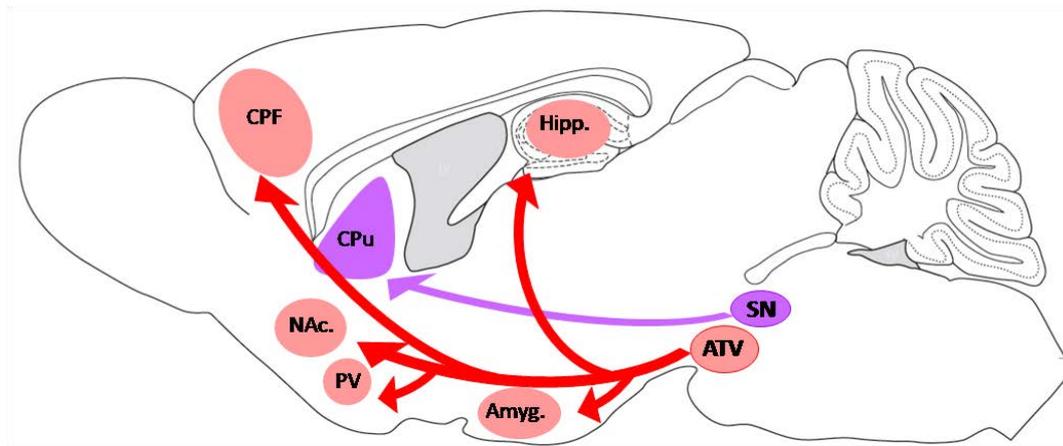


Figure 4 : Voies nigrostriée (violet) et mésocorticolimbique de la souris (rouge)
 Amyg. : Amygdale ; ATV : Aire tegmentale ventrale (A10) ; CPF : Cortex préfrontal ; CPU : Caudé-Putamen (striatum) ; Hipp. : Hippocampe ; NAc. : Noyau accumbens ; SN : Substance noire ; PV : pallidum ventral

Les voies mésocorticales et mésolimbiques sont souvent regroupées en une seule voie mésocorticolimbique. C'est sur ce système que nous allons nous concentrer, puisqu'il est à la base du circuit de la récompense, très altéré dans tous les modèles d'addiction.

Le circuit de la récompense est un réseau de neurones des régions de l'ATV, le NAc, le CPF, le pallidum ventral, l'hippocampe et l'amygdale (structures en rouge sur la [Figure 4](#)). Schématiquement, l'ATV est activée lors de l'apparition d'un nouveau stimulus renforçant et un stimulus conditionné qui prédit la récompense (Schultz 1998). On considère le NAc, situé dans le striatum ventral, comme le centre des actions ciblées, là où se forment les associations réponse-récompense (Everitt et Wolf 2002). Cette structure, composée principalement de neurones épineux moyens (MSN), est divisée en *core* et *shell* sur la base des différentes afférences de chaque partie. Le CPF est la zone de contrôle exécutif où sont évaluées la valeur motivationnelle d'un stimulus et l'intensité de la réponse comportementale (Schoenbaum et Roesch 2005). Ces trois structures, à la base de l'axe mésocorticolimbique, interagissent avec l'hippocampe et l'amygdale -qui traitent les signaux environnementaux associés aux drogues- mais également avec les structures qui régissent les commandes motrices (striatum, pallidum) (Everitt et Wolf 2002).

Toutes ces structures sont interconnectées et reçoivent également des afférences de différentes structures extrinsèques au système. Ainsi, l'ATV reçoit des afférences inhibitrices des neurones épineux moyens (MSN) du *core* et du *shell* du NAc. et du noyau

pedonculopontin. Les afférences venant du *core* du NAc. passent par un relai au niveau du pallidum ventral (PV). Les afférences excitatrices viennent du CPF, de l'amygdale, du noyau du lit de la strie terminale et du noyau pedonculopontin (Références sur la [Figure 5](#)).

Globalement, le NAc. a un effet excitateur sur l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV. En effet, les MSN projettent sur les interneurons GABA de l'ATV mais aussi sur les neurones dopaminergiques directement (Maeda et Mogenson 1980). Or les interneurons exercent un contrôle inhibiteur sur les neurones dopaminergiques de l'ATV (Johnson et North 1992) et ils sont plus sensibles au GABA venant du NAc. que les neurones dopaminergiques (Cruz et al. 2004). Toute libération de GABA venant du NAc. lève donc l'inhibition des interneurons sur les neurones dopaminergiques de l'ATV.

En ce qui concerne les entrées excitatrices sur l'ATV, la stimulation du CPF induit une augmentation de l'activité en bouffée des neurones dopaminergiques de l'ATV ainsi que la libération de DA dans le NAc. (Gariano et Groves 1988; Murase et al. 1993). Réciproquement, inhiber l'activité du CPF diminue ce type d'activité (Svensson et Tung 1989; Murase et al. 1993; Overton et Clark 1997). Ces résultats suggèrent que le CPF exerce un contrôle important sur les neurones dopaminergiques de l'ATV (Overton et Clark 1997).

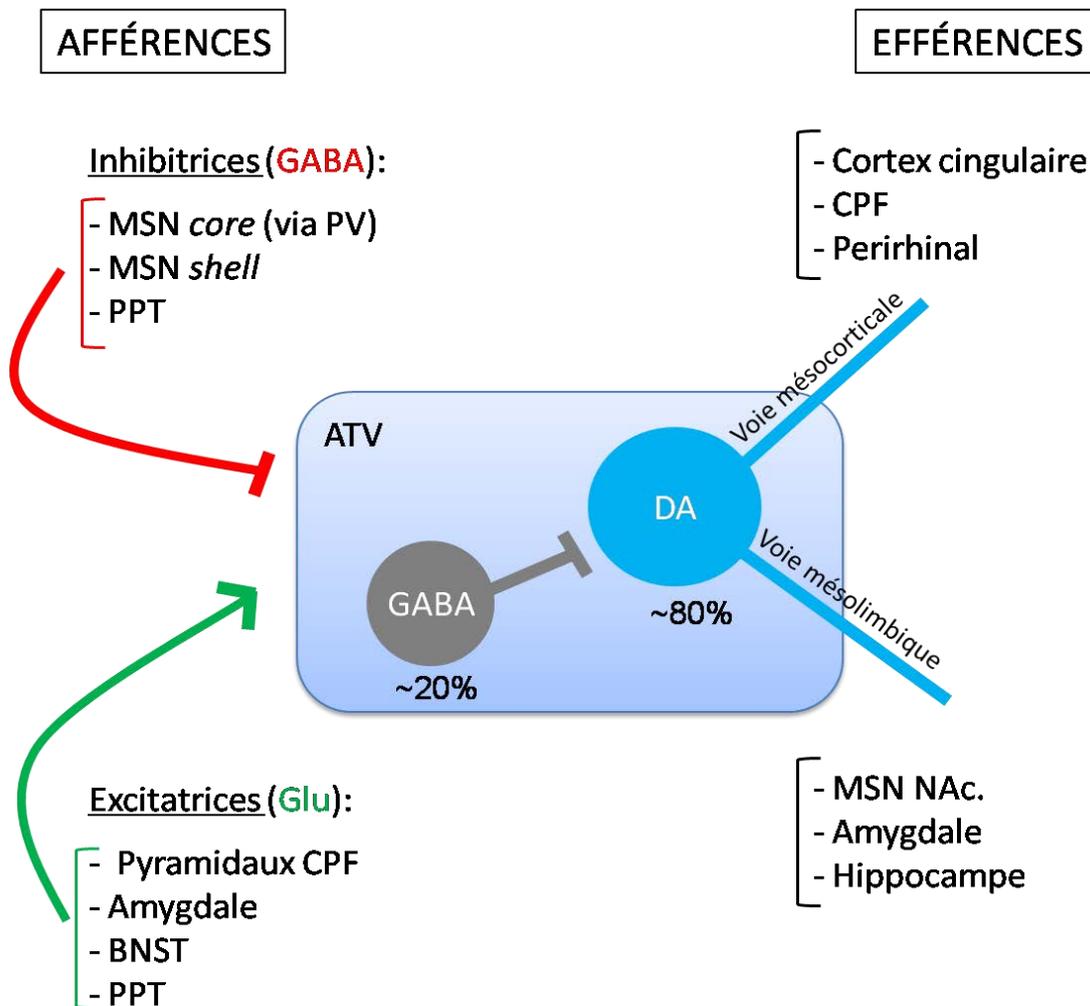


Figure 5 : Principales afférences et efférences inhibitrices et activatrices de l'aire tegmentale ventrale (ATV).

BNST : Noyau du lit de la strie terminale CPF : Cortex préfrontal ; DA : Dopamine ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; MSN : Neurones épineux moyens ; NAc. : Noyau accumbens ; PPT : Noyau pedonculo-pontin du tegmentum ; PV : pallidum ventral

Informations extraites de (Kalivas 1993; Walaas et Fonnum 1980; Heimer et al. 1991; Charara, Smith, et Parent 1996; Jalabert et al. 2009; Berendse, Graaf, et Groenewegen 1992)

Le NAc, autre structure cruciale de la voie mésolimbique, est un relai de la boucle limbique (cortex-ganglions de la base-thalamus-cortex). Cette boucle est considérée comme le substrat cérébral de la motivation, celui qui transforme la réponse affective en activité motrice adaptée (Eustache, Viader, et Lechevalier 2008). L'ATV, l'hippocampe, l'amygdale et le CPF projettent tous sur le NAc. et régulent l'activité des MSN (Figure 6). Les MSN du shell projettent notamment sur l'ATV, en constituant donc une boucle de rétrocontrôle inhibiteur de la libération de DA.

Une fois libérée, la DA se fixe sur des récepteurs métabotropiques divisés en 2 grands groupes : les récepteurs de type D1 (D_{1like}), comprenant les récepteurs D_1 et D_5 , et les récepteurs de type D2 (D_{2like}) qui incluent les récepteurs D_2 , D_3 et D_4 (Missale et al. 1998). Les récepteurs D_{1like} sont excitateurs, leur liaison au ligand active l'adénylyl cyclase via la protéine G_s . Ces récepteurs ne s'expriment que sur les fibres post-synaptiques (Smiley et al. 1994). A l'inverse, l'activation des récepteurs D_{2like} inhibe l'adénylyl cyclase via la protéine G_i/o et hyperpolarise le neurone. Outre leur fonction post-synaptique, les récepteurs D_2 et D_3 sont également localisés sur les neurones dopaminergiques et inhibent leur activité. Au niveau de la fente synaptique, le processus majoritaire d'élimination de la DA est sa recapture par le transporteur de la DA (DAT), qui régule donc la transmission dopaminergique en recyclant la DA dans le neurone pré-synaptique (Kilty, Lorang, et Amara 1991). La dégradation enzymatique de la DA recaptée passe par les enzymes catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et monoamine oxydase (MAO).

La transmission dopaminergique est donc au cœur du circuit de la récompense. Ce circuit, mis en évidence par l'auto-stimulation chez les rats (Olds et Milner 1954) bien avant que la présence de dopamine ait été démontrée dans le système nerveux central (Bertler et Rosengren 1959; Carlsson 1959; Dahlström et Fuxe 1964), permet de favoriser les comportements bénéfiques à la survie de l'espèce, comme se nourrir ou se reproduire. Proposé comme le substrat biologique de l'hypothèse du renforcement positif, une multitude d'études se sont concentrées sur le mécanisme par lequel les drogues activent ce circuit. Ainsi, il a été montré que des injections d'halopéridol, un antipsychotique antagoniste des récepteurs D_{2like} , directement dans le NAc., bloque l'expression de la sensibilisation comportementale à l'amphétamine (Pijnenburg, Honig, et Van Rossum 1975). En accord avec ces résultats, l'activation locomotrice induite par l'amphétamine et la cocaïne est bloquée lors d'une lésion du NAc avec de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA)

(Kelly, Seviour, et Iversen 1975). Cet effet semble être spécifique de la transmission dopaminergique dans le NAc., puisque la même lésion dans le striatum dorsal n'a pas de conséquence sur les effets locomoteurs de l'amphétamine (Kelly, Seviour, et Iversen 1975; Kelly et Iversen 1976).

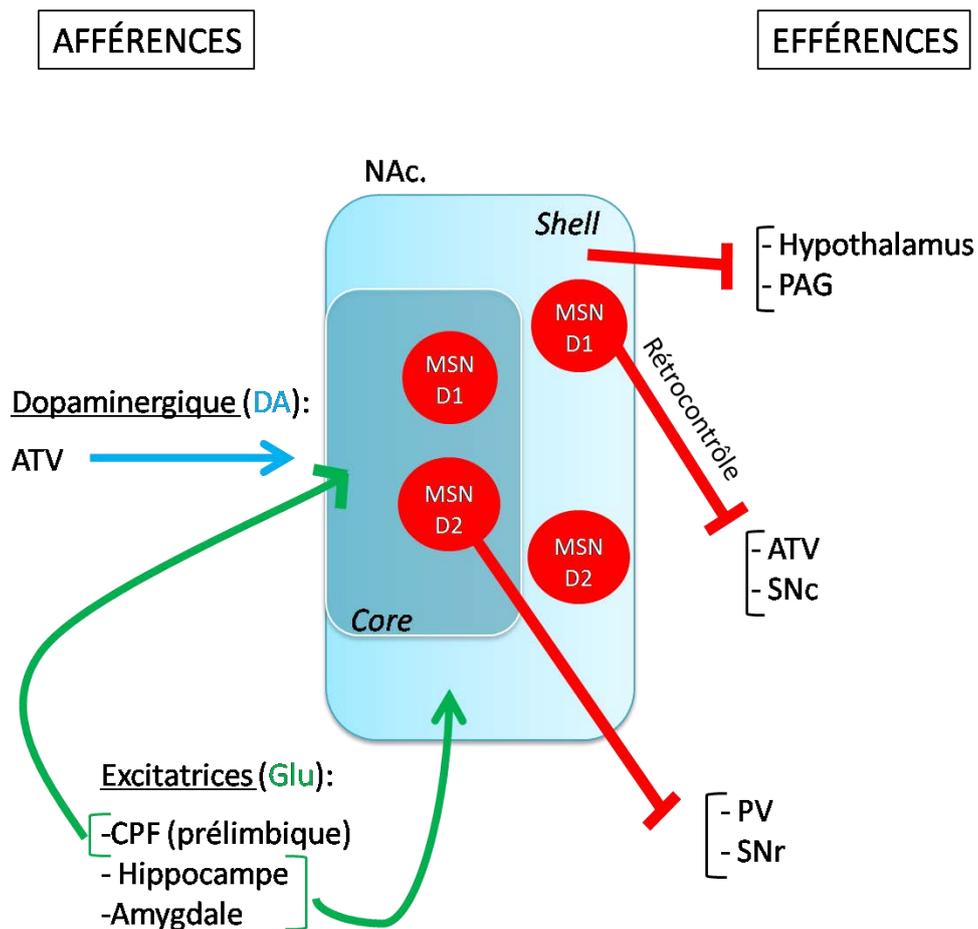


Figure 6 : Principales afférences et efférences inhibitrices et activatrices du noyau accumbens (NAc).

ATV : Aire tegmentale Ventrale ; CPF : Cortex préfrontal ; DA : Dopamine ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; MSN : Neurones épineux moyens (Medium Spiny Neurons) ; PAG : Substance Grise Périaqueducale ; PV : pallidum ventral ; SNc : Substance Noire Compacte ; SNr : Substance Noire Réticulée

Informations extraites de (Brog et al. 1993; Zahm et Brog 1992)

Concernant l'auto-administration de drogues, de faibles doses d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques de type D₂ injectés en systémique augmentent l'auto-administration d'amphétamine et de cocaïne (mais pas d'héroïne) chez les rats (Yokel et Wise 1975; Ettenberg et al. 1982). Ces résultats suggèrent que le blocage partiel de ces récepteurs induit une diminution de l'effet récompensant de ces drogues. De plus, la lésion dopaminergique du NAc. prévient toute acquisition d'auto-administration d'amphétamine (Lyness, Friedle, et Moore 1979). La transmission dopaminergique semble aussi jouer un rôle dans le maintien de l'auto-administration, puisque une lésion des neurones dopaminergiques avec la 6-OH-DA injectée localement dans le NAc. fait disparaître l'auto-administration de cocaïne (Roberts et al. 1980) et d'amphétamine (Lyness, Friedle, et Moore 1979), pourtant acquise avant la lésion.

Au-delà du rôle de la transmission dopaminergique dans les comportements opérants, une multitude de changements transcriptionnels et épigénétiques ont été observés dans les neurones à DA (Robison et Nestler 2011). Un des facteurs de transcription les plus étudiés dans le domaine est Δ FOSB, une forme tronquée de FOSB généré par épissage alternatif et appartenant à la famille des facteurs de transcription FOS. Il a été montré qu'une injection aiguë de psychostimulants induit l'expression de toutes les protéines de la famille FOS (Graybiel, Moratalla, et Robertson 1990; Young, Porrino, et Iadarola 1991), cependant l'administration chronique induit l'expression spécifique de Δ FOSB, dans le NAc et dans le striatum dorsal entre autres régions (Perrotti et al. 2008). De plus, la surexpression de Δ FOSB spécifiquement dans les MSN exprimant le récepteur D₁ dans le striatum ventral et dorsal induit une réponse locomotrice et une préférence de place augmentée pour la cocaïne et la morphine (Kelz et al. 1999; Zachariou et al. 2006), ainsi qu'une augmentation de l'auto-administration de cocaïne (Colby et al. 2003). Ces résultats contrastent avec les tests menés sur les souris qui n'expriment plus le gène fosB (et donc aucune protéine dérivée de ce gène, dont Δ FOSB), et qui présentent une hyperlocomotion induite par une injection aiguë de cocaïne ainsi qu'une préférence de place conditionnée à de plus faibles doses de cocaïne que les contrôles non mutés (Hiroi et al. 1997). Quoi qu'il en soit, Δ FOSB apparaît comme une cible directe des drogues, mais aussi des récompenses naturelles, puisque son expression est également induite dans les MSN du NAc. après la consommation de sucre et après une récompense sexuelle (Wallace et al. 2008). Récemment, un travail a mis en évidence que l'induction de Δ FOSB au niveau de l'aire prélimbique du CPF est impliquée dans la susceptibilité au stress (Vialou et al. 2014), ce qui

est intéressant si on considère le contrôle du CPF sur les transmissions monoaminergiques ainsi que l'effet du stress sur les comportements addictifs.

Parmi les gènes régulés par Δ FOSB, on distingue ceux qui interviennent dans l'architecture des épines dendritiques et qui assurent leur plasticité structurelle observée dans le NAc après des injections de cocaïne (Maze et al. 2010; Russo et al. 2010). D'autres facteurs de transcription comme CREB (Cyclic AMP (cAMP)-responsive element binding protein) ou NF- κ B sont également étudiés à cause de leur influence sur les neurones DA. Ainsi, l'activité de CREB a directement été liée à l'activité fonctionnelle des neurones MSN du NAc.: l'excitabilité des MSN augmente avec la surexpression de CREB et diminue avec le dominant négatif (Dong et al. 2006). NF- κ B est quant à lui été associé à la plasticité synaptique et la mémoire (Meffert et al. 2003). Tous ces changements dans les facteurs de transcription sont intéressants car ils traduisent des changements à long terme, qui pourraient être impliqués dans la longue sensibilité des toxicomanes vis-à-vis des drogues, et ce pendant de très longues périodes.

Simultanément à ces changements transcriptionnels, le rôle des protéines ERK (Extracellular signal-regulated kinases), appartenant à la grande famille des MAP (Mitogen-activated protein) protéines kinases, a aussi été mis en évidence. Ainsi, diminuer l'activation de ERK avant chaque injection d'amphétamine ou de cocaïne abroge complètement la sensibilisation comportementale à ces drogues (Valjent et al. 2006), ce qui suggère le rôle essentiel de ERK pour l'acquisition de la sensibilisation.

Une autre voie prometteuse concernant les modifications à long-terme induites par les drogues est la plasticité synaptique des neurones dopaminergiques (Thomas, Kalivas, et Shaham 2008). On observe en effet une multitude de changements intracellulaires qui induisent la potentialisation à long terme (LTP) ou au contraire la dépression à long terme (LTD), permettant de réguler la force de l'activation synaptique. Ainsi, une injection de cocaïne induit une augmentation de l'expression de récepteurs AMPA (LTP) dans les neurones dopaminergiques de l'ATV (Ungless et al. 2001). Cette modification synaptique serait la première étape permettant une plasticité plus importante, basée sur une réduction des récepteurs NMDA et une insertion de récepteurs AMPA n'exprimant pas la sous-unité GluA2 (Mameli et al. 2011). L'arrivée glutamatergique excitatrice semble donc être une cible des drogues et ce aussi bien au niveau de l'ATV, que du CPF et du NAc. (Lüscher et Malenka 2011).

A ces résultats s'ajoute un des articles de référence concernant la dopamine et les drogues : toutes les drogues (opiacés, éthanol, nicotine, amphétamine et cocaïne) induisent une libération de DA dans le NAc. (Di Chiara et Imperato 1988). La potentialisation de la libération de DA lors de la sensibilisation est controversée, puisque certains auteurs l'observent, particulièrement dans le *shell* du NAc. (Pierce et Kalivas 1995), tandis que d'autres ne mesurent pas de sensibilisation neurochimique dopaminergique corrélée au comportement (Segal et Kuczenski 1992).

Suite à la persistance de l'auto-administration de cocaïne chez les souris n'exprimant pas le transporteur de la dopamine (DAT-KO) (Rocha et al. 1998), l'hypothèse dopaminergique selon laquelle les effets récompensants des psychostimulants reposent majoritairement sur le blocage du DAT a été reconsidérée. Les progrès techniques ont permis, 8 ans plus tard, de créer une lignée de souris dont le DAT est insensible au blocage par la cocaïne (Chen 2006). Ces souris, nommées DAT-CI pour « cocaïne-insensitive DAT », présentent une expression ainsi qu'une activité du DAT très proche de celle des souris contrôles, mais l'injection de cocaïne n'induit plus de libération dopaminergique dans le NAc., ni de préférence de place conditionnée. Les DAT-CI ne présentent pas non plus de réponse locomotrice à une injection aiguë de cocaïne, même à des doses très fortes (40mg/kg). Ces résultats suggèrent que l'effet récompensant de la cocaïne repose bien sur la capacité de la drogue à élever la libération de DA dans le NAc. en bloquant le DAT. Afin de vérifier la spécificité de l'insensibilité à la cocaïne chez ses animaux, les auteurs ont également testé la réponse à l'amphétamine. La libération de DA dans le NAc. induite par une injection d'amphétamine est divisée par deux chez les souris DAT-CI par rapport aux contrôles. Cette réponse diminuée est également observée en locomotion, où seule une forte dose d'amphétamine induit une hyperlocomotion. Or, la libération de DA dans le NAc. induite par l'amphétamine ainsi que l'hyperactivité locomotrice sont directement dépendantes de l'activation noradrénergique. En effet, on n'observe ni la libération de DA ni d'hyperlocomotion chez les souris qui n'expriment plus de récepteur $\alpha 1b$ -adrénergique ($\alpha 1b$ -KO) (Auclair et al. 2002). L'ensemble de ces résultats indiquent donc que l'activation noradrénergique est indispensable à l'obtention d'une réponse locomotrice mais qu'elle n'est pas suffisante dans la mesure où elle ne peut avoir d'effet qu'à condition qu'il y ait un blocage de la recapture de DA.

Toutes ces données soulignent l'importance de la transmission dopaminergique dans la réponse aux drogues et peuvent laisser penser que tout produit qui induit une libération de DA dans le NAc a un potentiel toxicomanigène (Balland et Lüscher 2009). Cependant,

plusieurs résultats s'opposent à cette idée. En effet, une étude montre que des conditions provoquant du stress et de l'aversion (chocs électrique au niveau des pattes, stress de contention, pincement de la queue,...) induisent également une libération de DA dans le NAc et dans le CPF (Salamone 1994). Il n'est donc pas exact d'assimiler l'activité des neurones dopaminergiques uniquement avec des effets récompensants ou de plaisir. Concernant le modèle de la sensibilisation comportementale, plusieurs résultats suggèrent que la relation entre le système dopaminergique et noradrénergique serait décisive dans la réponse locomotrice aux drogues. Le premier indice provient d'une observation simple et pourtant régulièrement négligée : toutes les drogues ont un effet pharmacologique qui n'est pas spécifique du système dopaminergique. L'amphétamine et la cocaïne bloquent les transporteurs de la DA, certes, mais aussi de la noradrénaline (NA) et, avec moins d'affinité, celui de la sérotonine (5-HT) (Balster et Schuster 1973; Crespi, Mennini, et Gobbi 1997). Les opiacés activent les récepteurs opioïdes exprimés sur les neurones GABAergiques qui entourent les neurones dopaminergiques de l'ATV, mais sont aussi localisés sur les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (LC) et les neurones sérotoninergiques des raphés dorsal (RD) et médian (RM) (Khachaturian et Watson 1982). Enfin, l'alcool, qui a de nombreux effets sur les cellules, augmente la concentration de toutes les monoamines (DA, NA et 5-HT) en inhibant les enzymes responsables de leur dégradation, les monoamines oxydases (MAO) (Griffiths et al. 1973). Il est donc logique de penser que, outre leurs effets sur le système dopaminergique, les drogues modifient également les systèmes noradrénergique et sérotoninergique.

Un autre résultat qui encourage l'existence d'un lien entre les systèmes dopaminergique et noradrénergique est celui du « syndrome de l'ATV ». Ce phénotype comportemental, induit par la lésion des neurones dopaminergiques de l'ATV, se caractérise notamment par une hyper-réactivité nocturne basale et par la perte de l'alternance spontanée, c'est-à-dire le comportement inné qu'a l'animal à choisir successivement un chemin vers la droite puis vers la gauche et ainsi de suite (Le Moal et al. 1977). De manière intéressante, ces troubles sont totalement prévenus par une lésion des fibres noradrénergiques couplée à la lésion de l'ATV (Taghzouti et al. 1988). Ce résultat présage de l'interaction des neurones dopaminergiques de l'ATV avec les neurones noradrénergiques, interaction confirmée en partie par un travail prouvant que la transmission noradrénergique inhibe la décharge en bouffée des neurones dopaminergiques de l'ATV via l'activation des récepteurs post-synaptiques α_{1B} -adrénergiques (Grenhoff et Svensson 1993). Concernant les drogues, une étude nord-américaine a conclu que le récepteur dopaminergique D_1 est indispensable à

l'induction de la sensibilisation comportementale à l'amphétamine (Vezina 1996), puisque l'injection de SCH23390, un antagoniste de ce récepteur, bloque cette induction. Cependant, comme il sera développé dans la partie consacrée à la transmission sérotoninergique, il semble que l'effet du SCH23390 passe par l'activation des récepteurs 5-HT_{2C} (Ramos, Goni-Allo, et Aguirre 2005; Lanteri et al. 2008).

Ces résultats soutiennent la notion qu'il existe un vrai dialogue entre les transmissions dopaminergique, noradrénergique et sérotoninergique et que ces interactions ont un rôle dans la réponse aux drogues.

La transmission dopaminergique occupe un rôle clé dans les théories neurobiologiques qui tentent d'expliquer l'addiction, et une importante part de la littérature soutient cette idée. Nous avons présenté ici, de manière non exhaustive, certains des changements et des mécanismes sous-tendus par ce système, surtout au niveau de l'ATV. Néanmoins, l'implication, que certains considèrent comme exclusive, de la dopamine dans les processus addictifs détonne avec les résultats qui montrent une interaction entre la noradrénaline et la dopamine. Une partie de ce travail de thèse (Publication n°2) étudie les modifications du système de rétrocontrôle noradrénergique après des injections répétées d'amphétamine.

Au-delà de leur ressemblance de structure chimique, les deux catécholamines, dopamine et noradrénaline, semblent aussi partager un rôle dans la réponse aux drogues. Etudions de plus près la transmission noradrénergique et les altérations de celle-ci après l'exposition aux drogues.

4. Système noradrénergique

Le précurseur direct de la noradrénaline (NA) est la dopamine (DA). La synthèse commence donc par la L-tyrosine transformée en DOPA puis dopamine. L'enzyme dopamine- β -hydroxylase (DBH) catalyse l'étape supplémentaire pour obtenir la noradrénaline et n'est localisée que dans les neurones noradrénergiques (et adrénergiques). L'enzyme limitante de cette synthèse reste la tyrosine hydroxylase (TH) (Glowinski et Baldessarini 1966).

Il existe, dans le SNC, 7 noyaux producteurs de NA (A1 à A7, [Figure 7](#)) qui assurent une large distribution de ce neurotransmetteur dans la plupart des structures du cerveau (Dahlström

et Fuxe 1964; Swanson et Hartman 1975). Les noyaux A1 et A2 situés au niveau du bulbe rachidien projettent dans l'hypothalamus, le thalamus, l'amygdale, le septum et le cortex piriforme (Mason et Fibiger 1979; Loughlin, Foote, et Grzanna 1986). Ces projections constituent le faisceau ventral. Le faisceau dorsal regroupe les projections noradrénergiques partant du locus coeruleus (LC) ou noyau A6 et du noyau A4, qui est une extension latérale du LC. Ce faisceau dorsal innerve quasiment la totalité du SNC (dont les noyaux du raphé, le thalamus, l'hippocampe, le cervelet) à l'exception du striatum et du globus pallidus, et constituent l'unique source de NA du cortex (Jones et al. 1977; Berridge et Waterhouse 2003; Smith et Greene 2012). Comme les mesures de libération de NA réalisées dans cette étude sont effectuées dans le CPF, nous allons nous concentrer ici sur le noyau A6, locus coeruleus principal, qui n'est constitué que d'environ 1300 cellules chez la souris (Kato 1982).

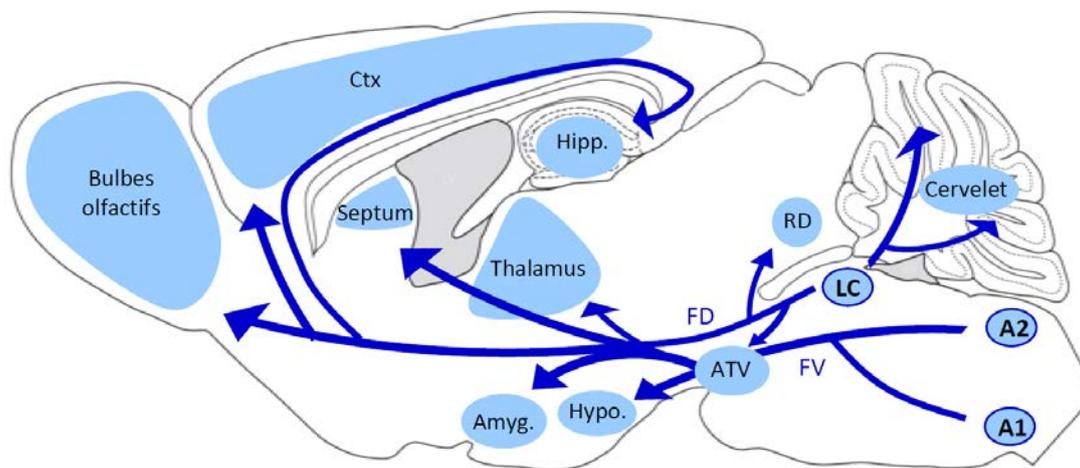


Figure 7 : Faisceaux ventral et dorsal chez la souris

Amyg. : amygdale ; Ctx : cortex ; FD : faisceau dorsal ; FV : faisceau ventral ; Hipp. : hippocampe ; Hypo : hypothalamus ; LC : locus coeruleus ; RD : raphé dorsal

Les neurones noradrénergiques du LC présentent une décharge lente (0-5Hz) et spontanée (Williams et al. 1984; Foote, Bloom, et Aston-Jones 1983), même en absence d'afférences. Cette activité « pacemaker » est générée par des propriétés intrinsèques de la membrane des neurones noradrénergiques du LC qui impliquent des conductances potassiques calcium-dépendantes (Andrade et Aghajanian 1984).

Une fois libérée dans les structures cibles décrites ci-dessus, la noradrénaline se fixe sur les récepteurs noradrénergiques métabotropiques, classés en 3 familles : les récepteurs α_1 , α_2 et β -adrénergiques (Bylund et al. 1994). Les différents types de récepteurs ont été définis en fonction de leurs affinités pour plusieurs ligands spécifiques. Leur localisation, les protéines intracellulaires couplées aux récepteurs ainsi que les effets auxquels ils participent sont décrits dans le [Tableau 4](#).

Précisons la fonction des récepteurs α_{2A} -adrénergiques, qui ont constitué une partie importante de ce travail (publication n°2). Ces récepteurs représentent environ 90% des récepteurs α_2 -adrénergiques du cerveau de souris (Bücheler, Hadamek, et Hein 2002) et ont un rôle clé dans le contrôle de l'activité noradrénergique. Ils sont l'équivalent des récepteurs D_2 dopaminergiques pré-synaptiques, soit des autorécepteurs qui exercent un rétrocontrôle inhibiteur. Lorsque la NA se fixe aux autorécepteurs exprimés au niveau des dendrites noradrénergiques du LC (Nörenberg et al. 1997), la protéine $G_{\alpha i/o}$ couplée au récepteur se scinde en deux parties. La sous-partie G_α inhibe l'adénylyl cyclase (AD) ce qui diminue l'AMP cyclique (AMPC) et inhibe la protéine kinase A (PKA). Les deux autres sous-parties G_β et G_γ inhibent les canaux calciques et activent les canaux potassiques, ce qui entraîne l'hyperpolarisation de la cellule (Aghajanian et VanderMaelen 1982). L'activation de ces récepteurs par la clonidine, un agoniste α_2 -adrénergique, induit ainsi une inhibition des neurones noradrénergiques (Svensson, Bunney, et Aghajanian 1975).

Après la libération de NA dans la synapse, l'arrêt du signal est assuré par la recapture via le transporteur de la NA, le NET (Bönisch et Brüss 2006) et par la dégradation du neurotransmetteur par la monoamine oxydase A (MAO-A) (Dostert, Strolin Benedetti, et Tipton 1989). Une autre enzyme, la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) est recrutée pour métaboliser la NA lorsque les concentrations de celle-ci sont très élevées (Huotari et al. 2002).

Famille	Récepteur	Localisation synaptique	Couplage et 2d messagers	Localisation dans le SNC	Implication
α_1	α_{1A}	Post-synaptique	Gq/G ₁₁ +PLC \uparrow IP3 (\uparrow Ca ²⁺) \uparrow DAG (+ PKC)	Cortex, hippocampe, bulbes olfactifs, hypothalamus, amygdale, noyaux du raphé, moelle épinière,...	Contrôle moteur, apprentissage, mémoire, peur, réponse motrice aux drogues
	α_{1B} (80% des récepteurs α_1)			Cortex, amygdale, BNST, thalamus, hypothalamus, noyaux du raphé, PGI, cervelet, moelle épinière	
	α_{1D}			Bulbe olfactif, cortex, hippocampe, amygdale, tronc cérébral, moelle épinière,...	
α_2	$\alpha_{2A/D}$ (α_{2D} homologue α_{2A} chez rat, 90% des récepteurs α_2)	Pré et post-synaptique	G α i/Go G α (\downarrow AMPC -PKA) G β G γ ($+I_k -I_{Ca^{2+}}$)	LC, cortex, bulbes olfactifs, hypothalamus, hippocampe, cervelet, septum	Analgésie, hypothermie, sédation, contrôle de l'activité NA
	α_{2B}			Thalamus, cortex, hypothalamus, cervelet	
	α_{2C}			Ganglions de la base, hippocampe, cortex, cervelet, LC, ATV	
β	$\beta_{1/4}$ (β_4 conformation spécifique de β_1)	Pré-synaptique	G s \uparrow AMPC + PKA	Cortex, hippocampe, thalamus	Facilite la libération de NA dans hypothalamus et hippocampe, pathologies cardiaques et stress (β -bloquants)
	β_2	Post-synaptique		Thalamus, cervelet	
	β_3	Post-synaptique		Cortex, hypothalamus	

Tableau 4 : Classification des récepteurs noradrénergiques et principales caractéristiques. BNST : noyau du lit de la strie terminale; Ca²⁺ : calcium; DAG: diacylglycérol; I_k : courant potassique ; I_{Ca2+} : courant calcique; IP3 : inositol-triphosphate; PGI : noyau paragigantocellulaire; PKC: protéine kinase C; PLC : phospholipase C
Informations extraites de (Bylund 1992; Nicholas, Pieribone, et Hökfelt 1993; Bylund et al. 1994; Scheinin et al. 1994; Sofuoglu et Sewell 2009; Murugaiyah et O'Donnell 1995; Rosin et al. 1996; Talley et al. 1996; Docherty 1998; Starke 2001; Granneman 2001; Tanoue et al. 2003; Papay et al. 2004; Papay et al. 2006; Ramos et Arnsten 2007).

A la fin des années 80, Aston-Jones et ses collaborateurs ont amplement étudié les afférences du LC (**Figure 8**). Leurs conclusions répertorient seulement deux structures qui projettent directement sur ce noyau (Aston-Jones et al. 1986b) : les neurones glutamatergiques excitateurs du noyau paragigantocellulaire (PGi) (Ennis et Aston-Jones 1988) et les neurones GABAergiques inhibiteurs du noyau prepositus hypoglossus (PH) (Ennis et Aston-Jones 1989). Néanmoins, l'étude détaillée des segments neuronaux définit deux régions péricoerulaires (peri-LC) où l'on détecte des dendrites des neurones du LC (Shipley et al. 1996). C'est sur ces dendrites que projettent des structures supplémentaires comme l'hypothalamus (Peyron et al. 1998), l'amygdale (Van Bockstaele, Chan, et Pickel 1996), les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal (Pickel, Joh, et Reis 1977; Lu et al. 2012) ou le CPF (Lu et al. 2012). Aussi, des travaux ont mis en évidence le contrôle du cortex frontal sur les neurones noradrénergiques du LC. La nature de cette influence reste discutée, puisque certains auteurs montrent un rôle inhibiteur, le blocage de l'activité corticale entraînant une augmentation significative de l'activité des neurones noradrénergiques (Sara et Hervé-Minvielle 1995), tandis que d'autres montrent un contrôle cortical excitateur et tonique (Jodo, Chiang, et Aston-Jones 1998).

Il est important de souligner qu'en plus des deux contrôles excitateurs et inhibiteurs venant du PGi et du PH, respectivement, les neurones noradrénergiques du LC expriment les récepteurs μ -opioïdes (Pert, Kuhar, et Snyder 1976) et reçoivent des afférences enképhalinergiques (Drolet, Bockstaele, et Aston-Jones 1992; Pickel et al. 1979). Lorsque les récepteurs opioïdes sont activés, ils inhibent l'activité des neurones noradrénergiques via l'activation de la cascade intracellulaire Gi/o. Les interneurones GABAergiques exercent un contrôle inhibiteur tonique supplémentaire, puisque l'infusion d'un agoniste GABAA à proximité du LC diminuent la libération de NA (Kawahara, Kawahara, et Westerink 1999).

Du fait de l'étendue de ses projections dans tout le SNC, le système noradrénergique a rapidement été soupçonné d'avoir des rôles nombreux et variés dans la modulation des systèmes effecteurs. Progressivement, les chercheurs ont montré un rôle important de la noradrénaline dans l'attention sélective, l'éveil et les réactions de stress face à des environnements contraignants, la plasticité synaptique, l'apprentissage, la mémoire (Susan J. Sara 2009; Weinshenker et Schroeder 2007) mais aussi la réponse aux changements environnementaux, puisqu'une stimulation sensorielle nouvelle induit une augmentation de l'activité des neurones noradrénergiques tandis que sa répétition entraîne une rapide habituation qui inhibe l'activité des ces neurones (Hervé-Minvielle et Sara 1995).

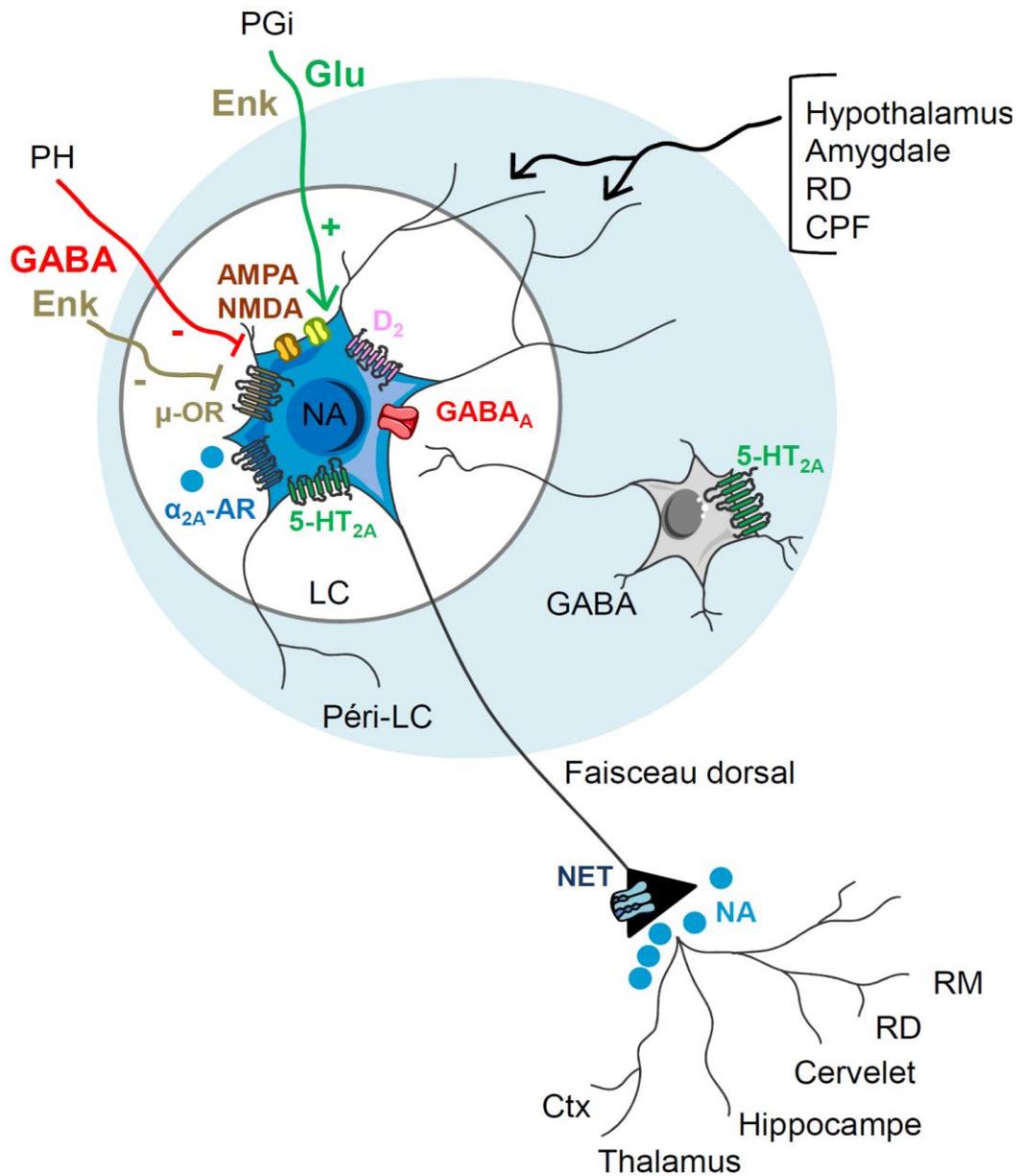


Figure 8 : Principales afférences et efférences inhibitrices et activatrices du locus coeruleus et de la région péricoeruleaire (Péri-LC, zone bleutée)

μ -OR : récepteur μ -opioïde ; CPF : Cortex préfrontal ; Ctx : cortex ; Enk : enképhaline ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; Glu : glutamate ; LC : locus coeruleus ; NET : transporteur de la NA ; PGi : noyau paragigantocellulaire ; PH : noyau prepositus hypoglossus ; RD : raphé dorsal ; RM : raphé médian

La NA et la DA ont toutes deux temporairement été considérées comme les neuromédiateurs importants dans la réponse aux drogues, avant l'essor de la théorie dopaminergique. Cette idée se basait sur plusieurs résultats expérimentaux, lorsque les techniques ne permettaient pas une différenciation claire entre les deux catécholamines (Fibiger et Phillips 1974). Néanmoins, similairement aux centres dopaminergiques, on observe une auto-stimulation intra-crânienne lors du placement d'électrodes dans le LC et les faisceaux dorsal et ventral (Dresse 1966; Crow, Spear, et Arbuthnott 1972; Ritter et Stein 1974), comportement que certains auteurs n'ont pas reproduit dans le LC (Amaral et Routtenberg 1975). Cette auto-stimulation intra-crânienne au niveau des centres noradrénergiques suggère que ces noyaux appartiennent aux réseaux neuronaux spécialisés dans la récompense (Wise 1978). De plus, l'inhibition de la DBH, enzyme qui synthétise spécifiquement la NA, réduit la prise orale volontaire de morphine (Brown et al. 1978). Précisément, en ce qui concerne les opioïdes, Nestler et ses collaborateurs ont montré une adaptation à long terme des neurones noradrénergiques du LC (Nestler, Alreja, et Aghajanian 1994). Injectés en aigu, les opioïdes inhibent les neurones du LC en activant des canaux potassiques et en inhibant des courants entrants dépendants du sodium. À l'inverse, des injections chroniques induisent une augmentation stable de l'activité de toute la voie AMPcyclique (AD, PKA). Cette compensation semble avoir un rôle dans la tolérance, la dépendance et le sevrage aux opiacés. En effet, traiter les héroïnomanes avec la clonidine (catapresan®), l'agoniste des récepteurs α_2 qui inhibe l'activité noradrénergique en se fixant aux autorécepteurs α_{2A} , soulage les symptômes de sevrage physique et contribue ainsi à éviter la rechute (Gold, Redmond, et Kleber 1978).

Le système noradrénergique semble également avoir un rôle distinct de la DA dans la réponse à l'alcool. Ainsi, de faibles doses d'éthanol diminuent l'amplitude de l'activité noradrénergique en réponse à des stimuli sensoriels (Aston-Jones, Foote, et Bloom 1982) et l'inhibition de la DBH réprime la prise orale volontaire d'alcool (Brown et al. 1977), tandis que la lésion du système dopaminergique mésolimbique ne modifie pas ce comportement (Kiianmaa, Andersson, et Fuxe 1979; Rassnick, Stinus, et Koob 1993).

Au-delà de l'éternelle opposition entre le système noradrénergique et dopaminergique, quelques auteurs s'accordent aujourd'hui sur l'existence de connexions réciproques anatomiques et fonctionnelles entre ces deux systèmes (Sara 2009; Weinschenker et Schroeder 2007). Ainsi, les faisceaux dorsal et ventral projettent tous deux sur l'ATV (Simon et al. 1979; Liprando et al. 2004), qui projette à son tour vers le LC (Ornstein et al. 1987; Swanson 1982). De façon intéressante, des fibres contenant de la DBH ont été observées

dans le *shell* du NAc, ce qui suggère une afférence noradrénergique sur les MSN (Berridge et al. 1997). Des études complémentaires ont montré que ces fibres proviennent du noyau A2 du noyau du tractus solitaire (NTS), et non pas du LC (Delfs et al. 1998). Avant même d'avoir décelé ces fibres, des chercheurs suédois ont montré que l'application de fortes doses de NA au niveau du NAc. induit une activité ambulatoire chez le rat éveillé (Svensson et Ahlenius 1982).

Au niveau fonctionnel, de nombreux travaux montrent l'influence noradrénergique sur l'activité dopaminergique, tant au niveau de l'activité neuronale que de la libération de DA. En effet, stimuler les neurones du LC entraîne une décharge en bouffées des neurones dopaminergiques de l'ATV qui passe par les récepteurs α_{1B} -adrénergiques (Grenhoff et al. 1993; Grenhoff et Svensson 1993). Inversement, la lésion des fibres noradrénergiques entraîne une diminution de l'activité des neurones dopaminergiques, mesurée par le ratio DOPAC/DA, dans le CPF ainsi qu'une augmentation de la densité de l'innervation dopaminergique dans le cortex, ce qui suggère un développement anormal de ces afférences (Tassin et al. 1979; Herve et al. 1982). Ce type de lésion provoque également une diminution de la libération dopaminergique dans les noyaux caudé et accumbens (Lategan, Marien, et Colpaert 1992). Le contrôle noradrénergique sur la libération de DA au niveau limbique est d'autant plus important que cette réponse dopaminergique est considérée comme clé dans la réponse aux drogues, comme nous l'avons décrit dans la partie précédente.

Malgré l'existence de liens directs entre le LC et l'ATV, dont les projections libèrent la DA dans le NAc., il semble que le passage de la NA par le cortex soit essentiel dans le contrôle noradrénergique de la DA. En effet, après une lésion sélective de la NA corticale, on n'observe plus de préférence de place conditionnée à la morphine ni de libération de DA dans le NAc induite par la morphine ou l'amphétamine (Ventura et al. 2003; Ventura, Alcaro, et Puglisi-Allegra 2005). De plus, l'activation des récepteurs α_{1B} -adrénergiques du CPF induit une activation des neurones pyramidaux de la couche V du cortex qui passe vraisemblablement par une libération de glutamate (Marek et Aghajanian 1999), activation importante au regard du contrôle cortical des neurones dopaminergiques de l'ATV mentionné précédemment. Les souris n'exprimant plus le gène codant pour les récepteurs α_{1B} -adrénergiques (α_{1B} -KO) ne présentent d'ailleurs plus ni l'hyperactivité induite par l'amphétamine, la cocaïne ou la morphine, ni les propriétés récompensantes de la cocaïne ou de la morphine (Drouin et al. 2002). Chez ces souris, l'injection d'amphétamine n'induit plus de libération de DA dans le NAc (Auclair et al. 2002), libération absente également

chez les souris qui n'expriment plus le gène codant pour la DBH et donc ne synthétisant plus de NA (Schank et al. 2006). Par ailleurs, une autre expérience montre que la libération de DA dans le NAc induite par l'amphétamine n'est pas corrélée à l'activité locomotrice. Dans ce travail, une injection locale d'amphétamine dans le NAc induit une libération de DA dans ce même noyau, suivi d'une autre libération qui se superpose à la première lors de l'injection d'amphétamine par voie systémique. Si les souris sont traitées avec de la prazosine, l'antagoniste des récepteurs α_{1B} -adrénergiques mentionné précédemment, avant l'injection systémique d'amphétamine, on n'observe plus la seconde libération de DA ni d'activité locomotrice en réponse à l'injection systémique (Darracq et al. 1998). Le contrôle noradrénergique qui passe par les récepteurs α_{1B} -adrénergiques s'exercerait également au niveau du NAc., puisque l'application locale de prazosine induit une diminution des niveaux extracellulaires de DA dans ce même noyau, ce qui traduit une stimulation noradrénergique tonique sur la libération de DA (Sommermeyer, Frielingsdorf, et Knorr 1995).

En plus des résultats présentés ci-dessus qui attestent du rôle noradrénergique dans la réponse aux drogues (Drouin, Darracq, et al. 2002; Darracq et al. 1998), des résultats complémentaires plaident en faveur d'un rôle noradrénergique central dans le modèle spécifique de la sensibilisation comportementale. Tout d'abord, la destruction des neurones noradrénergiques du LC ou du faisceau noradrénergique ventral diminue significativement la réponse aiguë à l'amphétamine chez les rats (Mohammed et al. 1986). Comme mentionné précédemment, les récepteurs α_{1B} -adrénergiques ont un rôle dans la libération de DA, mais également dans la réponse locomotrice à des injections aiguës et répétées d'amphétamine et de cocaïne (Snoddy et Tessel 1985; Dickinson, Gadie, et Tulloch 1988; Blanc et al. 1994; Weinshenker 2002; Wellman et al. 2002; Auclair, Drouin, et al. 2004; Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008).

La transmission noradrénergique est donc capable d'influencer la réponse comportementale aux drogues. Réciproquement, ce système est une cible pour les drogues. Récemment, l'équipe de Jean-Pol Tassin, qui a dirigé cette thèse, a étudié l'évolution du système noradrénergique après des injections répétées de toutes les drogues d'abus. Les résultats établissent que les animaux sensibilisés présentent une hyper-activité noradrénergique mise en évidence par une augmentation des taux extracellulaires de NA de 2000% par rapport au taux de base dans le CPF après une injection d'amphétamine, qui libère la NA (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008). Cette modification est intéressante car elle se maintient à long terme, puisqu'après un mois de

sevrage la potentialisation est toujours observée. De plus, l'hyper-réactivité noradrénergique est fortement corrélée dans le temps à la réponse comportementale ($r^2=0.99$), ce qui suggère que cette sensibilisation neurochimique est un index fiable de la sensibilisation comportementale induite par l'amphétamine (Salomon et al. 2006). Les récepteurs α_{1B} -adrénergiques, dont le rôle a déjà été souligné précédemment, semblent également être impliqués dans cette sensibilisation, puisque leur blocage empêche la sensibilisation comportementale et neurochimique.

Comme il le sera décrit dans la partie exposant les problématiques de ce travail, nous avons cherché à identifier le mécanisme qui maintient cette hyper-réactivité noradrénergique à long terme. Les résultats composent la deuxième publication de cette thèse (Publication n°2).

Malgré les résultats qui identifient comme cible de l'amphétamine une voie cellulaire spécifique aux autorécepteurs α_{2A} -adrénergiques et après avoir montré que ces récepteurs peuvent bloquer la sensibilisation comportementale, la noradrénaline ne serait pourtant pas la seule composante qui jouerait un rôle dans ce phénomène pour toutes les drogues. En effet, la libération de DA induite par la morphine n'est pas modifiée chez les souris α_{1B} -KO, ce qui suggère l'existence d'un autre élément de régulation (Auclair, Drouin, et al. 2004). Or, outre les catécholamines, la sérotonine intervient dans de nombreuses fonctions du SNC. Comme la NA ou la DA, cette monoamine constitue un réseau diffus d'afférences dans tout le cerveau et toutes les drogues ont des effets pharmacologiques sur ce réseau, comme nous allons le détailler par la suite.

De nombreux résultats attestent de l'implication de la transmission noradrénergique dans la réponse aux drogues. Nous avons vu que l'altération de ce système influence les comportements des animaux vis-à-vis des substances, qu'elles soient administrées de manière contingente (prise orale volontaire) ou non (sensibilisation comportementale). Une des modifications mise en évidence est l'hyper-réactivité durable du système noradrénergique chez les animaux sensibilisés. La deuxième publication de ce travail expose les mécanismes du maintien de cette hyper-réactivité qui passe par une désensibilisation à long terme des autorécepteurs inhibiteurs α_{2A} -adrénergiques après un traitement répété d'amphétamine.

Soulignons que de nombreux travaux insistent sur un lien anatomique et fonctionnel entre les transmissions noradrénergique et dopaminergique, qui touche notamment l'activité des neurones dopaminergiques ou la libération de DA dans le NAc, étape clé dans la réponse aux drogues.

Les deux principales catécholamines ont un rôle important dans la réponse neurobiologique aux drogues, mais un autre système monoaminergique, celui de la sérotonine, semble aussi être modifié par les drogues. La partie suivante expose les bases de ce système et les résultats qui relient la sérotonine aux modifications neurobiologiques induites par celles-ci.

5. Système sérotoninergique

La sérotonine (5-HT) est synthétisée en 2 phases, à partir du tryptophane. Cet acide aminé est transformé en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par l'enzyme limitante de la réaction, la tryptophane hydroxylase (TPH) (Lovenberg, Jequier, et Sjoerdsma 1967). Le 5-HTP est par la suite décarboxylé en sérotonine par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) (Clark, Weissbach, et Udenfriend 1954).

A l'instar de la transmission noradrénergique, toute la 5-HT du cerveau provient d'un petit nombre de noyaux situés dans le pont et le tronc cérébral. Parmi ces 9 noyaux, nommés de B1 à B9, les raphés dorsal (B7) et médian (B8) regroupent la majorité des projections sérotoninergiques (Dahlström et Fuxe 1964) (**Figure 9**). Bien que les projections de ces deux noyaux soient diffuses et superposées dans certaines régions, il est possible de les différencier par leur origine, la morphologie des terminaisons, des circuits de projection distincts ou par leurs propriétés pharmacologiques (Molliver 1987; Mamounas et al. 1991). Ces deux noyaux s'innervent mutuellement (Robert P. Vertes, Fortin, et Crane 1999; Vertes 1991).

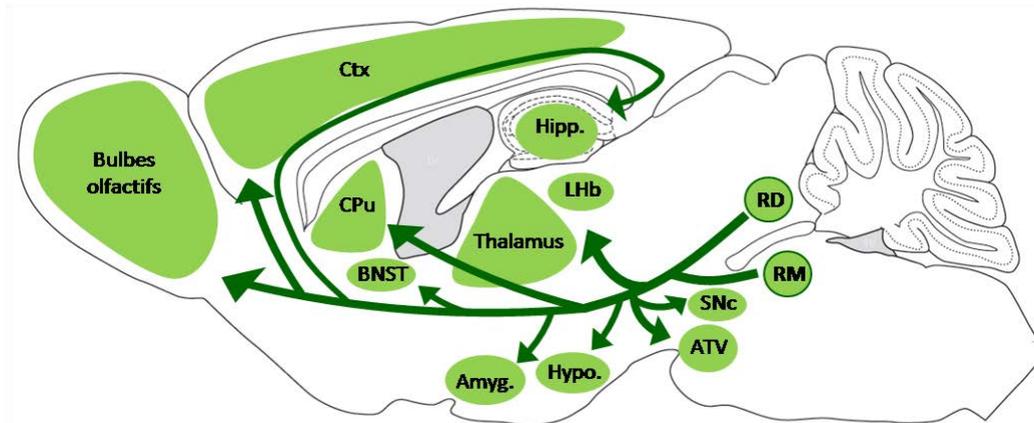


Figure 9 : Principales projections du raphé dorsal (RD) et médian (RM) chez la souris
 Amyg. : amygdale ; ATV : aire tegmentale ventrale ; BNST : noyau du lit de la strie terminale ; CPU : striatum ; Ctx : cortex ; Hipp. : hippocampe ; Hypo : hypothalamus ; LC : locus coeruleus ; LHb : habénula latérale ; RD : raphé dorsal ; SNc : substance noire compacte

Le raphé médian (RM) projette sur l'hippocampe, le septum, l'habénula latérale (Vertes, Fortin, et Crane 1999) mais aussi sur le striatum et le cortex (Azmitia et Segal 1978; O'Hearn et Molliver 1984), où l'innervation rejoint celle provenant du raphé dorsal (RD). Les projections du RD touchent un nombre important de régions cérébrales dont le cortex frontal, l'ATV, l'hippocampe ventral, l'amygdale, le BNST et certains noyaux des ganglions de la base (striatum, pallidum ventral, substance noire compacte) (Vertes 1991) (Figure 10). Bien que les neurones sérotoninergiques du RD soient la source la plus importante de 5-HT du cerveau, ce noyau est hétérogène, puisqu'il est également composé de neurones GABAergiques et dopaminergiques (Michelsen, Schmitz, et Steinbusch 2007).

Comme pour l'activité « pacemaker » des neurones noradrénergiques, les neurones sérotoninergiques déchargent de manière spontanée, à rythme lent et régulier (Aghajanian, Foote, et Sheard 1968; Mosko et Jacobs 1974). De manière intéressante, lorsque les neurones sérotoninergiques sont enregistrés *in vitro* dans des tranches de raphé, il est nécessaire de rajouter un agoniste des récepteurs α_{1B} -adrénergique, sans quoi l'activité spontanée n'est plus observée (Vandermaelen et Aghajanian 1983). De plus, la clonidine,

agoniste des récepteurs α_{2A} -adrénergiques que nous avons déjà mentionnée, inhibe l'activité des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques (Svensson, Bunney, et Aghajanian 1975; Pudovkina, Cremers, et Westerink 2003). Ces résultats corroborent l'existence d'une activation tonique de l'activité sérotoninergique par les neurones noradrénergiques, comme nous allons le détailler par la suite.

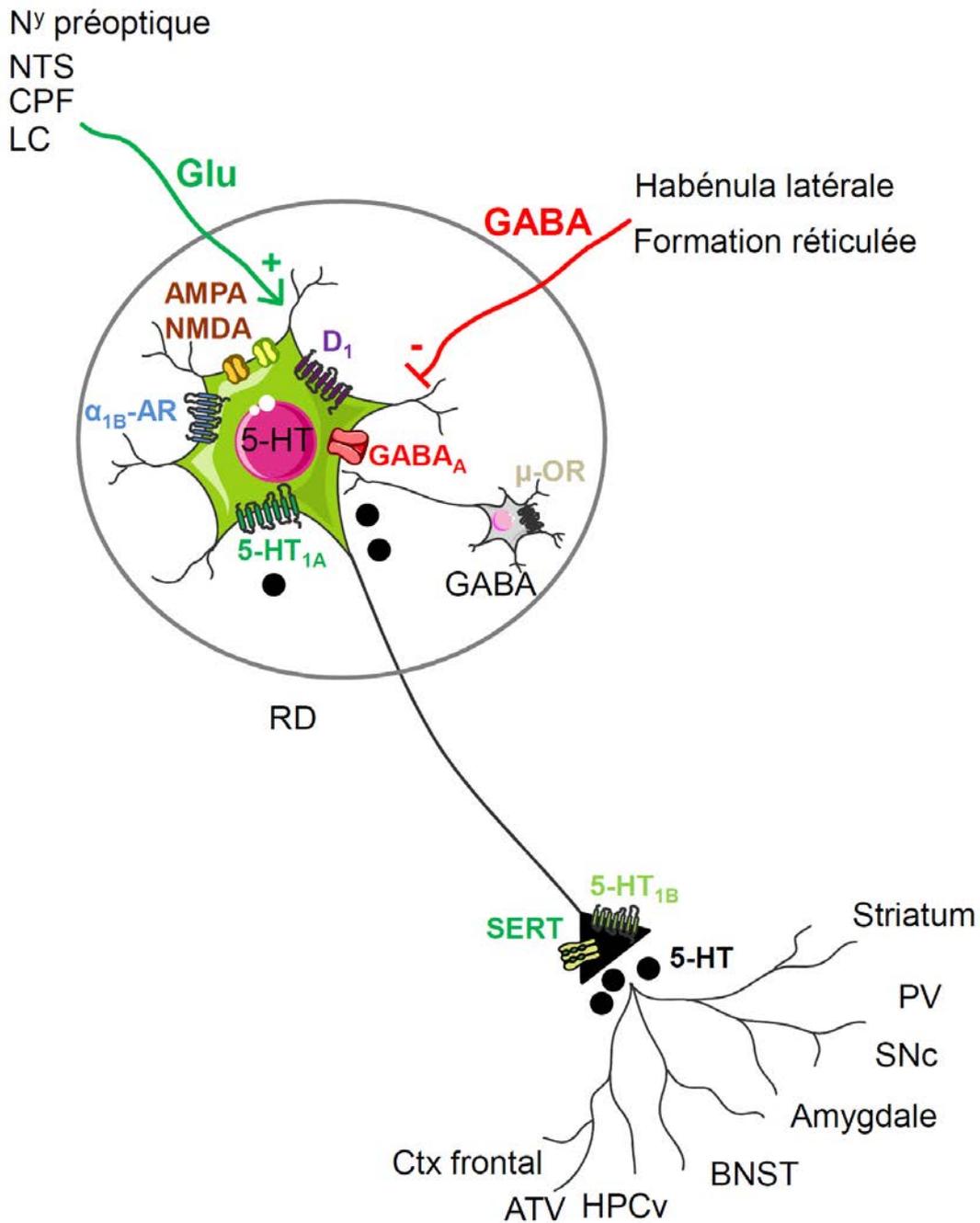


Figure 10 : Principales afférences et efférences inhibitrices et activatrices du noyau du raphé dorsal (RD)

μ-OR : récepteur μ-opioïde ; ATV : aire tegmentale ventrale ; BNST : Noyau du lit de la strie terminale ; CPF : Cortex préfrontal ; Ctx : cortex ; GABA : acide γ-aminobutyrique ; Glu : glutamate ; HPCv : hippocampe ventral ; LC : locus coeruleus ; NTS : noyau du tractus solitaire ; PV : pallidum ventral ; SNc : substance noire compacte

Avec 7 classes de récepteurs distincts incluant 16 sous-classes différentes, la famille des récepteurs sérotoninergiques est la plus vaste des récepteurs monoaminergiques. A l'exception du récepteur canal 5-HT₃, les récepteurs appartiennent tous à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires et sont couplés à différentes protéines G (Hoyer, Hannon, et Martin 2002). Les caractéristiques principales des récepteurs sont regroupées dans le [Tableau 5](#). Notons que pour certains récepteurs, comme 5-HT_{1E/F} aucun rôle physiologique n'a encore été trouvé.

Décrivons plus en détail les récepteurs de la famille 5-HT₁ et 5-HT₂, qui prennent une place importante dans ce travail de par les résultats (Publication n°3) et la théorie du contrôle réciproque des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques.

On compte 5 sous-classes de récepteurs 5-HT₁, tous couplés aux protéines G_{αi/o} (Hamon et al. 1990). L'activation de cette cascade intracellulaire inhibe l'AC, diminue l'AMPc, inhibe la PKA, augmente les courants potassiques et diminue les courants calciques, ce qui dans son ensemble inhibe l'activité sérotoninergique (VanderMaelen et al. 1986; Sinton et Fallon 1988) et diminue la libération de 5-HT dans les zones de projections sérotoninergiques (Hutson et al. 1989; Bonvento et al. 1992; Adell, Carceller, et Artigas 1993). Plus précisément, le récepteur 5-HT_{1A} se lie à 3 sous-types de protéines G_{αi} (G_{αi1-3}) (Bertin et al. 1992). Ce couplage intracellulaire varie d'une région à une autre et il a été montré que dans le raphé, le couplage de 5-HT_{1A} se limite au sous-type G_{αi3} (Mannoury la Cour et al. 2006).

Famille	Récepteur	Localisation synaptique	Couplage et 2 ^d messagers	Localisation dans le SNC	Implication	
5-HT ₁	5-HT _{1A}	Pré et Post-synaptique	G α i/Go G α (\downarrow AMPc –PKA) G β G γ (+I $_{K}$ -I $_{Ca^{2+}}$)	RD, RM, gyrus denté, hippocampe (CA1, CA3), septum latéral, ctx entorhinal ou cingulaire, bulbes olfactifs, thalamus, hypothalamus, ...	Contrôle de l'activité 5-HT, hypothermie, modulation des comportements anxieux, OCD, migraine,	
	5-HT _{1B}			Ganglions de la base, striatum, ctx frontal		
	5-HT _{1D}			RD, SNC, striatum		
	5-HT _{1E/F}			5-HT _{1E} : Ctx frontal 5-HT _{1F} : RD, hippocampe, ctx, striatum, thalamus, hypothalamus	?	
5-HT ₂	5-HT _{2A}		Pré et Post-synaptique	G α /G β ₁₁ +PLC \uparrow IP3 (\uparrow Ca ²⁺) \uparrow DAG (+ PKC)	Ctx, LC, striatum, NAc., hippocampe, amygdale, ATV, septum, thalamus,...	Secouements de la tête, mouvements de "chien mouillé", effets hallucinogènes
	5-HT _{2B}				Cervelet, septum lateral, hypothalamus, amygdale	Contrôle activateur de la libération de 5-HT, couplage avec SERT, libération de DA, réponse aux psychostimulants, interaction sociale, hyperphagie, fréquence de toilette
	5-HT _{2C} (ancien 5-HT _{1C})				Ctx, LC, habénula latérale, striatum, NAc., Septum, hippocampe, ATV, SNC	Contrôle inhibiteur tonique sur les transmissions DA et NA frontocorticales, troubles de l'alimentation
5-HT ₃	5-HT _{3A-C}			Récepteur canal, perméable aux cations (entrée de Na ⁺ , Ca ²⁺ sortie de K ⁺)	Hippocampe (CA1), noyau dorsal moteur, amygdale, ctx entorhinal	Libération de DA, anxiété, migraine
5-HT ₄			G α s \uparrow AMPc + PKA	Pallidum ventral, striatum, NAc.,...	Apprentissage, mémoire, comportements alimentaires et troubles de l'humeur	
5-HT ₅	5-HT _{5A-B}		G α i/Go & G α s	Ctx, hypothalamus, hippocampe, RD	?	
5-HT ₆			G α s \uparrow AMPc + PKA	Striatum, amygdale, NAc., hippocampe, ctx,...	Contrôle de la fonction cholinergique, régulation de l'alimentation	
5-HT ₇				Noyau thalamique médian, ctx, SN, hypothalamus, RD	Troubles de l'humeur, hypothermie,	

Tableau 5 : Classification des récepteurs sérotoninergiques et principales caractéristiques.

BNST : bed nucleus of the stria terminalis; Ca²⁺ : calcium; Ctx : cortex; DAG: diglycérade; I_K : courant potassique ; I_{Ca2+} : courant calcique; IP3 : inositol-triphosphate; OCD : obsessive compulsive disorder ou TOC : Trouble obsessionnel compulsif; PGI : noyau paraventriculaire; PKC: protéine kinase C; PLC : phospholipase C, SERT : transporteur de la sérotonine

Informations extraites de (Vergé et al. 1986; Kia et al. 1996; Millan, Dekeyne, et Gobert 1998; Hoyer, Hannon, et Martin 2002; Palchoudhuri et Flügge 2005; Shanahan et al. 2009; Doly et al. 2008; Auclair et al. 2010; Bockaert et al. 2011; Diaz et al. 2012)

Bien qu'exprimés aussi en post-synaptique, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} ont un rôle particulier dans le contrôle inhibiteur de ces neurones sérotoninergiques, puisqu'ils sont largement exprimés au niveau somato-dendritique ou des terminaisons, respectivement (Vergé et al. 1985; Vergé et al. 1986; Albert Adell et al. 2002). Soulignons que la libération sérotoninergique est non négligeable au niveau somato-dendritique. Le mécanisme de cette libération, dépendant ou non du potentiel d'action, reste controversé, mais induit dans tous les cas l'activation des autorécepteurs et l'inhibition de l'activité sérotoninergique (Wang et Aghajanian 1978; Adell, Carceller, et Artigas 1993; Bosker, Klomp makers, et Westenberg 1994). L'existence d'un contrôle tonique reste incertaine dans la mesure où les antagonistes 5-HT_{1A} modifient (Bjorvatn et al. 1998) ou non (Johnson, Gartside, et Ingram 2002; Albert Adell et al. 2002) l'activité sérotoninergique. Il semblerait cependant que la littérature s'accorde sur un contrôle plutôt phasique, puisque chez les souris qui n'expriment plus le gène codant pour les autorécepteurs 5-HT_{1A} (5-HT_{1A}-KO), le niveau sérotoninergique de base n'est pas modifié (Bortolozzi et al. 2004). De plus, chez ces souris 5-HT_{1A}-KO, le récepteur 5-HT_{1B} n'est pas fonctionnellement différent des souris contrôles, ce qui suggère qu'il n'y a pas de compensation de ces récepteurs lors de la perte de 5-HT_{1A} (Bortolozzi et al. 2004).

Le groupe de récepteurs 5-HT₂ est composé de 3 sous-types : les récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}, tous couplés à la protéine G_{q/11}, qui active la phospholipase C (PLC) (Hoyer, Hannon, et Martin 2002). Les récepteurs 5-HT_{2C}, initialement désignés comme 5-HT_{1C}, ont été renommés de par leur similarité fonctionnelle et d'affinité à la 5-HT au sous-type 5-HT₂. L'enzyme PLC catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) membranaire en diglycéride (DAG) et inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃). Le DAG active la PKC et l'IP₃ induit la libération de calcium du réticulum endoplasmique, ce qui favorise les phosphorylations et active globalement les neurones. Les récepteurs 5-HT₂ sont largement présents dans le cerveau, et en particulier, le récepteur 5-HT_{2A} est exprimé entre autres dans les neurones pyramidaux du cortex (couches II à V), le thalamus, l'hippocampe, le septum, le cervelet (Pazos, Cortés, et Palacios 1985; Pompeiano, Palacios, et Mengod 1994; Jakab et Goldman-Rakic 2000) mais aussi dans deux régions qui suggèrent une interaction avec le système dopaminergique: l'ATV (Doherty et Pickel 2000) et le *shell* du NAc. (Morilak, Garlow, et Ciaranello 1993).

Le récepteur 5-HT_{2B} contrôle, via des phosphorylations du transporteur spécifique de la sérotonine (SERT), le système de recapture de celle-ci, et influence donc la libération de la 5-HT (Launay et al. 2006). La connexion entre les récepteurs 5-HT_{2B} et le transporteur SERT

cible de nombreux antidépresseurs et notamment bien sûr des inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine ; elle semble d'ailleurs être à l'origine de la réponse à cette classe d'antidépresseurs. En effet, le blocage des récepteurs 5-HT_{2B} abolit les effets des antidépresseurs tandis que leur stimulation induit ces effets (Diaz et al. 2012). Ces résultats suggèrent l'existence d'un rétrocontrôle positif passant par les récepteurs 5-HT_{2B} sur la libération de 5-HT par les neurones du raphé.

Ce récepteur régule également la libération de DA et la réponse comportementale à l'amphétamine et au MDMA. En effet, l'administration systémique d'antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT_{2B} chez le rat diminue le taux basal de DA dans le NAc. et décroît l'hyperactivité locomotrice induite par une injection aiguë d'amphétamine (Auclair et al. 2010). Concernant le MDMA, le blocage pharmacologique ou la délétion du gène codant des récepteurs 5-HT_{2B} induit une perte totale de la hyperactivité locomotrice induite par le MDMA, ainsi qu'une absence de libération de 5-HT dans le NAc et dans l'ATV (Doly et al. 2008). Chez les souris n'exprimant plus les récepteurs 5-HT_{2B}, les comportements liés aux effets renforçants de cette drogue sont également touchés, puisque le MDMA n'induit plus de sensibilisation comportementale ou de préférence de place conditionnée (Doly et al. 2009). De plus, une étude montre que le blocage des récepteurs 5-HT_{2B} augmente les comportements impulsifs chez l'homme et chez la souris (Bevilacqua et al. 2010). Tous ces résultats soulignent le rôle important des récepteurs 5-HT_{2B} dans la réponse aux psychostimulants interagissant avec la transmission sérotoninergique et les impliquent dans l'impulsivité, un facteur de risque de la toxicomanie.

Après sa libération dans la synapse, la 5-HT est recaptée par le SERT (Torres, Gainetdinov, et Caron 2003) pour être recyclée dans les vésicules pré-synaptiques ou dégradée par les monamines oxydases qui constituent la voie de dégradation principale (Mclsaac et Page 1959).

Le RD projette donc vers de nombreuses structures, mais ce noyau reçoit également beaucoup d'afférences qui contrôlent son activité (**Figure 10**). Des études montrent des projections du noyau du tractus solitaire (NTS), du CPF, du LC, du noyau préoptique et, de manière abondante, de l'habenula latérale et de la formation réticulée vers le RD, ces deux dernières structures constituant un contrôle inhibiteur majeur (Akagi et Powell 1968; Aghajanian et Wang 1977). Ainsi, la stimulation électrique de ces deux régions inhibe toute activité sérotoninergique (Wang, Gallager, et Aghajanian 1976; Wang et Aghajanian 1977).

Ce contrôle semble passer par des neurones GABAergiques, puisque le blocage des récepteurs GABA_A prévient cet effet.

Comme pour les transmissions dopaminergique et noradrénergique, le CPF a également un rôle important dans le contrôle de l'activité sérotoninergique qui passe par des afférences du CPF au RD. L'activation du CPF induisant une inhibition sérotoninergique, une étude conclut à un contrôle inhibiteur majeur du CPF sur le RD qui ne passerait pas par l'activation des autorécepteurs 5-HT_{1A} suite à la libération de 5-HT au niveau du soma (Hajós et al. 1998). Mais, l'existence de projections corticales simultanées sur les neurones sérotoninergiques et les interneurons GABAergiques du RD, ainsi que l'expression des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau présynaptique (RD) et post-synaptique (CPF), rendent l'influence corticale difficile à définir. Ainsi, lorsque les récepteurs 5-HT_{1A} et GABA_A sont bloqués, l'inhibition corticale est diminuée, ce qui suggère un rôle de ces récepteurs (Celada et al. 2001). L'activation corticale des interneurons du RD pourrait ainsi inhiber les neurones sérotoninergiques du raphé (Nanopoulos et al. 1982). Un argument supplémentaire en faveur d'un rôle des 5-HT_{1A} est le fait qu'après épuisement de la 5-HT, l'influence du CPF devient excitatrice, ce qui laisse supposer une activation des autorécepteurs par la 5-HT. Cette activation est empêchée par le blocage des récepteurs NMDA et AMPA. Dans ce même travail (Celada et al. 2001), les auteurs vont plus loin et montrent qu'activer ou inhiber les récepteurs 5HT_{1A} du CPF inhibe ou diminue l'inhibition, respectivement, des neurones sérotoninergiques, incluant ainsi les récepteurs 5-HT_{1A} post-synaptiques au contrôle sérotoninergique du RD. Ce résultat a été par la suite confirmé par un travail similaire (Hajós, Hajós-Korcsok, et Sharp 1999).

La dernière grande influence sur les neurones sérotoninergiques du RD passe par la corticolibérine (CRF), un peptide largement impliqué dans la réponse au stress. En effet, les neurones sérotoninergiques et les interneurons GABAergiques du RD expriment le récepteur de ce peptide (CRF₂ et CRF₁, respectivement) (Day et al. 2004) et reçoivent des projections libérant le CRF du BNST et du noyau central de l'amygdale (Fox et Lowry 2013). L'application intra-crânienne de CRF à faibles doses inhibe l'activité des neurones sérotoninergiques (Kirby, Rice, et Valentino 2000) et diminue la libération de 5-HT dans différentes zones de projection (Price et Lucki 2001). Les auteurs s'accordent sur un effet inhibiteur indirect de la CRF passant par le CRF₁ des interneurons GABAergiques du RD (Kirby et al. 2008). A fortes doses, la CRF n'inhibe plus ou active les neurones sérotoninergiques du RD (Kirby, Rice, et Valentino 2000).

Au vu du contrôle important de la CRF sur la principale source de 5-HT du cerveau, il n'est pas étonnant d'observer que des troubles psychiatriques liés au stress impliquent un dysfonctionnement de la transmission sérotoninergique. Ce lien est d'autant plus intéressant au regard de la toxicomanie puisque, comme nous l'avons mentionné lors de la définition de ce trouble, le stress potentialise l'effet des drogues et favorise la rechute (Piazza et Le Moal 1996). Mais la transmission sérotoninergique a un rôle dans une multitude d'autres comportements, surtout ceux en lien avec les comportements émotifs. Au niveau central, elle participe à la régulation de l'humeur, de l'anxiété, du sommeil, de l'appétit, de la température et de la perception de la douleur. Les récepteurs sérotoninergiques sont donc une cible médicamenteuse pour la dépression, les troubles de l'anxiété, les troubles obsessionnels compulsifs et les troubles des conduites alimentaires (Sadkowski et al. 2013). La régulation du CPF par les neurones sérotoninergiques est un exemple du rôle sérotoninergique. Les neurones pyramidaux expriment simultanément les récepteurs 5-HT_{1A} hyperpolarisants et 5-HT_{2A} dépolarisants (Amargós-Bosch et al. 2004) et la stimulation du RD ou du RM inhibe les neurones pyramidaux du CPF, vraisemblablement via l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} et GABA_A des interneurons (Puig, Artigas, et Celada 2005; Celada, Puig, et Artigas 2013). Le CPF est une structure clé dans les fonctions exécutives mais aussi dans la régulation des autres monoamines via ses projections descendantes sur l'ATV ou le LC. En contrôlant cette structure, les variations de la transmission sérotoninergique affectent de nombreux comportements.

Comme pour la NA et la DA, les connexions réciproques entre la 5-HT et les autres monoamines attestent de l'interaction entre ces transmissions. Le RD projette vers le LC et réciproquement (Kim et al. 2004). De la même manière, l'ATV reçoit des afférences du RD (Loughlin et Fallon 1982), et des contacts synaptiques sur les neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques de l'ATV ont été montrés (Hervé et al. 1987; Kalén, Skagerberg, et Lindvall 1988).

Concernant la DA, la 5-HT favorise sa libération dans l'ATV (Beart et McDonald 1982), le NAc. (Nurse, Russell, et Taljaard 1988) et le striatum (Bonhomme et al. 1995). Dans le striatum, l'effet de la 5-HT passe par les récepteurs 5-HT₄ et par le DAT (Bonhomme et al. 1995; De Deurwaerdère et al. 1996). Notons tout de même que l'application de 5-HT directement dans ces zones de projection et la stimulation du RD qui induit la libération de 5-HT jusqu'à ces régions ne mène pas toujours à un même résultat. En effet, après la stimulation électrique du RD, la libération de DA se maintient dans le NAc. (via l'activation des récepteurs 5-HT₃) tandis que dans le striatum, la DA extracellulaire diminue

(Deurwaerdère, Stinus, et Spampinato 1998). Des études postérieures montrent que cette divergence passe par un contrôle inhibiteur tonique des récepteurs 5-HT_{2B/2C} à la fois dans le NAc. et dans le striatum, tandis qu'il existe un effet activateur phasique des récepteurs 5-HT_{2A} exclusivement dans le NAc. (De Deurwaerdère et Spampinato 1999).

En plus du rôle sur la libération de DA, la 5-HT influence également l'activité électrique des neurones dopaminergiques. Contrairement à l'effet activateur sur la libération, la 5-HT, via les récepteurs 5-HT₂, semble potentialiser l'effet inhibiteur de la libération de DA sur les neurones dopaminergiques eux-mêmes, un effet qui passerait vraisemblablement par l'activation des autorécepteurs D₂ (Brodie et Bunney 1996). On observe d'ailleurs une inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV lors de l'augmentation de 5-HT induite par des inhibiteurs du SERT (fluoxétine et citalopram) (Prisco et Esposito 1995). Dans la famille des récepteurs 5-HT₂, les récepteurs 5-HT_{2C/2B} (et plus probablement les 5-HT_{2C}) influencent, via le contrôle de l'activité dopaminergique, la réponse à la morphine. Le blocage de ces récepteurs par l'antagoniste SB 206553 induit une augmentation du taux de décharge basal des neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SNc, ainsi qu'une augmentation de la décharge en bouffées spécifiquement dans l'ATV (Di Giovanni et al. 1999). En accord avec ce résultat, la libération de DA dans le NAc. et dans le striatum induite par une injection systémique de morphine est augmentée lors du blocage des 5-HT_{2C/2B} (Porras et al. 2001). Ces résultats suggèrent que ces récepteurs exercent un contrôle inhibiteur tonique sur l'activité dopaminergique au niveau basal et en réponse aux opiacés.

Les récepteurs 5-HT_{1A} jouent également un rôle dans ce contrôle sérotoninergique. En effet, bloquer les 5-HT_{1A} de l'ATV augmente le taux de décharge et la décharge en bouffées des neurones dopaminergiques, ce qui révèle un contrôle inhibiteur tonique, qui passe aussi par les autorécepteurs D₂ (Arborelius et al. 1993). En accord avec ce résultat, ces auteurs ont montré dans la même étude que l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} par l'injection de leur agoniste 8-OH-DPAT à hautes doses dans l'ATV entraîne un blocage de l'activité des neurones dopaminergiques. L'interaction DA-5-HT est aussi observée au niveau du CPF. En effet, le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} du CPF prévient la libération de DA induite par un stress dans cette même structure (Pehek et al. 2005) ce qui suggère que la 5-HT pourrait également influencer la libération de DA induite par d'autres comportements, comme la prise de drogues.

Ainsi, de par l'expression de multiples récepteurs par les neurones dopaminergiques et/ou les interneurons GABAergiques de l'ATV ou du CPF, la transmission sérotoninergique exerce une forte influence sur la transmission dopaminergique.

Mais au-delà de l'interaction entre ces deux systèmes, plusieurs expériences prouvent que le système sérotoninergique influence et est influencé par les drogues (en particulier par les opiacés), indépendamment des autres systèmes monoaminergiques.

Concernant les opiacés, la morphine favorise la libération de 5-HT dans de nombreuses zones de projection du RD incluant le striatum, le NAc. et dans le RD lui-même (Tao et Auerbach 1994; Tao et Auerbach 1995) en levant l'inhibition des interneurons GABAergiques du raphé dorsal qui expriment les récepteurs μ -opioïdes (Jolas et Aghajanian 1997; Tao et Auerbach 2005). Paradoxalement, une étude montre une hypersensibilité des récepteurs 5-HT_{1A} après un traitement répété de morphine (Sastre-Coll, Esteban, et García-Sevilla 2002). Cette modification induirait une libération plus faible de 5-HT dans les zones de projections, dont le LC. Or, il a été montré que la 5-HT du LC réduit la réponse noradrénergique aux acides aminés excitateurs, dont le glutamate (Aston-Jones et al. 1991; Charléty et al. 1991; Charléty et al. 1993). Cette augmentation du rétrocontrôle inhibiteur favoriserait l'hyper-réactivité du LC lors du sevrage à la morphine.

Les psychostimulants ne présentant qu'une faible affinité pour le SERT (Ritz et Kuhar 1989), ils n'induisent pas de libération de 5-HT sauf à de fortes doses (Kankaanpää et al. 1998). Cependant, il a été montré que les récepteurs 5-HT_{2A} ont un rôle dans la libération de DA induite par l'amphétamine chez les rats. En effet, l'injection systémique de SR 46349B, un antagoniste de ces récepteurs, réduit significativement cette libération dans le NAc. et le striatum (Porrás et al. 2001). Le rôle des 5-HT_{2A} semble être spécifique des réponses dopaminergiques induites par un stimulus, puisque l'activité dopaminergique basale est inchangée en présence d'antagoniste de ces récepteurs. Une autre étude confirme l'implication de 5-HT_{2A} dans la réponse aux psychostimulants, et plus particulièrement à la cocaïne. Le blocage de ces récepteurs exprimés spécifiquement dans l'ATV réduit l'hyperactivité induite par une injection aiguë de cocaïne (McMahon, Filip, et Cunningham 2001). Le blocage des récepteurs 5-HT_{2C} de la partie shell du NAc. a le même effet, ce qui suggère que ces deux récepteurs dans ces deux régions distinctes, contrôlent la réponse comportementale à la cocaïne. En accord avec ces résultats, la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} potentialise la libération de DA dans le CPF et le NAc. induite par l'amphétamine (Kuroki, Meltzer, et Ichikawa 2003). En ce qui concerne les injections répétées, un

traitement chronique d'amphétamine induit une perte de sensibilité des neurones sérotoninergiques du RD à des tests de cette même drogue (Heidenreich, Basse-Tomusk, et Rebec 1987). Des études ont également montré le rôle des récepteurs 5-HT_{2C} dans la sensibilisation à l'amphétamine et au MDMA. En effet, bien qu'une étude ait conclu que le récepteur D₁ était indispensable à l'induction de la sensibilisation comportementale à l'amphétamine (Vezina 1996), l'antagoniste du récepteur D₁ utilisé a aussi un effet d'agoniste avec une très forte affinité (9 nM) sur les récepteurs 5-HT_{2C} sérotoninergiques, et c'est cet effet qui est responsable du blocage de la sensibilisation. En effet, l'injection simultanée d'un antagoniste 5-HT_{2C} avec le SCH23390 préserve la sensibilisation à l'amphétamine (Lanteri et al. 2008) et au MDMA (Ramos, Goni-Allo, et Aguirre 2005).

A ces nombreux résultats qui attestent des modifications de la transmission sérotoninergique après une exposition aiguë ou répétée aux drogues s'ajoutent les études menées par l'équipe de Jean-Pol Tassin concernant le rôle de la sérotonine dans la sensibilisation comportementale. Ainsi, Auclair et collaborateurs montrent que le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} diminue de plus de 80% la réponse locomotrice à la morphine, ainsi que la libération de DA dans le NAc. induite par celle-ci (Auclair, Blanc, et al. 2004). Ce résultat peut être étendu à la cocaïne et la morphine lorsque le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} est couplé avec le blocage (pharmacologique ou via l'inactivation du gène) des récepteurs α_{1B} -adrénergiques (Auclair, Drouin, et al. 2004).

Au-delà du rôle des récepteurs 5-HT_{2A}, des travaux récents dévoilent une hyper-réactivité du système sérotoninergique chez les souris sensibilisées à l'amphétamine, à la cocaïne, à la morphine, à l'alcool, à la nicotine couplée aux inhibiteurs de MAO et au MDMA après une injection de para-chloro-amphétamine (PCA), qui libère spécifiquement la 5-HT (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008; Lanteri et al. 2009; Lanteri et al. 2013). Ce phénomène est comparable à l'hyper-réactivité noradrénergique, puisqu'il se maintient jusqu'après un mois de sevrage et est très fortement corrélé à la sensibilisation comportementale.

Comme cela sera développé dans le 3^{ème} article de ce travail, il est possible d'observer d'autres modifications du système sérotoninergique après des injections répétées d'amphétamine. En effet, les autorécepteurs 5-HT_{1A} sont désensibilisés à long terme chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine.

Tout comme la DA et la NA, le système sérotoninergique est doublement impliqué dans la réponse physiologique aux drogues. D'une part, il appartient au réseau monoaminergique et est donc capable d'influencer et d'être influencé par la libération des autres neuromodulateurs. D'autre part, l'alcool, les opiacés et, dans une moindre mesure, les psychostimulants, touchent directement ce système. De plus, la 5-HT joue un rôle important dans les réponses aux stress, qui sont potentialisées par les drogues.

En parallèle à la sensibilisation comportementale et l'hyper-réactivité noradrénergique, les études récentes de notre équipe ont montré une hyper-réactivité du système sérotoninergique semblable à celle de la noradrénaline. L'hyper-réactivité sérotoninergique se maintient aussi à long terme et est fortement corrélée à la sensibilisation comportementale. Dans la troisième partie des résultats, nous montrerons que le maintien de cette hyper-réactivité passe, comme pour le système noradrénergique, par un dysfonctionnement du rétrocontrôle inhibiteur, soit une désensibilisation à long terme des autorécepteurs 5-HT_{1A}. Au regard du rôle de la transmission sérotoninergique développée ci-dessous et de l'importance de la multiplicité des récepteurs sérotoninergiques, les conséquences de cette modification pourraient influencer l'interaction des monoamines et la manière dont ce réseau interconnecté répond aux drogues.

Sans chercher à être exhaustifs, nous avons rassemblé les données nous paraissant essentielles pour comprendre les objectifs de notre travail. Il est clair que ces trois monoamines ont un rôle multiple et interactif dans la réponse centrale aux drogues. Les trois transmissions sont affectées, à la fois par des prises aiguës comme par des prises répétées de drogues, et les modifications induites sont observées à court et à long terme. Dans la dernière partie de l'introduction, nous allons disséquer l'interaction entre les systèmes noradrénergique et sérotoninergique, dont la connexion semble être rompue après une exposition répétée aux drogues. Les résultats nous mèneront à exposer la théorie du découplage.

6. Interaction entre les systèmes noradrénergique et sérotoninergique : hypothèse du découplage

Dans les parties précédentes, nous nous sommes focalisés sur la description des bases neurobiologiques des trois grands systèmes monoaminergiques, la dopamine, la noradrénaline et la sérotonine, en gardant à l'esprit les interactions entre les deux derniers neurotransmetteurs et la dopamine. Nous allons maintenant nous concentrer sur le lien

entre la NA et la 5-HT. En plus de présenter une relation anatomique et fonctionnelle, comme nous l'exposons ci-dessous, une étude a montré une sorte de rôle de substitution entre ces deux types cellulaires. En effet, l'exposition à la fluoxétine, antidépresseur inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine, induit la libération d'un facteur neurotrophique qui, en diminuant l'expression du microRNA-16, induit l'expression *de novo* de transporteur à la sérotonine par les neurones noradrénergiques du LC (Baudry et al. 2010). Bien que cette étude ait été menée en culture et que la confirmation *in vivo* soit nécessaire, observer l'expression de fonctions sérotoninergiques dans des neurones noradrénergiques atteste de la forte association entre ces deux transmissions.

Contrôle sérotoninergique par la transmission noradrénergique

Comme il a été mentionné précédemment, les études anatomiques attestent de projections réciproques entre le LC et le RD. Les projections noradrénergiques atteignent directement le RD par le faisceau dorsal (Loizou 1969; Jones et al. 1977; Anderson et al. 1977; Sakai et al. 1977; Baraban et Aghajanian 1981; Berridge et Waterhouse 2003; Sara 2009; Peyron et al. 1996) et l'expression des récepteurs α_1 et α_2 -adrénergiques au niveau du RD a été montrée avec des ligands radiomarqués (Unnerstall, Fernandez, et Orensanz 1985).

Ces deux sous-types de récepteurs α -adrénergiques présentent des effets opposés, les récepteurs α_1 -adrénergiques ayant un rôle excitateur tandis que l'activation des récepteurs α_2 inhibe l'activité sérotoninergique du RD (Mongeau, Blier, et de Montigny 1997; Pudovkina, Cremers, et Westerink 2003). Ainsi, l'application d'antagonistes des récepteurs α_1 -adrénergiques au niveau du RD diminue le taux de décharge des neurones sérotoninergiques, et l'addition ultérieure d'agonistes de ces mêmes récepteurs rétablit cette activité (Baraban et Aghajanian 1980a; Baraban et Aghajanian 1980b). L'activation tonique basale de ces récepteurs semble être maximale, puisque l'application micro-iontophorétique de NA ou de phényléphrine, un agoniste sélectif des récepteurs α_1 -adrénergiques, n'a pas d'effet activateur supplémentaire (Koyama et Kayama 1993; Svensson, Bunney, et Aghajanian 1975). Enfin, la réserpine, un alcaloïde qui se fixe sur les vésicules de stockage de la DA, NA et 5-HT et qui provoque l'épuisement des stocks de ces monoamines inhibe l'activité des neurones sérotoninergiques, un effet prévenu par la lésion des neurones à NA ou par l'amphétamine, qui libère, entre autres, la NA (Baraban, Wang, et Aghajanian 1978). Ces résultats suggèrent que l'influence des molécules passe bien par les neurones noradrénergiques.

A l'inverse, l'activation des récepteurs α_2 -adrénergiques inhibe le taux de décharge des neurones sérotoninergiques du RD (Dresse 1966; Svensson, Bunney, et Aghajanian 1975). Bloquer ces récepteurs augmente l'activité sérotoninergique (Garratt et al. 1991; Haddjeri, Blier, et Montigny 1996). Il a été montré que c'est un effet indirect, dû aux autorécepteurs α_2 -adrénergiques, puisque seules les injections systémiques de ligands de ces récepteurs influencent les neurones sérotoninergiques (Dresse 1966; Garratt et al. 1991) et que ces injections n'ont plus d'effet après lésion des neurones noradrénergiques (Svensson, Bunney, et Aghajanian 1975). Ainsi, inhiber l'activité des neurones noradrénergiques avec la clonidine, l'agoniste α_2 -adrénergique, ou léser les fibres noradrénergiques avec la 6-OHDA induit une augmentation de la 5-HT intracellulaire via une diminution de la libération de 5-HT (Geyer et Lee 1984).

Comme nous l'avons mentionné dans la partie décrivant la décharge des neurones sérotoninergiques, plusieurs auteurs ont montré que sans l'arrivée noradrénergique, détruite lors d'enregistrements sur des tranches de raphé, on n'observe plus d'activité pacemaker sérotoninergique (Trulson et Crisp 1984; Vandermaelen et Aghajanian 1983). Cependant, il semble que ces résultats ne sont pas reproduits lorsque les animaux ne sont pas anesthésiés avant décapitation (Trulson et Crisp 1984). Ainsi, bien qu'une forte activation noradrénergique a vraisemblablement lieu *in vivo*, elle n'est pas indispensable à l'activité intrinsèque des neurones sérotoninergiques du RD.

Contrôle noradrénergique par la transmission sérotoninergique

Réciproquement, des fibres sérotoninergiques partant du RD atteignent le LC (Azmitia et Segal 1978; Cedarbaum et Aghajanian 1978; Leger et Descarries 1978; Segal 1979), et plus précisément les régions péricoeruléaires (péri-LC) où l'on détecte des dendrites des neurones du LC (Pickel, Joh, et Reis 1977; Lu et al. 2012), et influencent l'activité noradrénergique de ce noyau.

Une étude montre que la 5-HT régule la synthèse de NA via un contrôle inhibiteur de la TH, enzyme limitante dans la synthèse de DA et NA, puisque des lésions du RD induisent une activité accrue de cette enzyme dans le LC (McRae-Degueurce et al. 1981; McRae-Degueurce et al. 1982). Les auteurs observent ainsi une très bonne corrélation entre les lésions provoquant une diminution significative de 5-HT et l'augmentation de l'activité de la TH.

Le contrôle sérotoninergique du LC passe par l'activation des récepteurs 5-HT_{1A/B} qui inhibe la réponse noradrénergique à l'activation glutamatergique provenant du noyau paragigantocellulaire (Aston-Jones et al. 1986a; Bobker et Williams 1989; Charléty et al. 1991). Par ailleurs, l'application d'agonistes des récepteurs sérotoninergiques (5-HT_{1A/B} notamment) au niveau du LC ne modifie pas l'activité des neurones noradrénergiques du LC, ce qui exclue un rôle de ces récepteurs dans ce noyau (Gorea et al. 1991).

Concernant le rôle des récepteurs 5-HT₂, plusieurs travaux montrent que leur activation induit une diminution de l'activité spontanée des neurones noradrénergiques du LC conjointement à une augmentation de l'activité noradrénergique induite par une stimulation sensorielle (Aghajanian 1980; Chiang et Aston-Jones 1993). L'inhibition de l'activité spontanée passe par les récepteurs 5-HT₂ exprimés sur les fibres GABAergiques provenant du noyau prepositus hypoglossi, puisque le blocage des récepteurs GABA dans le LC ainsi que des lésions du noyau prepositus hypoglossi préviennent cet effet (Gorea et al. 1991; Chiang et Aston-Jones 1993).

Il est difficile, à la vue de tous ces résultats, de nier la forte interaction qui existe entre les systèmes noradrénergique et sérotoninergique. Pourtant, ce lien non démenti est souvent négligé dans les théories qui expliquent les troubles neurobiologiques. Quelques hypothèses mettent pourtant en valeur ce lien, comme la théorie du « lien 5-HT/NA » sur les troubles affectifs (Sanders-Bush et Sulser 1987; Sulser et Sanders-Bush 1987; Blier 2003). Cette théorie postule que le lien entre ces deux transmissions est au cœur de l'effet des antidépresseurs. Elle se base sur le fait qu'après un traitement prolongé d'antidépresseurs, on observe une diminution à la fois de l'expression et de la fonction des récepteurs β -adrénergiques, phénomène non observé chez les animaux présentant une lésion neurotoxique par la 5,7-dihydroxytryptamine, qui réduit les taux de 5-HT (Mongeau, Blier, et de Montigny 1997). Cette observation n'est pas sans rappeler le « syndrome de l'ATV » décrit précédemment dans la partie dopaminergique. Ce syndrome, pour lequel une protection des fibres noradrénergiques est nécessaire afin d'observer un phénotype comportemental, suggère que les fibres noradrénergiques ascendantes sont responsables du développement d'une hyperactivité locomotrice en absence de fibres dopaminergiques ascendantes. On retrouve ici le même raisonnement, dans une théorie qui suggère que le lien 5-HT/NA pourrait expliquer l'effet des antidépresseurs.

Une autre théorie qui insiste sur l'importance de ce lien est la théorie du découplage, que nous allons exposer ci-dessous.

Théorie du découplage noradrénergique et sérotoninergique

La théorie du découplage propose d'expliquer les changements neurobiologiques persistants induits par une exposition répétée aux drogues. Elle regroupe principalement les résultats obtenus avec le modèle de la sensibilisation comportementale induite par toutes les drogues (Tassin 2008).

Cette hypothèse postule que chez des animaux naïfs aux drogues, l'activation de la transmission noradrénergique par des stimuli externes est immédiatement contrôlée par la transmission sérotoninergique, dont l'activation est elle-même contrôlée par les neurones noradrénergiques. Ce contrôle réciproque passerait par les récepteurs α_{1B} -adrénergiques et 5-HT_{2A} sérotoninergiques (Figure 11). Après une exposition répétée aux drogues, ce lien serait rompu de manière persistante, et l'activation des neurones noradrénergiques par un stimulus (comme la drogue) induirait une réponse exacerbée car non contrôlée par le système sérotoninergique associé. Le même mécanisme aurait lieu pour le système sérotoninergique. Voyons en détail les bases expérimentales de cette théorie.

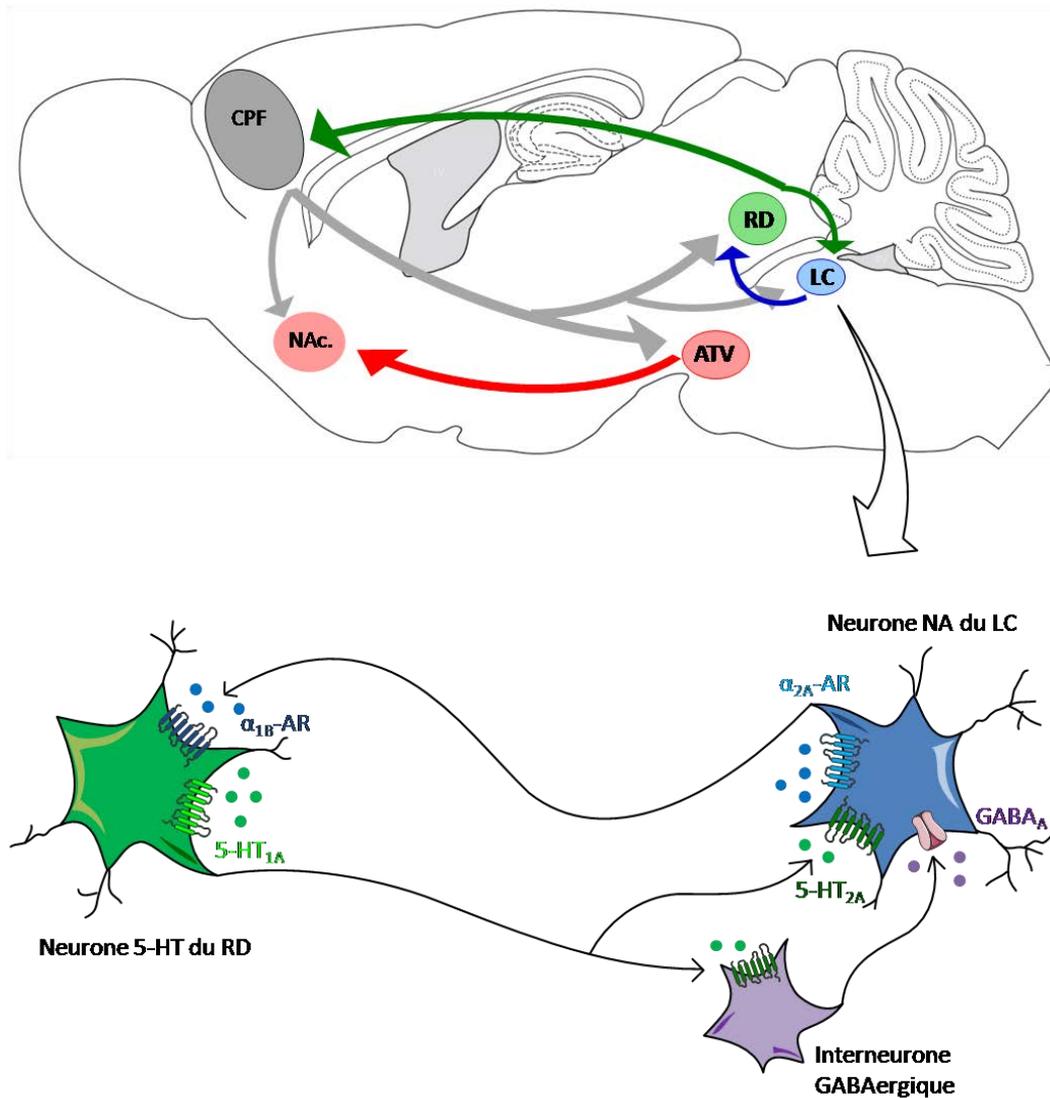


Figure 11 : Couplage schématique des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques, et leur intégration dans le réseau cortico-limbique.

5-HT : sérotonine ; ATV : aire tegmentale ventrale ; CPF : cortex préfrontal ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; LC : locus coeruleus ; NA : noradrénaline ; NAc : noyau accumbens ; RD : raphé dorsal

Inactivation du gène codant pour le récepteur α_{1B} -adrénergique (α_{1B} -AR) et blocage pharmacologique de ce récepteur

L'hyperactivité locomotrice induite par des injections aiguës d'amphétamine, de cocaïne et de morphine est très réduite chez les souris qui n'expriment plus le gène codant pour le récepteur α_{1B} -adrénergique (α_{1B} -AR KO) (Drouin, Darracq, et al. 2002). De plus, des injections répétées de ces drogues induisent une sensibilisation comportementale nettement réduite par rapport aux animaux exprimant le récepteur α_{1B} -adrénergique. Dans ce même travail, les auteurs montrent que les propriétés récompensantes de la cocaïne et de la morphine, mesurées avec un test de préférence orale et de préférence de place conditionnée, ne sont plus observées chez les α_{1B} -AR KO.

De manière intéressante, les souris α_{1B} -AR KO présentent un taux de DA basale diminuée d'environ 30% par rapport aux contrôles. De plus, l'injection d'amphétamine (3 mg/kg, i.p.) n'induit plus de libération de DA dans le NAc. ni de réponse locomotrice chez les α_{1B} -AR KO (Auclair et al. 2002). Ces résultats suggèrent l'existence d'un contrôle activateur tonique de la noradrénaline sur la dopamine à l'état basal et en réponse à l'amphétamine. Or l'amphétamine induit une libération de NA dans les zones de projection du LC, dont le cortex, où les récepteurs α_{1B} -AR sont fortement exprimés (Bylund 1992). Au vu du fort contrôle cortical exercé sur l'ATV décrit précédemment, on peut suggérer que la libération de DA est induite par l'activation des voies glutamatergiques descendantes après l'activation des α_{1B} -AR par la libération noradrénergique corticale.

Néanmoins, l'injection d'une dose deux fois plus importante d'amphétamine (6 mg/kg) induit une faible réponse locomotrice ainsi qu'une tendance à la libération de DA dans le NAc. (Auclair et al. 2002). De plus, le blocage systémique ou cortical des α_{1B} -AR réduit l'hyperlocomotion induite par une injection aiguë de morphine, mais ce blocage ne bloque pas l'induction ni l'expression de la sensibilisation à cette même drogue (Drouin et al. 2001).

Le blocage pharmacologique des récepteurs α_{1B} -AR par la prazosine induit une diminution de 80% de la réponse locomotrice à la morphine et inhibe la libération de DA dans le NAc chez des souris contrôles. Les souris α_{1B} -AR KO, injectées ou non avec la prazosine, ne présentent cependant qu'une diminution de 30% de la réponse locomotrice à la morphine (Auclair, Drouin, et al. 2004). Ces réponses aiguës à la morphine diffèrent donc des réponses chez des animaux sensibilisés. En effet, une injection de prazosine avant la morphine chez des animaux sensibilisés à la morphine exprimant les récepteurs α_{1B} -AR

induit une réponse locomotrice diminuée de 30%, équivalente à la réponse des souris α_{1B} -AR KO dans les mêmes conditions. Les animaux sensibilisés à la morphine répondent donc comme s'ils n'exprimaient plus les récepteurs α_{1B} -AR.

Ces résultats montrent que l'injection répétée de drogues impacte fortement l'implication des récepteurs α_{1B} -AR et, plus généralement, l'effet de la transmission noradrénergique avec les autres systèmes qui interagissent avec celle-ci.

La composante sérotoninergique : blocage pharmacologique du récepteur 5-HT_{2A} sérotoninergique et inactivation du gène codant pour ce récepteur (5-HT_{2A} KO)

Chez les souris α_{1B} -AR KO, l'injection de SR 46349B, antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2A}, avant l'injection de morphine bloque les effets de cette drogue à tous les niveaux. On n'observe plus de libération de DA dans le NAc. ni d'hyperlocomotion. La réponse aux injections répétées est également touchée, puisqu'on n'observe plus la sensibilisation à la morphine, l'amphétamine ou la cocaïne (Auclair, Drouin, et al. 2004).

Il semble donc que deux composantes, la noradrénaline via les récepteurs α_{1B} -AR et la sérotonine via les récepteurs 5-HT_{2A}, contrôlent entièrement la réponse locomotrice et la libération de DA dans le NAc. induites par les psychostimulants et les opiacés.

L'injection aiguë d'amphétamine induit une libération de NA et une réponse locomotrice plus importante chez les souris 5-HT_{2A} KO, réponse totalement bloquée par une injection de l'antagoniste des récepteurs α_{1B} -AR, la prazosine à 1mg/kg (Salomon et al. 2006; Salomon et al. 2007). La répétition d'injections d'amphétamine sensibilise néanmoins les souris 5-HT_{2A} KO au même niveau que les souris exprimant ces récepteurs. Chez les souris sensibilisées, la dose de prazosine doit-être multipliée par 3 pour bloquer la réponse locomotrice à l'amphétamine des souris 5-HT_{2A} KO. Ici encore, les injections répétées d'amphétamine changent l'effet de la prazosine et donc le rôle des récepteurs α_{1B} -AR chez les animaux sensibilisés (Tassin 2008).

Passage de l'état naïf à l'état sensibilisé

Il est important de noter que l'effet du blocage de ces récepteurs n'est pas le même chez des souris naïves en comparaison à des souris sensibilisées qui ont reçu des injections répétées de drogues. En effet, la prazosine diminue de 77% la réponse locomotrice induite par la morphine chez les animaux naïfs, et ce chiffre chute à 37% chez les animaux sensibilisés. Le SR 46349B, antagoniste 5-HT_{2A} bloquant la composante 5-HT, induit une

inhibition de 80% chez des souris naïves, ce chiffre restant aux environs de 70% chez des animaux sensibilisés à la morphine (Auclair, Drouin, et al. 2004). L'effet combiné de ces deux antagonistes est donc plus qu'additif, puisqu'il atteint près de 160% chez les animaux naïfs, tandis qu'il reste voisin de 100% chez les souris sensibilisées. On observe donc un changement de rapport entre les systèmes noradrénergique et sérotoninergique après le traitement répété aux drogues.

Ainsi, le blocage pharmacologique d'un système (noradrénergique) à l'état naïf diminue également l'autre système (sérotoninergique), ce qui suggère un lien positif entre les deux. Mais l'absence du récepteur d'un système induit une réponse excessive de l'autre système, ce qui révèle un contrôle inhibiteur. Ces résultats suggèrent que le lien entre la transmission noradrénergique et sérotoninergique n'est pas quantifiable en termes d'« activation » ou « inhibition », mais plutôt en termes de contrôle réciproque, qui s'active lors de stimuli mais qui permet d'empêcher une activation excessive.

Les récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT_{2A} sont d'ailleurs couplés au même type de protéines Gq qui activent la phospholipase C et activent la PKC. Leur expression colocalise fortement au niveau du CPF (Bylund 1992; Hoyer, Hannon, et Martin 2002) et leur activation induit la même libération de glutamate au niveau du cortex (Marek et Aghajanian 1999).

L'exposition répétée aux drogues romprait ce couplage et les deux transmissions deviendraient indépendantes.

En accord avec cette hypothèse, les animaux sensibilisés qui ont reçu des injections répétées d'amphétamine, morphine, cocaïne, alcool ou MDMA, présentent une hyper-réactivité en réponse à un stimulus, ou sensibilisation neurochimique. En effet, lorsque l'on mesure la libération de NA au niveau du CPF chez des souris sensibilisées à l'amphétamine, vigiles et libres de leur mouvement, une injection systémique d'amphétamine, qui libère la NA, induit une réponse de plus de 2000% du taux de base, la réponse d'un animal naïf se limitant à une libération de 500%. La libération de 5-HT dans cette même région, après une injection de para-chloro-amphétamine (PCA), qui libère la 5-HT, atteint 1000% du taux basal chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine, et reste à 500% chez les animaux contrôles (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008; Doucet et al. 2013; Lanteri et al. 2013).

Ce phénomène se maintient à long terme, puisqu'il est mesuré au moins un mois après la dernière injection et est fortement corrélé temporellement à la réponse comportementale.

Cette hyper-réactivité est complètement inhibée par un prétraitement par des antagonistes des récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT_{2A}, respectivement la prazosine et le SR 46349B.

Mentionnons que, malgré la diversité de mécanismes d'action des drogues, cette hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique est observée pour chaque sensibilisation, ce qui suggère qu'il peut s'agir d'un phénomène commun à tous les produits toxicomanogènes.

Rôle de la dopamine dans le découplage?

Bien que toutes les drogues induisent la libération de DA au niveau du NAc. (Di Chiara et Imperato 1988), il semble que cet effet, qui se reproduit à chaque injection lors de la sensibilisation comportementale, ne soit pas impliqué dans le développement de la sensibilisation ni comportementale ni neurochimique. Ainsi, un traitement répété au GBR 12783, bloqueur spécifique du DAT, n'induit pas d'hyper-réactivité locomotrice ni d'hyper-réactivité noradrénergique ou sérotoninergique (Drouin, Blanc, et al. 2002; Lanteri et al. 2008).

Au-delà d'une connexion anatomique bien documentée, les transmissions noradrénergiques et sérotoninergiques présentent aussi un lien fonctionnel. En effet, la NA et la 5-HT exercent un contrôle réciproque sur l'activité neuronale et sur la libération des neurotransmetteurs. On observe aussi un rôle homologue sur les effets de ces neuromodulateurs au niveau des terminaisons, comme le montre la libération de glutamate au niveau du cortex induite par l'activation des récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT_{2A}.

Il semblerait qu'en conditions physiologiques, les systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques se contrôlent mutuellement et permettent de répondre à des stimuli de manière régulée. L'hypothèse du découplage propose qu'après une exposition répétée aux drogues, cette interaction passant par les récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT_{2A} au niveau du LC et du RD, serait rompu.

Ainsi, en absence d'un de ces récepteurs ou chez des animaux sensibilisés, les réponses noradrénergiques et sérotoninergiques sont exacerbées car non régulées par le système déficient.

Nous avons introduit les réseaux neurobiologiques qui ont un rôle démontré dans la mise en place et le développement de la toxicomanie. Une place particulière a été donnée aux transmissions noradrénergiques et sérotoninergiques, dont l'hyper-réactivité qui se maintient à long terme est le point de départ de cette thèse. Avant de présenter les résultats obtenus, nous allons exposer les problématiques de ce travail.

Problématiques

Problématiques

→ Quelle est la persistance de la sensibilisation comportementale induite par de faibles doses d'amphétamine ?

Dans ce travail, la première question posée concerne le modèle animal utilisé, celui de la sensibilisation comportementale. En effet, bien que de nombreux travaux se fondent sur ce modèle, peu de travaux se sont intéressés au maintien de la réponse, citant régulièrement les auteurs ayant montré une sensibilisation se maintenant jusqu'après un an de sevrage chez les rats (Paulson, Camp, et Robinson 1991).

Puisque nos expériences sont toutes effectuées sur des souris (à l'exception des enregistrements électrophysiologiques des neurones noradrénergiques du LC réalisés sur des rats) et que nous étudions les modifications à long terme induites par l'amphétamine à faible dose (2mg/kg), la première étape était de définir précisément la durée du maintien de la sensibilisation (Publication n° 1).

→ Quels sont les mécanismes moléculaires qui entretiennent l'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique induite par les psychostimulants?

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, les résultats précédents ont montré une corrélation très forte entre la sensibilisation comportementale et une potentialisation des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques en réponse à des molécules induisant la libération de ces neurotransmetteurs. Cette sensibilisation neurochimique semble jouer un rôle important dans la réponse comportementale, puisque le blocage des récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT_{2A} pendant les effets des drogues bloque la sensibilisation comportementale.

L'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique étant toujours observée après un mois de sevrage, notre propos a été d'étudier les mécanismes qui maintiennent l'hyper-réactivité. Jusqu'à présent, les mécanismes ont été élucidés pour l'amphétamine (Publication n° 2) et pour le MDMA (Publication n° 3), dérivé amphétaminique entactogène le plus abusé.

Postérieurement à la présentation des résultats sous la forme d'articles, nous discuterons en détail les résultats, en les comparant à la littérature existante sur le sujet.

Au moment de l'écriture de cette thèse, l'article n° 1 est soumis, le n°2 et 4 sont publiés et le troisième est en cours de rédaction.

Publications

Publication n°1 :

Empreinte cachée dans la sensibilisation comportementale

Publication n°1 : Empreinte cachée dans la sensibilisation comportementale

Auteurs : Ana-Clara Bobadilla, Gérard Godeheu et Jean-Pol Tassin

Statut : Soumis

Résumé

Il est couramment admis que la sensibilisation comportementale est un modèle qui se maintient à très long terme, observable jusqu'à un an après les dernières prises de drogue. Cependant, les travaux de la littérature définissent un animal comme « sensibilisé » suivant deux mesures opposées : les stéréotypies et l'activité locomotrice (fortement réduite lorsque l'animal est en phase de stéréotypie). Ici, nous concentrons les expériences sur la mesure de l'activité locomotrice en utilisant délibérément des doses d'amphétamine qui n'induisent pas de stéréotypies. Nous avons donc étudié le maintien de la sensibilisation comportementale à de faibles doses d'amphétamine (2mg/kg) ainsi que le retour des animaux à un niveau de réponse sensibilisé.

Résultats principaux

1. La sensibilisation à l'amphétamine à faibles doses est maintenue pendant un mois. A partir de 2 mois de sevrage et jusqu'à au moins 4 mois, les animaux présentent une sensibilisation équivalente à une deuxième injection d'amphétamine, soit une diminution de 60% de la réponse après un mois de sevrage.
2. Lors d'un rappel d'amphétamine le lendemain du jour test, toutes les souris répondent au niveau d'animaux sensibilisés et ce, même après le plus long sevrage.

Conclusions

Dans nos expériences, le maintien de la sensibilisation comportementale à l'amphétamine est moins stable que ce qui est mesuré dans la littérature. Cependant, la diminution de l'activité locomotrice est rapidement réversée après

une seconde exposition à la drogue, ce qui suggère la mise en place de modifications biologiques à long terme non visibles d'un premier abord en mesurant l'activité locomotrice.

Hidden imprint in behavioral sensitization

Ana-Clara Bobadilla, Gérard Godeheu and Jean-Pol Tassin

Laboratoire de Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central,
Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7224, Inserm UMR S952, Paris,
France

Ana-Clara Bobadilla, MS

Gérard Godeheu, Ing

Jean-Pol Tassin, PhD

Correspondence should be addressed to Dr Jean-Pol Tassin, Laboratoire de
Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, Université Pierre et
Marie Curie, 9 quai Saint Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.

Phone number : +33 1 44 27 91 34

Fax number : +33 1 44 27 25 08

E-mail: jean-pol.tassin@snv.jussieu.fr

Running title: Hidden imprint behavior

Abstract: 100 words

Main text (including references and figure legends): 1462 words

References: 10

Figures: 2

Supplemental information: None

Abstract

In rodents, drugs of abuse induce behavioral sensitization, a long-lasting increase in locomotor activity. Using a low dose of amphetamine (2 mg/kg, i.p.) to distinguish between locomotor response and stereotypy, two competitive behaviors, we show a 3.5-fold potentiation of the first day response after four daily injections and a progressive decrease which stabilizes at a 1.4-fold level after 3 months of withdrawal. However, one single injection of drug reactivated the response to a 3.7-fold potentiated level, even after a 4-month withdrawal. Thus, “hidden” neuronal modifications induced by drug administration persist and can reappear at their initial level even long withdrawal.

Key words:

Amphetamine
Locomotor activity
Long-term effects
Low dose
Relapse
Withdrawal

Main Text

When they relapse, drug addicts return rapidly to their initial consumption, even after long periods of abstinence. This indicates that subliminal neuronal modifications linger despite the disappearance of craving and compulsory behaviors. Here, our analysis reveals that this hidden remaining sensitivity may be demonstrated in rodents using the preclinical model of behavioral sensitization.

In 1973, Tilson and Rech have observed that repeated low doses of amphetamine paradoxically induce a gradual increase of locomotor response in the rat (Tilson and Rech, 1973). This inverse tolerance, called behavioral sensitization, was also described with other drugs of abuse (Babbini and Davis, 1972; Post and Rose, 1976) and has become the core principle of the incentive-sensitization theory (Robinson and Berridge, 1993). Initially restricted to locomotor activity, behavioral sensitization was progressively extended to increased stereotypy induced by repeated high doses or self-administration in long-access sessions of psychostimulants (Ferrario *et al*, 2005). Stereotypy was finally used as the only index to demonstrate that behavioral sensitization could last for up to one year after drug withdrawal in rats (Paulson *et al*, 1991), a finding which suggests that behavioral sensitization is irreversible and that drug-induced neurocircuitry modifications may be long-lasting in drug addicts.

However, there is a competitive relationship between stereotypy and locomotion (Segal and Mandell, 1974), which are possibly controlled by different neuronal systems (Vanderschuren and Pierce, 2010). For example, sensitization of stereotyped head movements was observed in animals self-administering cocaine in long-access sessions whereas no psychomotor activity was detected (Ferrario *et al*, 2005). We therefore focused on the maintenance of locomotor sensitization using a dose of psychostimulant that fails to induce stereotypy in mice. Locomotor

sensitization induced by four daily injections of amphetamine at 2 mg/kg (i.p.) was assessed after 1 to 4 month(s) of withdrawal. Moreover, we also evaluated the locomotor response to an additional injection of amphetamine a day after the challenge injection.

Detailed procedures for locomotor activity are published (Doucet *et al*, 2013). Briefly, fifty eight male C57Bl/6J inbred mice (26-32 g, Charles River Laboratories) were introduced into a circular corridor (Imetronic, Pessac, France) and locomotor activity was counted when animals traveled along one quarter and expressed as the number of quarter turns / 5 min. After habituation, mice were then injected with D-amphetamine sulfate (2mg/kg, i.p., expressed as salt) or saline, and with amphetamine (2mg/kg, i.p.) the challenge day. During sensitization, mice were injected once a day for four consecutive days. Locomotor data were analyzed using ANOVA analysis and Tukey-Kramer *post-hoc* test. Each group contained 14-16 animals for the first injection after withdrawal. The sensitization graph is the combination of all groups (n=56-58 animals/group). Values of $p < .05$ were considered significant.

Four consecutive injections of amphetamine induced a robust locomotor sensitization (two-way ANOVA, significant injections x withdrawal interaction, $F_{(15,200)} = 6.417$, $p < 0.001$; Tukey-Kramer *post-hoc* test: day 1-day 2, day 2-day 3, day 1-day 4, $p < .05$), whereas saline-treated mice only showed a small locomotor response after saline injections as expected (Figures 1 and 2).

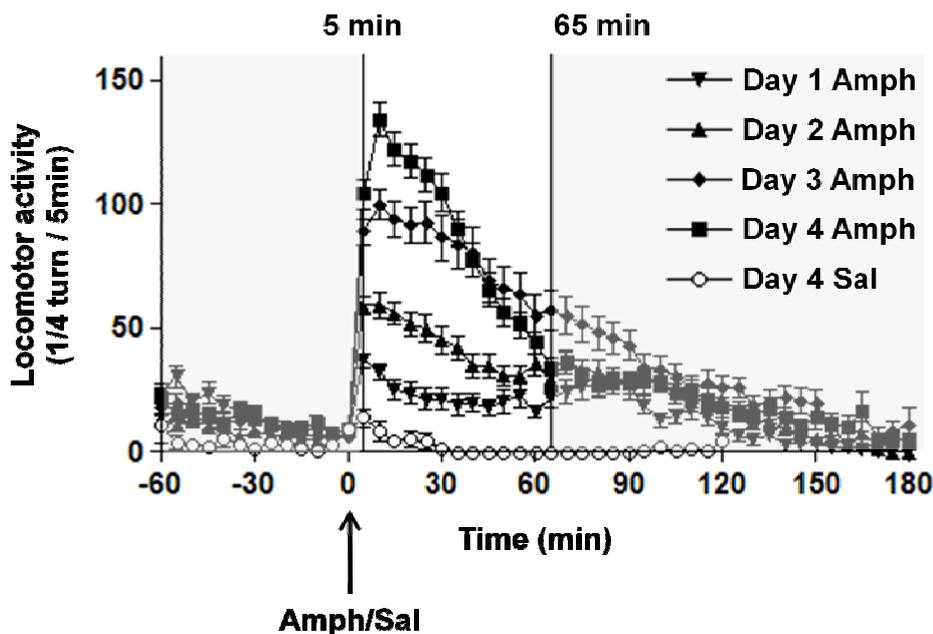


Figure 1: Behavioral sensitization to amphetamine.

Mice received one injection of amphetamine (“Amph” 2mg/kg, i.p.) or saline (“Sal”, i.p.) for four consecutive days. Statistical analyses (three-way ANOVA) reveals a significant injection day (day 1, 2, 3 or 4) x time (repeated measures) x treatment (sal or amph) interaction, $F_{(36,3396)} = 3.349$, $p < 0.0001$. Two-way ANOVA (two levels: time (repeated measurements) x treatment (amph or saline)) reveals a significant effect of treatment over time ($F_{(12,3468)} = 13.953$, $p < 0.0001$). Two-way ANOVA (two levels: time (repeated measurements) x injection day (1, 2, 3 or 4)) reveals a significant effect of the injection days over time ($F_{(36,3444)} = 10.770$, $p < 0.0001$). Tukey-Kramer post-hoc test shows a significant difference between day 1- day 3, day 1- day 4 and day 2- day 3, day 2- day 4. For the interest of clarity, only the 4th injection of saline was shown in the figure. For figure 2, only locomotion from 5 to 65 min was taken into account.

Independent groups of 14 to 16 mice were then tested at different times. After a one-month withdrawal (*i.e.*, 28 days), amphetamine challenge remarkably induced a locomotor response as high as for the last injection (Figure 2). However, after a two-month withdrawal, amphetamine-induced response was 60% lower than the one-month withdrawal injection (one-way ANOVA, withdrawal as factor, $F_{(3,53)} = 11.021$, Tukey-Kramer post-hoc test day 28-day 56, $p < .05$), which revealed a return to the sensitization of the second injection (significantly different from the 1st injection, Tukey-Kramer post-hoc test after the two-way ANOVA, day1-days 56, 84, 112; $p < 0.05$). This level of response was maintained for up to 4 months of withdrawal.

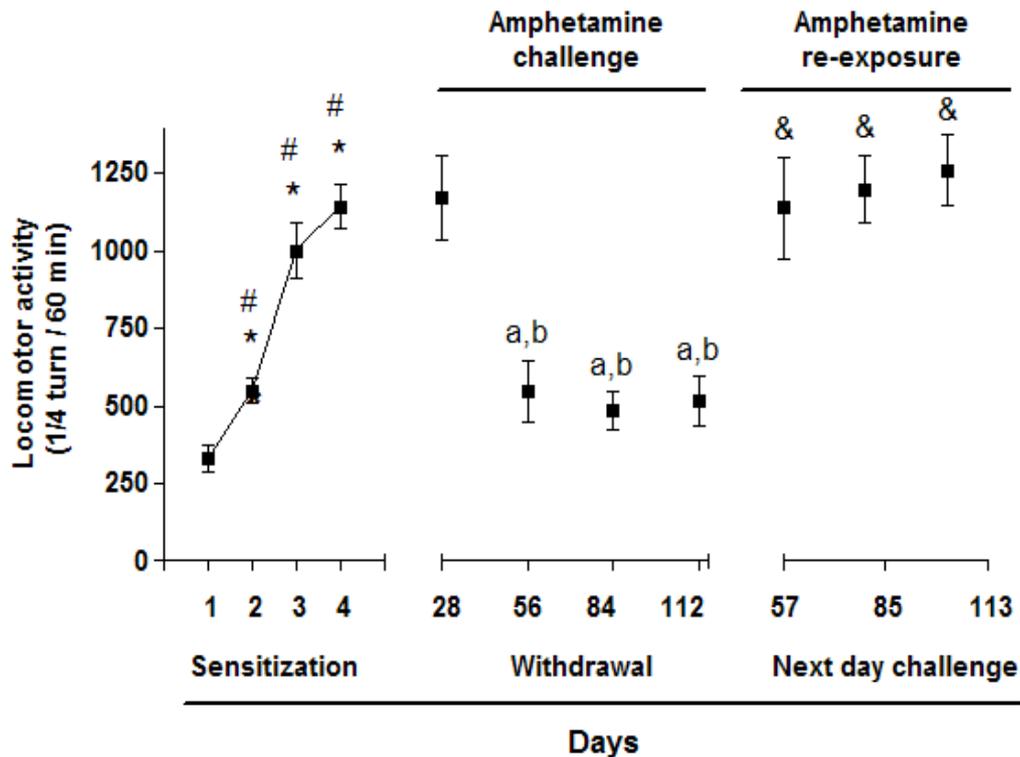


Figure 2: Time-dependent decrease and reactivation of amphetamine-induced locomotor activity after behavioral sensitization. Statistical analyses (two-way ANOVA) reveals a significant withdrawal x injection interaction ($F_{(15,200)}=6.417$; $p<0.0001$). Tukey/Kramer post-hoc analysis shows a significant increase during sensitization ($*p<0.05$ between day 1 and day 2, day 3 and day 4; #, $p<0.05$ between day 2 and day 3, day 4). It also reveals a significant difference between day 1 and days 56, 84 and 112 (a, $p<0.05$). Next-day challenge injections are significantly different from test day injections (&, $p<0.05$). There is no significant difference between day 2 and days 56, 84 and 112 nor between day 4 and none of the next-day challenges. Simple effect analyses within each injection (one-way ANOVA) shows a significant effect of withdrawal for amphetamine challenge ($F_{(3,53)}=11.021$; $p<0.0001$). Tukey/Kramer post-hoc test reveals a significant difference between day 28 and day 56, 84 and 112 (b, $p<0.5$). For all injections, [Amphetamine]= 2mg/kg, i.p.

Interestingly, no matter how long the withdrawal is, all groups exhibit a high, sensitized response to an amphetamine injection on the day after the challenge (Figure 2, two-way ANOVA, significant injections x withdrawal interaction $F_{(15,200)} = 6.417$, $p<0.001$. Tukey-Kramer post-hoc test day 4-next-day challenge, $p>0.05$).

Our data thus indicate that locomotor sensitization induced by amphetamine decreases by 60% after a two-month withdrawal and then remains constant for at

least two further months following this initial decrease. Interestingly, a single additional injection of amphetamine results in a complete locomotor sensitization. Although locomotor sensitization seems partially reversible, “hidden” neuronal modifications induced by drug administration persist for long and may reappear at their initial level even after months of withdrawal. These results tightly match with, for example, the clinical reality of smokers. Indeed, while the sensitivity to relapse is strong after quitting and decreases with time, the relapse triggers an increase in cigarette consumption that rapidly returns to former use.

We have previously proposed that these neuronal modifications are linked to long-lasting noradrenergic and serotonergic hyperreactivity sustained by a desensitization of inhibitory autoreceptors (Doucet *et al*, 2013; Lanteri *et al*, 2013). However, other non exclusive hypothesis of dopaminergic sensitization (Robinson and Berridge, 1993) cannot be excluded. Overall, our data shed new light on the model of behavioral sensitization, as it focuses on permanent hidden behavioral traces induced by low doses of amphetamine.

Authors Contribution

ACB and JPT designed the study, interpreted the data and wrote the paper. ACB and GG performed the animal training.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Jamilé Hazan for editing the manuscript. This work was supported by the French Ministry of National Education and Research (ACB) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (JPT, GG).

References

- Babbini M, Davis WM (1972). Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. *Br J Pharmacol* **46**: 213.
- Doucet EL, Bobadilla A-C, Houades V, Lanteri C, Godeheu G, Lanfumey L, *et al* (2013). Sustained Impairment of α 2A-Adrenergic Autoreceptor Signaling Mediates Neurochemical and Behavioral Sensitization to Amphetamine. *Biol Psychiatry* **74**: 90–98.
- Ferrario CR, Gorny G, Crombag HS, Li Y, Kolb B, Robinson TE (2005). Neural and Behavioral Plasticity Associated with the Transition from Controlled to Escalated Cocaine Use. *Biol Psychiatry* **58**: 751–759.
- Lanteri C, Doucet EL, Hernández Vallejo SJ, Godeheu G, Bobadilla A-C, Salomon L, *et al* (2013). Repeated exposure to MDMA triggers long-term plasticity of noradrenergic and serotonergic neurons. *Mol Psychiatry* doi:10.1038/mp.2013.97.
- Paulson P, Camp D, Robinson T (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacol Berl* **103**: 480–92.
- Post RM, Rose H (1976). Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. *Nature* **260**: 731–2.
- Robinson TE, Berridge KC (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**: 247–91.
- Segal DS, Mandell AJ (1974). Long-term administration of d-amphetamine: Progressive augmentation of motor activity and stereotypy. *Pharmacol Biochem Behav* **2**: 249–255.
- Tilson HA, Rech RH (1973). Conditioned drug effects and absence of tolerance to d-amphetamine induced motor activity. *Pharmacol Biochem Behav* **1**: 149–153.
- Vanderschuren LJM, Pierce RC (2010). Sensitization processes in drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci* **3**: 179–195.

Publication n°2 :

Altération persistante de la voie de signalisation des autorécepteurs α_{2A} -Adrénrgiques et sensibilisation comportementale à l'amphétamine

Publication n°2 : Altération persistante de la voie de signalisation des autorécepteurs α_{2A} -Adrénrgiques et sensibilisation comportementale à l'amphétamine.

Auteurs : Ana-Clara Bobadilla*, Emilie L. Doucet*, Vanessa Houades, Christophe Lanteri, Gérard Godeheu, Laurence Lanfumey, Susan J. Sara et Jean-Pol Tassin

* Ces auteurs ont participé de manière équivalente à ce travail

Statut : Publié dans le journal « Biological Psychiatry », 2013

Résumé

L'injection répétée d'une même dose de drogue induit chez les rongeurs une potentialisation de la réponse locomotrice, phénomène qualifié de sensibilisation comportementale. En parallèle à cette sensibilisation, on observe également une hyper-réactivité du système noradrénergique (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008). Cette hyper-réactivité est observée notamment en mesurant la libération de noradrénaline (NA) au niveau du cortex préfrontal (CPF) chez des souris éveillées après une injection d'amphétamine, qui libère la NA.

De manière intéressante, l'hyper-réactivité noradrénergique est fortement corrélée à la sensibilisation comportementale et se maintient également à long terme, puisqu'elle peut être observée après un mois de sevrage.

L'objectif de ce travail était de comprendre les mécanismes par lesquels l'hyper-réactivité observée chez les animaux sensibilisés se maintient à long terme. Au moins deux hypothèses, non exclusives l'une de l'autre, sont envisageables. La première concerne un renforcement du contrôle activateur glutamatergique que les neurones pyramidaux du cortex exercent sur les neurones noradrénergiques du Locus Coeruleus (LC). L'amphétamine stimulerait ces voies descendantes qui à leur tour, induiraient une réponse plus forte à la stimulation noradrénergique. La seconde hypothèse de travail se rapporte à une altération de l'auto-inhibition noradrénergique par les injections répétées d'amphétamine. Nous avons choisi d'approfondir cette dernière hypothèse.

Le système noradrénergique dispose en effet de son propre rétrocontrôle inhibiteur, qui passe par les récepteurs α_{2A} -adrénergiques (α_{2A} -AR). Comme il a été décrit précédemment dans ce manuscrit, ces récepteurs sont exprimés en pré-synaptique au niveau des corps cellulaires des neurones noradrénergiques (autorécepteurs) mais aussi en post-synaptique dans certaines régions de projection du LC comme le CPF. Lorsque les autorécepteurs sont activés par la NA libérée, la voie de signalisation $G_{\alpha_i/o}$ est activée, aboutissant ainsi à l'inhibition de l'activité noradrénergique.

Résultats principaux

Avant même de regarder l'état des α_{2A} -AR chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine, nous avons voulu vérifier qu'un dysfonctionnement de ces récepteurs pouvait reproduire une réponse noradrénergique potentialisée.

1. Il est possible de retrouver l'hyper-réactivité noradrénergique en bloquant les α_{2A} -AR. En effet, une injection d'amphétamine précédée d'une injection systémique d'efaroxan, un antagoniste des α_{2A} -AR, induit une libération de NA potentialisée par rapport à la libération induite par l'amphétamine seule.

Afin d'examiner l'état de sensibilité des α_{2A} -AR après des injections répétées d'amphétamine, nous avons mesuré les propriétés électrophysiologiques basales et stimulées des neurones noradrénergiques du LC après un mois de sevrage.

2. Le taux de décharge noradrénergique basal est augmenté chez les animaux sensibilisés par rapport aux contrôles. De plus, la latence pour atteindre 50% d'inhibition induite par l'injection de clonidine, un agoniste des α_{2A} -AR, est deux fois plus importante chez les animaux sensibilisés que chez les contrôles.

Ces expériences, techniquement très difficiles chez la souris du fait de la taille réduite du LC, ont exceptionnellement été effectuées chez le rat par le Dr. Vanessa Houades, sous l'encadrement du Prof. Susan Sara.

La décharge des neurones n'étant pas toujours corrélée à la libération de neurotransmetteur (Romanò et al. 2013), nous avons mesuré la diminution de libération de NA dans le CPF après une injection systémique de clonidine.

3. Chez les animaux sensibilisés après un court ou un long sevrage, la clonidine n'induit plus de diminution de la libération de NA observée chez les animaux contrôles.

Nous avons par la suite cherché le mécanisme de la désensibilisation fonctionnelle des α_{2A} -AR.

4. On n'observe pas de différence d'expression des α_{2A} -AR chez les animaux sensibilisés, mais l'expression des protéines $G_{\alpha i1}$ et $G_{\alpha i2}$, deux sous-types de protéines $G_{\alpha i}$ couplées aux α_{2A} -AR, diminuent dans le LC des animaux sensibilisés.

Enfin, il était important de savoir si le fonctionnement des α_{2A} -AR pendant l'effet de l'amphétamine pouvait modifier la sensibilisation.

5. Bloquer les α_{2A} -AR avant les injections quotidiennes d'amphétamine avec l'efaroxan facilite la sensibilisation, tandis que les inhiber avec la clonidine la bloque totalement.

Conclusions

Tout d'abord, il est intéressant de noter qu'en bloquant les α_{2A} -AR chez des animaux naïfs, on retrouve l'hyper-réactivité noradrénergique. Ceci corrobore l'idée qu'un dysfonctionnement de ses récepteurs peut être à la base de l'hyper-réactivité noradrénergique et confirme le contrôle tonique des autorécepteurs α_{2A} -AR (Gobert et al. 2004).

Les animaux ayant reçu des injections répétées d'amphétamine présentent des α_{2A} -AR désensibilisés à long terme. Cette désensibilisation n'est pas due à une diminution d'expression des récepteurs, mais à une diminution d'expression du second messenger, les sous-unités $G_{\alpha i1-2}$, qui se maintient après un mois de sevrage.

Enfin, les α_{2A} -AR semblent être une cible indirecte de l'amphétamine, puisque la modification du fonctionnement de ces récepteurs avant les injections influence le développement de la sensibilisation comportementale.

Sustained Impairment of α_{2A} -Adrenergic Autoreceptor Signaling Mediates Neurochemical and Behavioral Sensitization to Amphetamine

Emilie L. Doucet, Ana-Clara Bobadilla, Vanessa Houades, Christophe Lanteri, Gérard Godeheu, Laurence Lanfumey, Susan J. Sara, and Jean-Pol Tassin

Background: In rodents, drugs of abuse induce locomotor hyperactivity, and repeating injections enhance this response. This effect, called behavioral sensitization, persists months after the last administration. It has been shown that behavioral sensitization to amphetamine develops parallel to an increased release of norepinephrine (NE) in the prefrontal cortex (PFC).

Methods: Rats and mice were repeatedly treated with amphetamine (1 or 2 mg/kg intraperitoneally, respectively) to obtain sensitized animals. The NE release in the PFC was measured by microdialysis in freely moving mice ($n = 55$). Activity of locus coeruleus (LC) noradrenergic neurons was determined in anaesthetized rats ($n = 15$) by *in vivo* extracellular electrophysiology. The α_{2A} -adrenergic autoreceptor (α_{2A} -AR) expression was assessed by autoradiography on brain slices, and G α i proteins expression was measured by western blot analysis of LC punches.

Results: In sensitized rats LC neurons had a higher spontaneous firing rate, and clonidine—an α_{2A} -adrenergic agonist—inhibited LC neuronal firing less efficiently than in control animals. Clonidine also induced lower levels of NE release in the PFC of sensitized mice. This desensitization was maintained by a lower density of G α i1 and G α i2 proteins in the LC of sensitized mice rather than weaker α_{2A} -AR expression. Behavioral sensitization was facilitated by α_{2A} -AR antagonist, efaroxan, during amphetamine injections and abolished by clonidine treatment.

Conclusions: Our data indicate that noradrenergic inhibitory feedback is impaired for at least 1 month in rats and mice repeatedly treated with amphetamine. This work highlights the key role of noradrenergic autoreceptor signaling in the persistent modifications induced by repeated amphetamine administration.

Key Words: G α i proteins, *in vivo* microdialysis, locus coeruleus cell recording, neurochemical sensitization, norepinephrine, psychostimulants

The development of effective treatments against drug addiction requires deeper knowledge of the long-term neurobiological modifications induced by chronic exposure to frequently abused drugs. Amphetamine is a psychostimulant that is widely abused and has long-lasting effects on the central nervous system. Its consumption disrupts the social and professional life of users who become addicted, and relapse is common, even after prolonged abstinence.

In rodents, locomotor responses to both psychostimulants and opiates are progressively and persistently enhanced by repeated exposure. This phenomenon, called behavioral sensitization, has been shown to be a suitable model for studying the modifications induced by drugs of abuse. Behavioral sensitization

From the Laboratoire de Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central (ELD, A-CB, VH, CL, GG, J-PT), Team Physiopathology of Addiction and Relapse, Université Pierre et Marie Curie; Centre de Recherche en Psychiatrie et Neurosciences (LL); and the Laboratoire de Physiologie de la Perception et de l'Action (SJS), Collège de France, Paris, France.

Authors ELD and ACB contributed equally to this work.

Address correspondence to Jean-Pol Tassin, Ph.D., Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, Team Physiopathology of Addiction and Relapse, INSERM UMRS 952, CNRS UMR 7224, Paris 75005, France; E-mail: jean-pol.tassin@snv.jussieu.fr.

Received Aug 22, 2012; revised Nov 9, 2012; accepted Nov 29, 2012.

0006-3223/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.11.029>

is long-lasting, specific to addictive compounds, and is thought to play a key role in the development of drug-seeking and drug-taking behaviors and in cue-induced relapse (1,2).

We previously showed, in C57BL/6J mice, that repeated injections of amphetamine led not only to behavioral sensitization but also to a neurochemical sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons that persisted for at least 1 month after withdrawal. Similar findings have been reported for repeated exposure to most commonly abused drugs, including cocaine, morphine, ethanol, and nicotine in presence of monoamine oxidase inhibitors (3–5). After repeated injections, an amphetamine challenge induces a large increase in cortical extracellular norepinephrine (NE) levels that is correlated with a potentiation of drug-induced increases in locomotor activity.

In this study, we focused on the mechanisms underlying the maintenance of this long-term noradrenergic hyperreactivity. There are at least two possible non-mutually exclusive explanations for this sensitization: either amphetamine enhances the excitatory input to noradrenergic neurons or the increase in reactivity is due to disinhibition of noradrenergic transmission as a result of impaired inhibitory feedback. Initial experiments, presented here, are consistent with sensitization due to the disinhibition of noradrenergic transmission.

The pontine nucleus locus coeruleus (LC) is the only source of NE in the cerebral cortex (6). The neuronal activity of LC cells and NE release in target regions are subject to inhibitory control via α_{2A} -adrenergic autoreceptors (α_{2A} -AR). These receptors are coupled to G α i/o proteins, and agonist stimulation leads to inhibition of the cyclic adenosine monophosphate pathway and a hyperpolarization of the noradrenergic cells through the activation of potassium ion conductance (7–9). There is evidence to suggest that α_{2A} -AR are involved in amphetamine-induced behavioral sensitization in mice. In

fact, a study has shown that mice lacking the α_{2A} -adrenergic receptors exhibit an unclear locomotor sensitization to amphetamine (10). However, because these mutant mice were hyperreactive to an acute injection of amphetamine and are sensitized after saline treatment, no final conclusion about amphetamine behavioral sensitization could be drawn. Moreover, the implication of these receptors on neurochemical and behavioral effects of amphetamine repeated treatments as well as persistent molecular mechanisms implicated in these modifications have not been investigated in wild-type mice.

In this study, we investigated possible changes to α_{2A} -AR or their intracellular signaling in amphetamine-sensitized mice, to unravel the mechanism(s) underlying behavioral and neurochemical sensitizations. We first investigated whether the noradrenergic hyperreactivity observed in sensitized mice could be reproduced in naive mice by a blockade of noradrenergic autoreceptors. We then determined the spontaneous firing rate of LC cells and their sensitivity to the α_{2A} -AR agonist clonidine in animals previously sensitized to amphetamine and compared the results obtained with those for control animals. Rats were used in the LC recording experiments, to ensure reliable single-unit recording from a nucleus containing only 1500 cells, because *in vivo* recordings of LC neurons in mice and rats are similar (11). We carried out *in vivo* microdialysis to assess the ability of clonidine to decrease extracellular basal NE levels in the prefrontal cortex (PFC) of naive and sensitized mice. The density of α_{2A} -AR was determined by autoradiography, and the amount of $G\alpha_i/o$ protein available to mediate the molecular effects of these receptors was analyzed by western blotting in sensitized and naive mice. Finally, we analyzed the effects of autoreceptor stimulation or blockade on the development of amphetamine-induced behavioral sensitization.

Methods and Materials

Animals

Male C57BL/6J inbred mice (26 to 32 g) were purchased from Charles River (Wilmington, Massachusetts). Male Sprague-Dawley rats (Charles River) were 2 to 4 months old. Both mice and rats were housed with food and water supplied *ad libitum* and a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:30 AM). They were habituated to the laboratory regime for 1 week before the experiments began. Animals were treated in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and the European Community Council Directive 86/609/EEC.

Drugs

D-amphetamine sulfate, clonidine hydrochloride, 2-ethyl-2-(imidazolin-2-yl)-2,3-dihydrobenzofuran hydrochloride (efaroxan hydrochloride) were dissolved in saline. Drugs were purchased from Sigma Aldrich (L'isles d'Abeau Chesnes, France), with the exception of clonidine, which was obtained from ICN Biomedicals (Orsay, France). Drugs were injected intraperitoneally (IP) unless otherwise indicated. Doses are expressed as salts. For the experiments in mice, D-amphetamine sulfate was administered at a dose of 2 mg/kg (3). For locomotor activity measurements, clonidine was administered at a dose of .2 mg/kg, because it was the lowest dose blocking the locomotor response to 2 mg/kg amphetamine in test experiments. For microdialysis experiments, clonidine was administered at doses of 40 μ g/kg subcutaneously (12). Efaroxan was always administered at a dose of 2.5 mg/kg.

For electrophysiological recordings in rats, animals were sensitized by 1 mg/kg amphetamine administrations, and reactivity of LC cells was tested with 40 μ g/kg clonidine (13).

Timeline	Groups			
Daily injections (4 consecutive days)	Sal+ sal	Sal + amph	(Clo or Efa) + amph	(Clo or Efa) + sal
Day 25 Challenge	Amph			

Figure 1. Protocol of behavioral sensitization to amphetamine in presence of clonidine or efaroxan. Illustration of the protocol of behavioral sensitization to amphetamine (amph) in the presence of clonidine (clo) (.2mg/kg intraperitoneally) or efaroxan (efa) (2.5mg/kg intraperitoneally). sal, saline.

Locomotor Activity

Mice. Mice were introduced into a circular corridor (Imetric, Pessac, France). Locomotor activity was counted when animals traveled along one quarter and expressed as the number of 1/4 turns/5 min. Spontaneous activity was recorded for 120 min, and the mice then received injection with amphetamine, efaroxan plus amphetamine, or clonidine plus amphetamine (Figure 1). Clonidine was administered twice (30 min before and 1 hour after amphetamine injection) to maintain its concentration during the effects of amphetamine. Only mice displaying locomotor activity superior to 120 1/4 turns/5 min were considered as sensitized.

Rats. We used the same protocol for rats but with an appropriately scaled-up apparatus (Imetric, Bordeaux, France). Rats received one injection of amphetamine or saline on each of 4 consecutive days and an additional one after 4 days of withdrawal. Activity was measured for 2 hours before injection and 3 hours after injection. Only rats displaying a locomotor activity of 300% of the first injection locomotor response were retained 1 month later for the electrophysiological analysis of sensitized animals.

Electrophysiological Recordings

Electrophysiological recordings were carried out 1 month after the last amphetamine injection. Rats were anesthetized with urethane (1.5 g/kg), and the body temperature was maintained at 37°C. The animal was fixed in a stereotaxic apparatus, with the head at an angle of 14° below the horizontal plane, to permit access to the LC. Electrodes were inserted at the following coordinates: 2 mm anterior to bregma, .5 mm lateral to the midline for frontal, and 4 mm posterior to lambda, 1.2 mm lateral to the midline for LC recording. Characterization of LC units and specific details concerning extracellular recordings are detailed in Supplement 1.

Histology

Direct current (9 volts) was passed through the electrode for 5 sec to create a small lesion at the tip. Rats were perfused intracardially with saline, followed by 10% formalin. Brains were removed, stored in formalin for 1 week, and then cut into 60- μ m sections and stained with cresyl violet.

Microdialysis Surgery

Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg; Sanofi Santé Animale, France). A unilateral permanent cannula (CMA/7 guide cannula; Phymep, Paris, France) was placed at the edge of the PFC. The coordinates for the guide cannula tips were: anteroposterior, +2.6 mm relative to bregma; mediolateral, +.5 mm; dorsoventral, 0 from dura (14). After surgery, mice were placed in individual cages and allowed to recover for at least 4 days.

Microdialysis Experiments

On the day of the experiment, the microdialysis probe was inserted into the PFC (membrane length: 2 mm; diameter: 24 mm;

cutoff: 6000 Da; CMA/7 microdialysis). The PFC was perfused with artificial cerebrospinal fluid (CSF) with a CMA100 microinjection pump. Appropriate steady-state NE levels in perfusate samples were reached 140 min after probe insertion. Samples (20 μ L every 20 min) were collected in a refrigerated fraction collector (CMA/170) over a period of 100 min for the determination of basal extracellular NE levels.

Biochemistry

Dialysate samples were placed in a refrigerated automatic injector (Triathlon; Spark Holland, Emmen, The Netherlands). High-performance liquid chromatography was performed with a reverse-phase column (80 \times 4.6 mm; 3- μ m particle size; HR-80; ESA, Chelmsford, Massachusetts). The mobile phase (.1 mol/L sodium dihydrogenorthophosphate, .1 mmol/L ethylenediamine tetraacetate, 2.75 mmol/L octane sulfonic acid, .25 mmol/L triethylamine, 3% methanol, pH = 2.9) was delivered at a rate of .7 mL/min by an ESA-580 pump. Electrochemical detection was performed with an ESA coulometric detector (Coulchem II 5100A, with a 5014B analytical cell; Eurosep, Cergy, France).

Quantitative Autoradiography

Mice were decapitated, and brains were frozen in -30°C isopentane and stored at -80°C . Sixteen-micrometer sections of interest [LC between -5.34 and -5.80 mm, according to Paxinos and Franklin (14)] were cut at -20°C and stored at -80°C . Sections were incubated for 20 min at room temperature in Tris buffer (170 mmol/L Tris-hydrogen chloride, 20 mmol/L magnesium chloride, pH = 7.4) and then for 90 min with the same buffer supplemented with 1.1 nmol/L [^{125}I]-para-iodoclonidine (2200 Ci/mmol). Sections were washed twice in cold buffer (5 min each), briefly dipped in ice-cold distilled water, dried, and exposed to [^{125}I] Hyperfilm for 3 days at -70°C . Nonspecific binding was assessed by adding 10 μ mol/L phentolamine to the incubation medium. A Biocom densitometer was used for quantification. The optical density was measured on 6–12 sections/structure/animal. Specific binding was obtained by subtracting nonspecific binding from total binding.

Immunodetection of G α i/o

Preparation of Homogenates and Western Blot Analysis.

Brains were obtained as described in the preceding text and cut at -20°C in 400- μ m serial coronal sections. We punched 10 mg of LC from the slices [according to Paxinos and Franklin (14)]. These LC samples were sonicated (1 g/10 V) in ice-cold Tris-hydrogen chloride buffer (50 mmol/L Tris, pH = 7.3; 100 mmol/L sodium chloride, 2 mmol/L magnesium chloride, 1 mmol/L ethylenediamine tetraacetate, 1 mmol/L ethylene glycol bis-2-aminoethyl ether-N,N',N'',n'-tetraacetic acid, .5 mmol/L dithiothreitol, .32 mol/L sucrose) supplemented with a Protease Inhibitor Mixture tablet (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Detailed steps of the western blot analysis are described in Supplement 1.

Statistics

We used GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, California). Data from microdialysis and locomotor activity experiments are expressed as a function of time. Microdialysis data were normalized as a percentage of the respective mean basal value. Extracellular NE levels (mean values in pg/20 μ L \pm SEM) were compared and analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) (repeated measures). When interactions were significant, Fisher's protected least significant difference (PLSD) post hoc test was used. The NE basal values were compared with a Student *t* test. Pharmacological treatments correspond to independent groups of animals.

Differences were assessed by two-way ANOVA (repeated measures) followed by a Tukey-Kramer post hoc test. Values of *p* < .05 were considered significant. Each group contained eight animals, except for microdialysis experiments where each group contained five to seven animals. For electrophysiological measurements, group differences were evaluated with *t* tests for independent samples (see Supplement 1 for details).

Results

α_{2A} -AR Antagonist Potentiates the Amphetamine-Induced Release of NE in the PFC

Amphetamine increased extracellular NE levels in the PFC by up to 300% (Figure 2). In sensitized mice, amphetamine induced

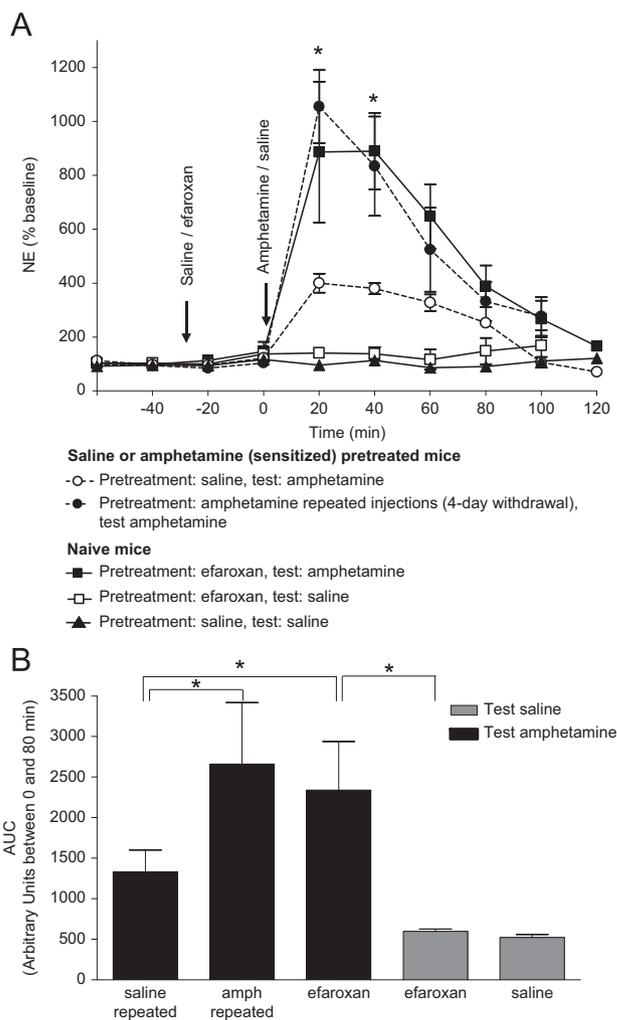


Figure 2. The α_{2A} -adrenergic autoreceptors (α_{2A} -AR) blockade in naive mice induces similar amphetamine-induced norepinephrine (NE) release to that observed in sensitized animals. Mice received an injection of efaroxan (2.5 mg/kg, intraperitoneally), followed 30 min later by amphetamine (2 mg/kg, intraperitoneally) or saline. (A) Time course of NE release in the prefrontal cortex. Note that amphetamine-induced NE release in sensitized animals after a 4-day withdrawal is similar to that obtained after 1-month withdrawal (5). Basal values of NE: naive .687 \pm .204 pg/sample, sensitized .599 \pm .187 pg/sample (**p* < .005 amphetamine sensitized or efaroxan naive, test amphetamine vs. amphetamine saline pretreated). (B) Histograms of areas under curve (AUC) between 0 and 80 min (**p* < .005).

the release of up to 800% as much NE in the PFC as observed in mice receiving repeated saline injections (Figure 2A) (two-way ANOVA with time and treatment [i.e., saline or amphetamine] as factors, $F_{5,50} = 10.209$, $p < .0001$; Fisher's PLSD test $p < .05$ from 20 to 40 min). We investigated the involvement of α_{2A} -AR in the effect observed in sensitized animals, by blocking these receptors with efaroxan, a α_{2A} -AR antagonist, in naive mice. The injection of efaroxan 30 min before amphetamine potentiated cortical NE release to levels similar to those induced by the same dose of amphetamine in amphetamine-sensitized mice (Figure 2A,B) (two-way ANOVA with time and challenge [i.e., amphetamine or saline] as factors, $F_{5,50} = 3.040$, $p < .005$; Fisher's PLSD $p < .05$ from 20 to 80 min). The NE basal values were not significantly different between saline and amphetamine groups (t test, $p = .4$).

Electrophysiological Properties of LC Neurons in Rats

Basal Discharge Rate. With the strictest criteria (see Methods), we were able to isolate 18 single units unambiguously—8 from control rats, and 10 from sensitized rats—for the calculation of basal firing rate. The LC cells of control rats had a basal firing rate of $1.5 \pm .25$ Hz ($n = 8$), consistent with previous findings (15). By contrast, the noradrenergic cells of amphetamine-sensitized rats had a significantly higher basal firing rate of $3.21 \pm .87$ ($t_{7,9} = 4.2$, $p = .002$) (Figure 3).

Effect of Clonidine on the Spontaneous Firing Rate of LC Neurons. The α_{2A} -AR agonist clonidine acts, at very low doses, on

inhibitory autoreceptors, thereby inhibiting the firing of LC neurons (16). Response to clonidine is thus an indicator of the noradrenergic nature of the cells recorded. It also provides an indication of the sensitivity of the α_{2A} -AR. In control rats (Figure 4A), the injection of 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ clonidine rapidly reduced the firing rate of LC units to zero (approximately 10 min) (17). However, in sensitized rats (Figure 4B) receiving the same dose, the time to a decrease in firing rate was significantly longer, and a total abolition of firing was not observed in all cases. The difference in the time to a 50% decrease from preinjection baseline values was significant, as illustrated in Figure 4C [$t_{7,5} = 90$, $p = .0001$].

Effect of Clonidine on Cortical Extracellular NE Levels in Amphetamine-Sensitized Mice

The injection of clonidine decreased cortical NE content over a period of 100 min in naive mice (Figure 5) (two-way ANOVA with time and treatment as factors, $F_{3,19} = 14.779$, $p < .0001$). Clonidine did not trigger a decrease in cortical extracellular NE levels in amphetamine-sensitized mice. A more precise analysis with Fisher's PLSD test revealed that the decrease in NE levels induced by clonidine was significantly different from that in control mice or mice receiving amphetamine injections after withdrawal for 4 days or 1 month ($p < .05$, from 20 min to 100 min). The NE basal values were not significantly different between saline and sensitized animals after a 4-day or 1-month withdrawal (Figure 5) (saline vs. sensitized 4-day, $p = .383$ and saline vs. sensitized 1 month, $p = .648$).

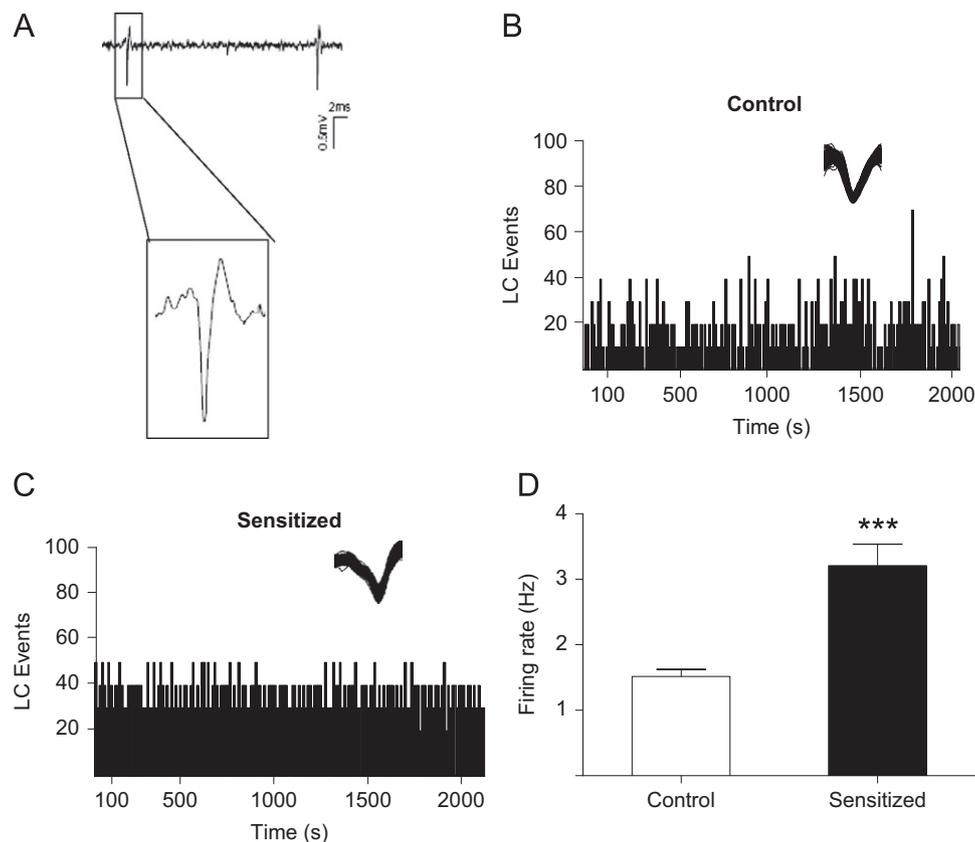


Figure 3. Electrophysiological properties of locus coeruleus (LC) neurons in amphetamine-sensitized rats. (A) Example of a single-unit LC cell recording. (B, C) Basal firing rate of an LC unit of a control rat (B) and an amphetamine-sensitized rat (C) after 1-month withdrawal. y axis: spike count of the single unit/10 sec. x axis: time in seconds. Insets: 50 action potentials superimposed. (D). Histograms of mean firing rate of 8 single neurons in control rats and 10 in sensitized rats ($***p < .002$ for comparison with control subjects).

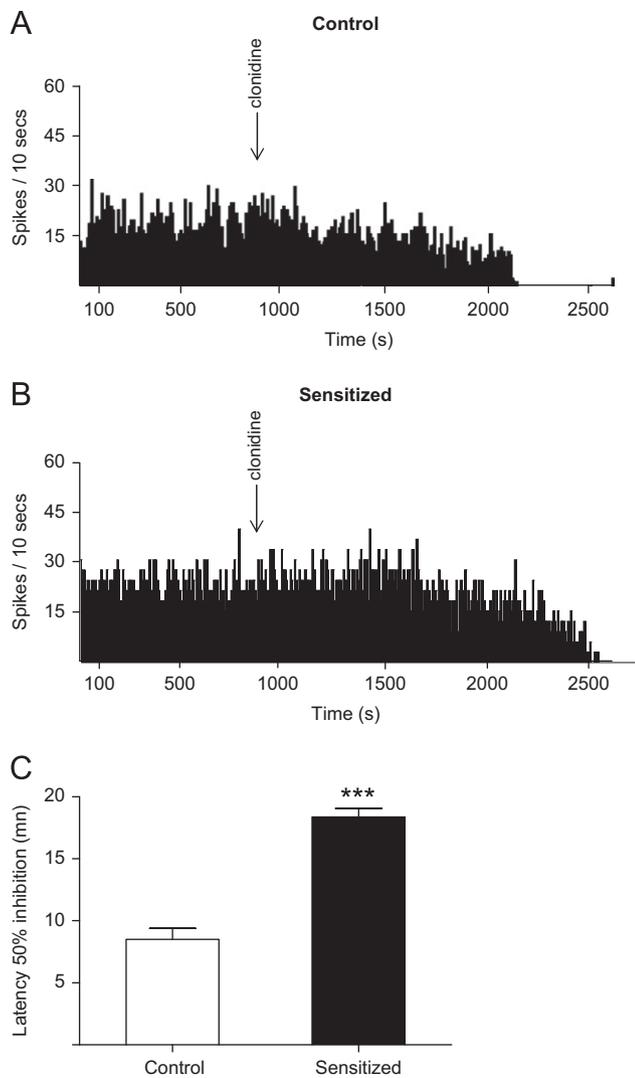


Figure 4. Inhibition of locus coeruleus neurons after clonidine injection. **(A)** Clonidine (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intraperitoneally) induces a decrease and then a sustained total silence of activity in control rats. **(B)** In sensitized rats, firing rate decreases with a longer latency. Note that total silence is not obtained in all cells (not shown). **(C)** Mean latency to a 50% reduction in firing after clonidine treatment (***) $p = .0001$ for comparison with control subjects).

Membrane Expression of α_{2A} -AR in Sensitized Mice

We investigated whether the observed loss of function was due to a decrease in α_{2A} -AR expression, by quantifying these autoreceptors in the LC by autoradiography. We also determined postsynaptic receptor density in the hippocampus. The binding of radio-labeled [^{125}I]-para-iodoclonidine, an agonist, was similar in amphetamine-sensitized and control mice after withdrawal for a short period (4 days), indicating no change in the membrane expression of α_{2A} -AR in mice with and without prior repeated amphetamine injections (Figure 6). The adaptation underlying the impairment of α_{2A} -AR is presumably long-lasting. Thus, because no change was observed after 4 days of withdrawal, we did not test the hypothesis of a decrease in membrane expression after 1 month of withdrawal.

G α i/o Levels in Amphetamine-Sensitized Mice

Electrophysiological and microdialysis experiments strongly suggested that α_{2A} -AR function was impaired after amphetamine

administration, but autoradiography revealed no change in the expression of these receptors at the membrane. We therefore investigated possible changes in the density of the G-proteins coupled to α_{2A} -AR in sensitized animals. According to Albarrán-Juárez *et al.* (18), three subtypes of G α i proteins are present in the LC of C57BL/6J mice. Western blots (Figure 7) revealed that G α i1 and G α i2 levels were significantly lower in the LC tissues of amphetamine-sensitized mice after 4 days (G α i1 $t_{2,956}$, $p < .05$, G α i2 $t_{3,139}$, $p < .05$) or 1 month (G α i1 $t_{2,813}$, $p < .05$ and G α i2 $t_{2,815}$, $p < .05$) of withdrawal than in control subjects. No difference was found in the levels of G α i3 and G α o (G α i3 $p > .05$, and G α o $p > .05$).

Consequences of the Blockade or Stimulation of α_{2A} -AR for Development of Amphetamine-Induced Behavioral Sensitization

When animals were pretreated with efaroxan during amphetamine sensitization, locomotor response to amphetamine on the challenge day was 75% higher than that obtained for animals treated with amphetamine alone (Figure 8A; Tukey-Kramer post hoc test between saline + amphetamine and efaroxan + amphetamine $p < .05$ from 10 to 60 min). Treatment with efaroxan alone during sensitization was associated with a trend toward a stronger locomotor response to amphetamine on the

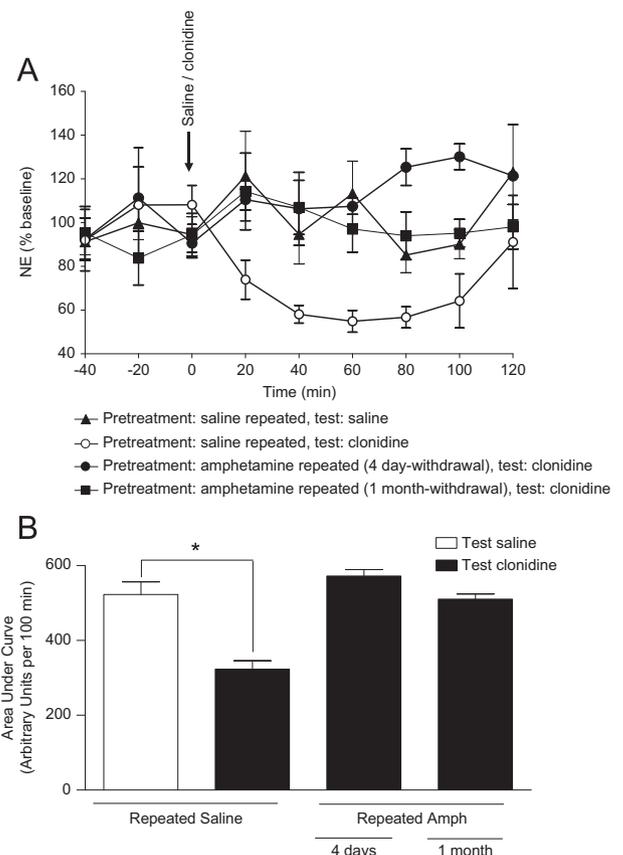


Figure 5. Effect of clonidine on norepinephrine (NE) release in amphetamine-sensitized mice. Mice received repeated amphetamine or saline injections followed, 4 days or 1 month later, by a clonidine injection. **(A)** Time course of NE release. Basal values for NE: saline $.705 \pm .209$ pg/sample, sensitized 4-day withdrawal $.615 \pm .105$ pg/sample, sensitized 1-month withdrawal $.749 \pm .143$ pg/sample. **(B)** Histograms of areas under curves between 0 and 100 min (* $p < .05$ significantly different from control).

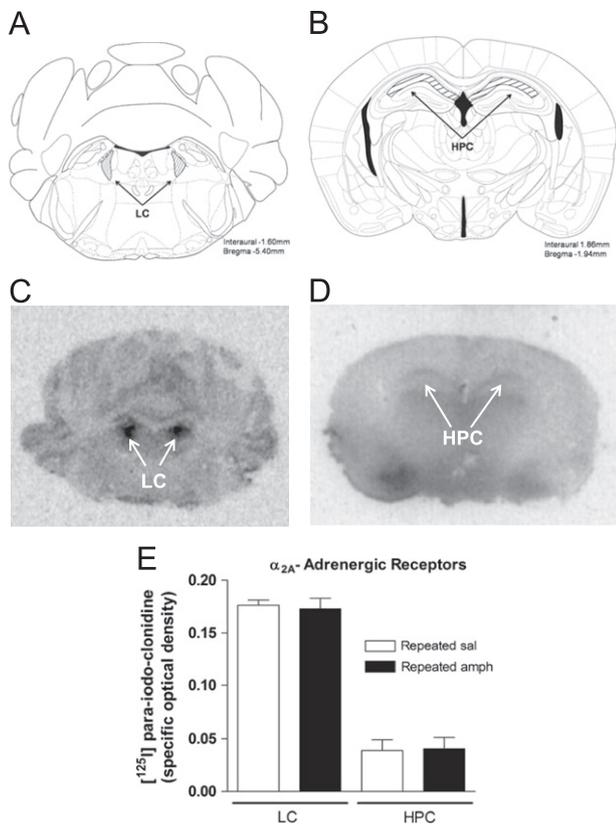


Figure 6. Labeled agonist binding to α_{2A} -adrenergic autoreceptor in mouse locus coeruleus (LC) and hippocampus (HPC). Animals were treated for 4 consecutive days with saline (sal) or amphetamine (amph) (2 mg/kg, intraperitoneally). Quantitative autoradiography was performed on brain slices after a 4-day withdrawal. (A) Drawing and autoradiography of the LC. (B) Drawing and autoradiography of the HPC. (C) Optical density in LC and HPC of naive and amphetamine-sensitized mice (differences are not significant, unpaired *t* test, $p = .750$). Drawings are taken from the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin (14), reprinted with permission from Elsevier, copyright 1997.

challenge day, but this effect was not significant. By contrast, the stimulation of α_{2A} -AR with clonidine during repeated amphetamine treatment completely blocked behavioral sensitization, measured 3 weeks after drug injections (Figure 8B; two-way ANOVA, with time and prior treatment as factors, $F_{11,55} = 8.426$, $p < .0001$, and Tukey-Kramer post hoc test between saline + amphetamine and clonidine + amphetamine $p < .05$ from 5 to 30 min). Animals receiving only repeated injections of saline or clonidine displayed no behavioral sensitization (Figure 8B; Tukey-Kramer post hoc test between saline + saline and saline + amphetamine $p < .05$ from 5 to 20 min; Tukey-Kramer post hoc test between saline + amphetamine and clonidine + saline $p < .05$ from 5 to 30 min).

Discussion

We found that repeated injections of amphetamine induced long-term functional desensitization of α_{2A} -AR in the LC. This desensitization was not accompanied by a decrease in the density of autoreceptors. Instead, we observed a decrease in the expression of G α i1 and G α i2 proteins in the LC. We also found that α_{2A} -AR blockade facilitated sensitization to amphetamine,

whereas the stimulation of these receptors with clonidine completely prevented sensitization. We have previously shown that behavioral sensitization to amphetamine is strongly correlated with the persistent sensitization of noradrenergic neurons, as also reported for cocaine, opiates, alcohol, and nicotine in the presence of monoamine oxidase inhibitors (3–5,19). The development of both this neurochemical sensitization and behavioral sensitization was entirely dependent on the stimulation of α_{1B} -adrenergic and serotonergic (5-HT_{2A}) receptors, because the blockade of these receptors prevented both phenomena.

We hypothesized that noradrenergic hyperreactivity resulted from an impairment of inhibitory feedback. We therefore blocked the α_{2A} -AR with efaroxan, before amphetamine injection, to mimic autoreceptor dysfunction. In naive mice, this blockade led to a similar hyperreactive locomotor response as observed in sensitized mice (Figure S1 in Supplement 1), consistent with our hypothesis. Moreover, the potentiation of NE release in naive mice by amphetamine in the presence of efaroxan was also similar to that observed in sensitized mice. Efaroxan was injected

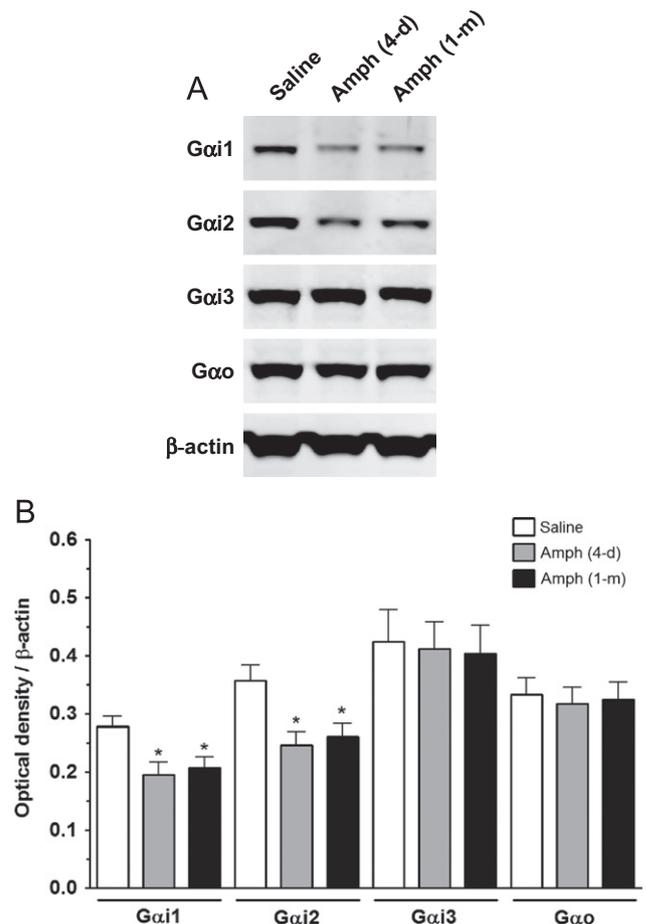


Figure 7. Western-blot analysis of G α i/o proteins in the locus coeruleus. (A) Representative western blot of the density of G α i1, G α i2, G α i3, Go, and β -actin proteins in samples of locus coeruleus tissue from control and amphetamine-sensitized mice after a 4-day or 1-month withdrawal. Each G α i/o protein was detected with the corresponding antibody and migrated to its expected molecular weight (40 kDa). The β -actin migrated at 42 kDa. (B) Histograms of optical density relative to that of β -actin, for each of the G α i/o proteins, in amphetamine-sensitized animals after a 4-day or 1-month withdrawal (* $p < .05$ vs. the corresponding control). Amph, amphetamine.

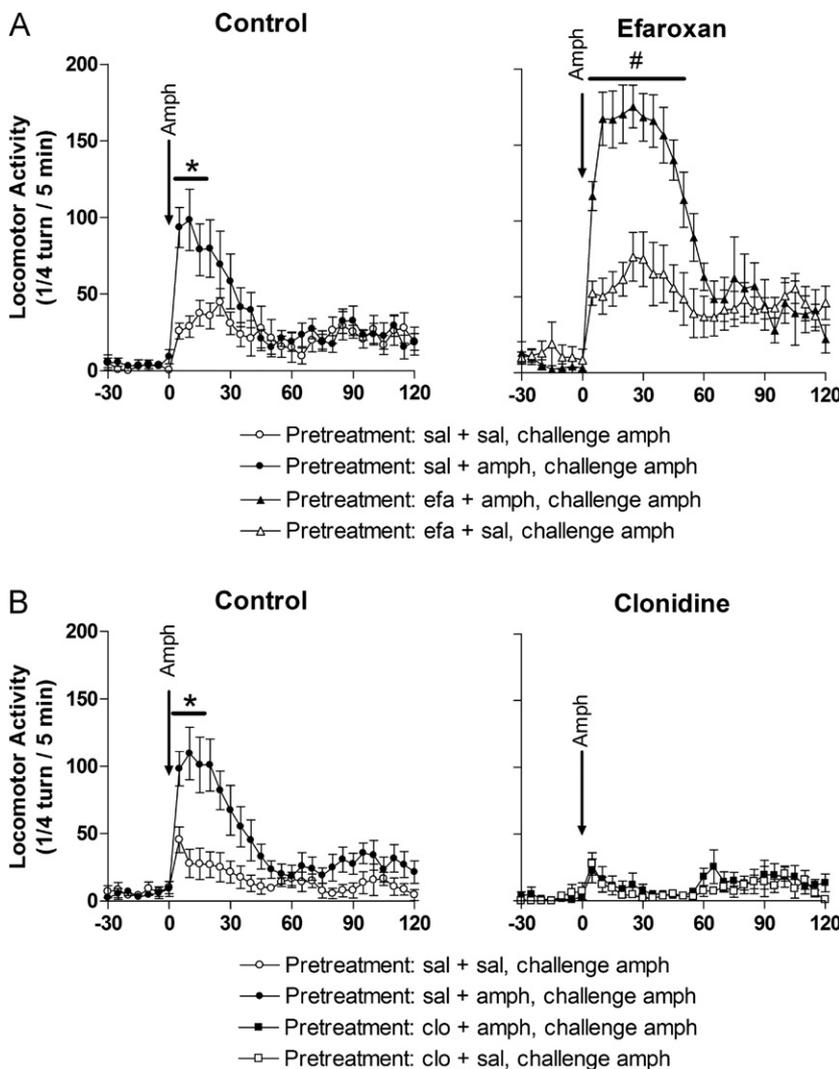


Figure 8. Effect of prior treatment with α_{2A} -adrenergic autoreceptor antagonist or agonist on amphetamine-induced behavioral sensitization (see Figure 1 for protocol of behavioral sensitization). **(A)** Efaroxan (efa) was injected with amphetamine (amph) on 4 consecutive days, and animals were challenged with amph alone 3 weeks later. Efaroxan facilitated amph behavioral sensitization ($*p < .05$ for comparison between saline [sal]+sal and sal+amph pretreatments, and $^{\#}p < .05$ for comparison between efa+amph and efa+sal). **(B)** Clonidine (clo) was injected with amph on 4 consecutive days, and animals were challenged with amph alone 3 weeks later. Clonidine blocked behavioral sensitization to amph ($*p < .05$ for comparison between sal+sal and sal+amph pretreatments, and $p > .05$ for comparison between clo+amph and clo+sal).

systemically, so these findings might be accounted for by a blockade of either the somato-dendritic α_{2A} -AR or of the α_{2A} -AR located at the terminals of NE axons. We addressed this question by measuring the basal firing of noradrenergic neurons in the LC of naive and sensitized rats in vivo and the latency of the inhibitory response to clonidine, which decreases NE neuron firing (16).

Rats were used for electrophysiological studies to ensure that reliable data were obtained. Indeed, to our knowledge, only one published study has reported in vivo electrophysiological recordings of NE neurons in mouse LC and confirmed that mouse and rat LC cells had similar electrophysiological properties: a regular and slow steady firing rate, a long duration of positive action potentials, and an increase in firing in response to nociceptive stimulation of the contralateral hind paw (11). We found that spontaneous activity under anesthesia was doubled in sensitized animals, suggesting an increase in the excitability of these neurons. This basal hyperactivity could account for the hyperresponsiveness to amphetamine observed in sensitized animals in the microdialysis experiments. The longer latency to the inhibitory effect of clonidine in sensitized animals after 1 month of withdrawal strongly suggests a persistent desensitization of

α_{2A} -AR, because clonidine has a high intrinsic activity for α_{2A} -AR despite some affinity for other α_2 -AR subtypes (20).

The extracellular NE release measured in the PFC confirmed the decrease in α_{2A} -AR function in mice. Compared with saline, clonidine injection induced a significant NE level decrease in saline-treated animals, whereas no significant change in sensitized mice was observed after a 4-day or 1-month withdrawal.

We used quantitative autoradiography of [125 I]-para-iodoclonidine to assess autoreceptor expression in LC. No difference in ligand binding was observed between animals treated repeatedly with amphetamine and those treated with saline. The decrease in the functional sensitivity of autoreceptors therefore cannot be accounted for by a decrease in their expression at the membrane. Our results suggest that the amphetamine target is located downstream from the receptor, within the intracellular cascade.

As previously indicated, α_{2A} -AR binds to *G α i/o* proteins, activating agonist-induced intracellular signal transmission. Cells respond to the activation of α_{2A} -AR by an inhibition of stimulated cyclic adenosine monophosphate production or an inhibition of voltage-gated calcium ion channels in neurons, resulting in a neuron inhibition (21,22). Several studies have shown that *G α i/o* protein levels decrease after repeated treatment with cocaine, in

several regions of the brain, including the LC (23–25). Furthermore, in postmortem studies, chronic users of cocaine, methamphetamine, and heroin have been found to have lower-than-normal levels of Gi proteins in the nucleus accumbens (26). On the basis of these findings, we assessed G protein levels and found that G α i1 and G α i2 protein levels were lower in the LC of sensitized mice than in that of control subjects after 4-day or 1-month withdrawal. It is possible that G α i/o levels are also modified at the level of the noradrenergic terminals. However, amphetamine local injection in the PFC induced similar NE release in both control and amphetamine-sensitized mice (Christophe Lanteri, Ph.D., and Jean-Pol Tassin, Ph.D., unpublished data, 2008), a finding that likely excludes a role of terminal modifications in the hyperreactive NE response in sensitized mice. Finally, other studies (27–29) have reported changes to G α i/o levels in various brain structures after repeated exposure to commonly abused drugs. However, the withdrawal periods considered in these studies were always very short (18 or 24 hours).

To prevent the autoreceptors desensitization due to somatodendritic NE release triggered by amphetamine, we pretreated animals with an α _{2A}-AR antagonist. Unexpectedly, pretreatment actually facilitated sensitization rather than preventing it. This implies that the desensitization of autoreceptors is not a direct result of repeated stimulation by amphetamine-induced NE release but probably results instead from an intracellular mechanism. Interestingly, 5-HT_{2A} receptors play a critical role in behavioral and neurochemical sensitization to amphetamine (5) and to other drugs of abuse (3,4,19) and activate the Gq/G11 pathway favoring protein kinase C activity. It is tempting to suggest that repeated stimulation of the 5-HT_{2A} receptors located in the LC (30,31) might directly or indirectly decrease G α i expression. Indeed, several published studies have demonstrated a protein kinase C-dependent heterologous desensitization of Gi proteins (32–35).

The stimulation of α _{2A}-AR with clonidine before amphetamine injections completely prevented behavioral sensitization. Indeed, clonidine blocks not only electrophysiological activity of NE neurons (Figure 4) but also amphetamine-induced NE release (Figure S2 in Supplement 1). All these data demonstrate the major role of the noradrenergic system in the development of behavioral sensitization to amphetamine, including the implication of α _{2A}-AR.

The most original finding of this study was the long-term nature of the α _{2A}-AR modifications, highlighting the major role of autoreceptors in the enduring effects of drug abuse. One interesting study has shown that mice lacking α _{2A}-AR have stronger locomotor responses to an acute injection of amphetamine and that knockout mice therefore display unclear behavioral sensitization to this drug (10). Other studies have reported a downregulation of α _{2A}-AR after prenatal cocaine exposure (36), and the stimulation of α _{2A}-AR has been shown to decrease behavioral sensitization to cocaine (37).

It is clear that α _{2A}-AR desensitization can contribute to the noradrenergic hyperreactivity observed in sensitized animals. However, our data do not rule out other possible explanations. Glutamatergic transmission from the PFC, which strongly influences the activity of noradrenergic neurons in the LC (38–40), might be reinforced by long-term potentiation-like plasticity, similar to that observed in the nucleus accumbens (41–43) or the ventral tegmental area (44–46) after repeated psychostimulant injections.

In summary, we have shown that amphetamine-sensitized animals display persistent desensitization of α _{2A}-AR sustained by

a decrease in the amounts of G α i1 and G α i2 proteins in the LC. We also found that stimulating noradrenergic inhibitory feedback completely prevented behavioral sensitization to amphetamine, whereas α _{2A}-AR blockade facilitated persistent sensitization.

Our results highlight the role of noradrenergic transmission in amphetamine-induced behavioral and neurochemical sensitizations and suggest that α _{2A}-AR might be an interesting target for treatments aiming to attenuate the effects of repeated exposure to psychostimulants.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Mission Interministérielle de Lutte contre la Drogue et la Toxicomanie. ED received a fellowship from the CNRS. ACB received funding from Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche. VH held a postdoctoral position funded by Servier Laboratories.

We thank Caroline Chevarin and Marie-Pascale Martres for helpful advice concerning quantitative autoradiography experiments. We also thank Dr. Marie Picot and Nicolas Bouveyron for advice on western blot experiments.

The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Supplementary material cited in this article is available online.

1. Steketee JD, Kalivas PW (2011): Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev* 63:348–365.
2. Robinson TE, Berridge KC (1993): The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 247–291.
3. Lanteri C, Hernández Vallejo SJ, Salomon L, Doucet EL, Godeheu G, Torrens Y, *et al.* (2009): Inhibition of monoamine oxidases desensitizes 5-HT_{1A} autoreceptors and allows nicotine to induce a neurochemical and behavioral sensitization. *J Neurosci* 29:987–997.
4. Lanteri C, Salomon L, Torrens Y, Glowinski J, Tassin JP (2008): Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 33:1724–1734.
5. Salomon L, Lanteri C, Glowinski J, Tassin JP (2006): Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7476–7481.
6. Loughlin SE, Foote SL, Fallon JH (1982): Locus coeruleus projections to cortex: Topography, morphology and collateralization. *Brain Res Bull* 9:287–294.
7. Cedarbaum JM, Aghajanian GK (1977): Catecholamine receptors on locus coeruleus neurons: Pharmacological characterization. *Eur J Pharmacol* 44:375–385.
8. Williams JT, Henderson G, North RA (1985): Characterization of alpha 2-adrenoceptors which increase potassium conductance in rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience* 14:95–101.
9. Aghajanian GK, VanderMaelen CP (1982): alpha 2-adrenoceptor-mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: Intracellular studies in vivo. *Science* 215:1394–1396.
10. Juhila J, Honkanen A, Sallinen J, Haapalinna A, Korpi E, Scheinin M (2005): alpha(2A)-Adrenoceptors regulate d-amphetamine-induced hyperactivity and behavioural sensitization in mice. *Eur J Pharmacol* 517:74–83.
11. Gobbi G, Cassano T, Radja F, Morgese MG, Cuomo V, Santarelli L, *et al.* (2007): Neurokinin 1 receptor antagonism requires norepinephrine to increase serotonin function. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:328–338.
12. Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Adell A, Díaz-Mataix L, Serrats J, Pons S, *et al.* (2003): In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT(2A) receptors: Effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* 18:1235–1246.

13. Bouret S, Duvel A, Onat S, Sara SJ (2003): Phasic activation of locus coeruleus neurons by the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci* 23:3491–3497.
14. Paxinos G, Franklin KBJ (1997): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. New York: Academic Press.
15. Sara SJ, Segal M (1991): Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: Implications for cognition. *Prog Brain Res* 88:571–585.
16. Svensson TH, Bunney BS, Aghajanian GK (1975): Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. *Brain Res* 92:291–306.
17. Dyon-Laurent C, Hervé A, Sara SJ (1994): Noradrenergic hyperactivity in hippocampus after partial denervation: pharmacological, behavioral, and electrophysiological studies. *Exp Brain Res* 99:259–266.
18. Albarrán-Juárez J, Gilsbach R, Piekorz RP, Pexa K, Beetz N, Schneider J, *et al.* (2009): Modulation of alpha2-adrenoceptor functions by heterotrimeric Galphai protein isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 35–44.
19. Tassin JP (2008): Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. *Biochem Pharmacol* 75:85–97.
20. Jasper J, Lesnick J, Chang L, Yamanishi S, Chang T, Hsu S, *et al.* (1998): Ligand efficacy and potency at recombinant alpha2 adrenergic receptors: Agonist-mediated [³⁵S]GTPgammaS binding. *Biochem Pharmacol* 55:1035–1043.
21. Gollasch M, Hescheler J, Spicher K, Klinz FJ, Schultz G, Rosenthal W (1991): Inhibition of Ca²⁺ channels via alpha 2-adrenergic and muscarinic receptors in pheochromocytoma (PC-12) cells. *Am J Physiol* 260:C1282–C1289.
22. Song SY, Saito K, Noguchi K, Konishi S (1991): Adrenergic and cholinergic inhibition of Ca²⁺ channels mediated by different GTP-binding proteins in rat sympathetic neurones. *Pflugers Arch* 418:592–600.
23. Nestler EJ, Terwilliger RZ, Walker JR, Sevarino KA, Duman RS (1990): Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain. *J Neurochem* 55: 1079–1082.
24. Striplin CD, Kalivas PW (1993): Robustness of G protein changes in cocaine sensitization shown with immunoblotting. *Synapse* 14:10–15.
25. Crawford CA, Choi FY, Kohutek JL, Yoshida ST, McDougall SA (2004): Changes in PKA activity and Gs alpha and Golf alpha levels after amphetamine- and cocaine-induced behavioral sensitization. *Synapse* 51:241–248.
26. McLeman ER, Warsh JJ, Ang L, Li PP, Kalasinsky KS, Ross BM, *et al.* (2000): The human nucleus accumbens is highly susceptible to G protein down-regulation by methamphetamine and heroin. *J Neurochem* 74:2120–2126.
27. Nishio M, Kanda Y, Mizuno K, Watanabe Y (2002): Methamphetamine increases the hippocampal alpha(2A)-adrenergic receptor and Galphao in mice. *Neurosci Lett* 334:145–148.
28. Nestler EJ, Erdos JJ, Terwilliger R, Duman RS, Tallman JF (1989): Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res* 476:230–239.
29. Iwasa H, Kikuchi S, Hasegawa S, Suzuki K, Sato T (1996): Alteration of G protein subclass mRNAs in methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Ann N Y Acad Sci* 801:110–115.
30. Li QH, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Nakatsuka D, Cui Y, Watanabe Y (2004): Unique expression patterns of 5-HT2A and 5-HT2C receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *J Comp Neurol* 469:128–140.
31. Haddjeri N, de Montigny C, Blier P (1997): Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol* 120:865–875.
32. Murthy KS, Grider JR, Makhlouf GM (2000): Heterologous desensitization of response mediated by selective PKC-dependent phosphorylation of G(i-1) and G(i-2). *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C925–C934.
33. Di Marzo V, Vial D, Sokoloff P, Schwartz JC, Piomelli D (1993): Selection of alternative G-mediated signaling pathways at the dopamine D2 receptor by protein kinase C. *J Neurosci* 13:4846–4853.
34. Sasaki K, Kawasaki S, Kimura S, Fujita R, Takashima K, Matsumoto M, *et al.* (1997): Functional uncoupling between the receptor and G-protein as the result of PKC activation, observed in Aplysia neurons. *Jpn J Physiol* 47:241–249.
35. Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, Jin J, Daniel JL, *et al.* (2002): Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. *Biochem J* 368:535–543.
36. Elsworth JD, Morrow BA, Nguyen VT, Mitra J, Picciotto MR, Roth RH (2007): Prenatal cocaine exposure enhances responsivity of locus coeruleus norepinephrine neurons: Role of autoreceptors. *Neuroscience* 147:419–427.
37. Jiménez-Rivera CA, Feliu-Mojer M, Vázquez-Torres R (2006): Alpha-noradrenergic receptors modulate the development and expression of cocaine sensitization. *Ann N Y Acad Sci* 1074:390–402.
38. Sara SJ, Hervé-Minvielle A (1995): Inhibitory influence of frontal cortex on locus coeruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6032–6036.
39. Jodo E, Chiang C, Aston-Jones G (1998): Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 83:63–79.
40. Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT (1986): The brain nucleus locus coeruleus: Restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234:734–737.
41. Kalivas PW, Volkow N, Seamans J (2005): Unmanageable motivation in addiction: A pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* 45:647–650.
42. Winder DG, Egli RE, Schramm NL, Matthews RT (2002): Synaptic plasticity in drug reward circuitry. *Curr Mol Med* 2:667–676.
43. Conrad KL, Tseng KY, Uejima JL, Reimers JM, Heng LJ, Shaham Y, *et al.* (2008): Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* 454:118–121.
44. Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001): Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583–587.
45. Kauer JA, Malenka RC (2007): Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8:844–858.
46. Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004): Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47(suppl 1):61–79.

Supplementary information

Materials and Methods

Electrophysiological recordings. Characterization of LC units and specific details concerning extracellular recordings: A skull screw over the frontal pole was used for grounding. Extracellular recordings of single and multiunit activity were made with etched tungsten microelectrodes (1-5 MOhm impedance). The signal was amplified (x10,000) and filtered (band pass 400 Hz-10 kHz) with Grass amplifiers (P511; Grass Instruments, West Warwick, RI, USA). Local field potentials (LFPs) were recorded from the frontal electrode. The LFP signal was amplified (x1k) and filtered (0.25-300 Hz band pass).

The unit and LFP signals were digitized at 32 kHz and 2 kHz, respectively, using CED Power1401 converter and Spike2 data acquisition software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). For unit activity, signals more than twice the background were saved for offline analysis and used to build templates based on the waveform.

LC units were encountered just under the fourth ventricle, at a depth of 5.5-6.0 mm from the brain surface. These neurons are easily recognized by their broad action potentials (~600 μ s), slow steady firing rate (~1 Hz) and proximity to the mesencephalic trigeminal neurons, which are activated by jaw movement and in response to a paw pinch, with a burst of action potentials followed by a long period of inhibition. Once a reliable and stable LC recording had been obtained, baseline spontaneous firing was recorded for 20 min. In some animals, clonidine (40 μ g/kg) was injected after physiological saline.

Immunodetection of G $_{\alpha i/o}$

Western blot analysis: The protein concentrations were determined by the Bradford method, with bovine serum albumin as the protein standard. Protein samples (35 μ g) were boiled for 5 min at 95°C in NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen) containing 2.5% β -mercaptoethanol, and were then run on a 10% NuPAGE® SDS-PAGE Gel Electrophoresis System and transferred to PVDF membrane (Immobilon®, Millipore). Membranes were blocked by incubation for 1 h at RT in Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR Biosciences), and incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antibodies against G α 1 (1:600, ab19932), G α 2 (1:500, ab78193), rabbit polyclonal antibodies against G α 3 (1:300, SC-262), G α o (1:300, SC-387), plus Tween-20 (0.1%). G α o and G α 3 were purchased from Santa Cruz Biotech (Heldelberg, Germany), whereas G α 1 and G α 2 were obtained from Abcam

(Cambridge, UK). Membranes were incubated for 1 h at RT in Odyssey Blocking Buffer plus Tween-20 (0.1%) with a goat anti-rabbit or a goat anti-mouse IR-Dye 680/800-coupled secondary antibody (1:5000, LI-COR Biosciences). Immunoreactivity was detected with the Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Beta actin (A544J; Sigma-Aldrich) immunodetection was performed, as an index of cellular protein level. Immunostaining was quantified with a ChemiGenius2 analyzer and software (Ozyme). Homogenates were studied in triplicate (n=8/group).

Statistics. In electrophysiological measurements, spike shapes were detected online, stored and then further isolated from electrical noise offline by template matching, together with cluster analysis based on principal components and specific wave form measurements, to ensure the isolation of single units. The number of single units isolated from the 18 rats used in these experiments varied slightly between experiments (see results). Basal firing rate (mean (\pm SEM) spikes/s (Hz)) was calculated for a fixed time window of stable recording for at least 300 s, for each single unit recorded in the control group (n=8) and the sensitized group (n=10). Differences between groups were evaluated in *t*-tests for independent samples. The change in firing rate after drug treatment was evaluated by comparing the baseline firing rate with that after injection, in a fixed time window, in paired *t*-tests. Latency was defined as the time to a significant and sustained change in firing rate.

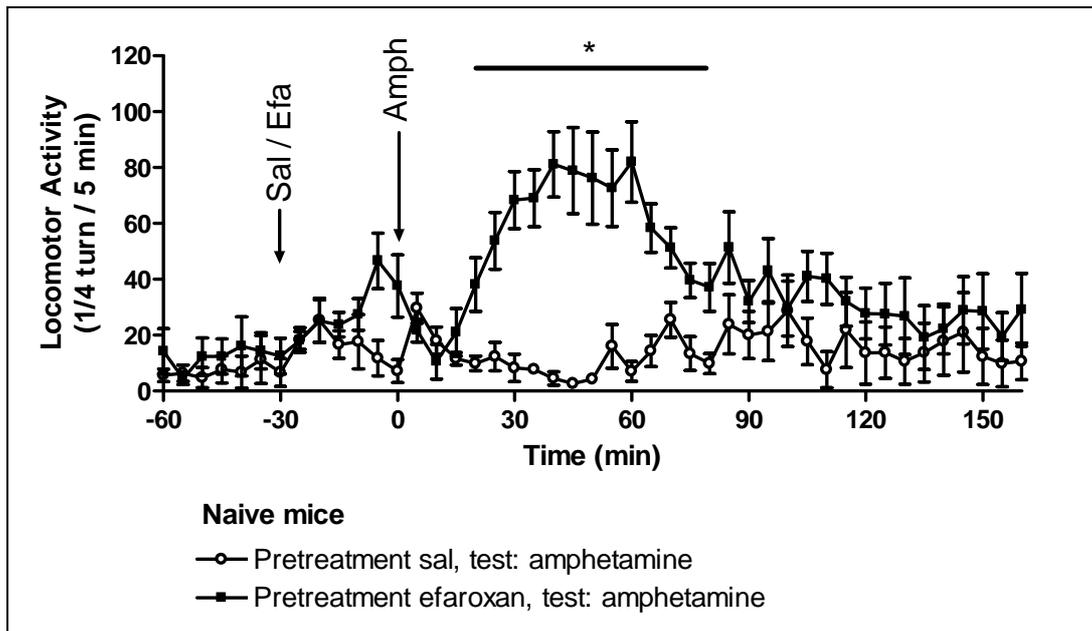


Figure S1: Effect of an efaroxan pre-treatment on locomotor response induced by an acute amphetamine injection.

Efaroxan (2.5mg/kg, i.p.) was injected 30 min prior to acute amphetamine injection (2mg/kg, i.p.). Efaroxan pretreatment potentiates amphetamine-induced locomotor hyperactivity [two-way ANOVA, with time and pre-treatment as factors, $F(24,24)=7.199$, $p<0.0001$ and Tukey-Kramer *post-hoc* test between sal+amph and efa+amph $p<0.05$ from 20 to 80 min]. n=8/group

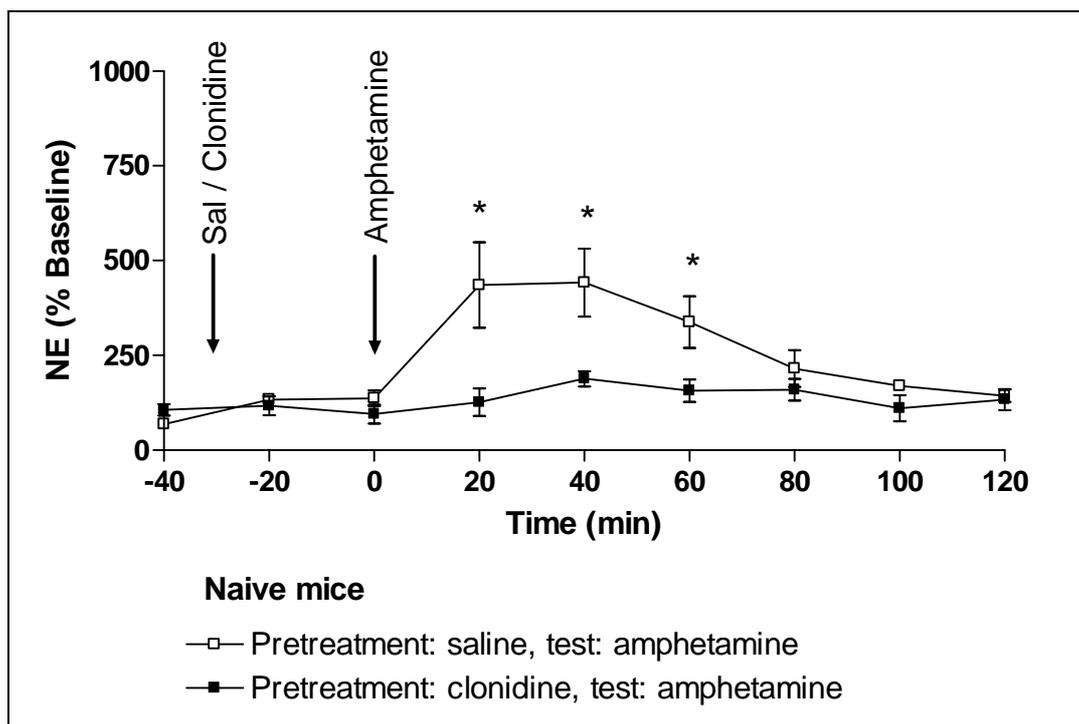


Figure S2: Effect of clonidine pre-treatment on NE release in naïve mice. Mice received an injection of clonidine (0.2mg/kg, i.p.) or saline, followed 30 min later by amphetamine (2mg/kg, i.p.). α_{2A} -AR stimulation blocks amphetamine-induced NE release in the PFC [two-way ANOVA with time and pre-treatment as factors, $F(6,6)=3.899$ $p<0.0035$. Fisher's PLDS post-test, $p<0.05$, from 20 to 60min]. Basal values of NE were similar for saline and clonidine groups (0.398 ± 0.06 pg and 0.523 ± 0.06 pg, respectively). $n=5$ /group

Publication n°3 :

Les animaux sensibilisés à l'amphétamine présentent une altération persistante de la voie de signalisation des autorécepteurs 5-HT_{1A}.

Publication n°3: Les animaux sensibilisés à l'amphétamine présentent une altération persistante de la voie de signalisation des autorécepteurs 5-HT_{1A}.

Auteurs: Ana-Clara Bobadilla*, Emilie L. Doucet*, Gérard Godeheu, Christophe Lanteri, Laurence Lanfumey et Jean-Pol Tassin

* Ces auteurs ont participé de manière équivalente à ce travail

Statut: En écriture

Résumé

De manière équivalente à l'hyper-réactivité noradrénergique mesurée chez les animaux sensibilisés, on observe une réponse potentialisée du système sérotoninergique (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008). Les caractéristiques de l'état des deux systèmes est en effet similaire. L'injection de para-chloro-amphétamine (PCA), qui libère la sérotonine (5-HT), induit chez les animaux sensibilisés une libération exacerbée de 5-HT dans le CPF. Cette potentialisation est observée chez les animaux sensibilisés pour toutes les drogues et se maintient à long terme.

A l'instar de l'article précédent, l'objectif de ce travail était d'établir les mécanismes impliqués dans le maintien de l'hyper-réactivité persistante observée chez les animaux sensibilisés. L'hypothèse de l'altération du rétrocontrôle noradrénergique s'étant révélée pertinente, nous nous sommes directement orientés vers les récepteurs 5-HT_{1A} sérotoninergiques (5-HT_{1A}-R), en supposant que, chez les animaux sensibilisés, ces récepteurs sont désensibilisés à long terme.

Rappelons que l'activation des autorécepteurs 5-HT_{1A}-R, fortement exprimés sur les corps cellulaires sérotoninergiques, active la voie de signalisation G_{αi/o} et inhibe l'activité sérotoninergique.

Résultats principaux

Afin de tester la validité de l'hypothèse, nous avons vérifié que le blocage des 5-HT_{1A}-R induit une hyper-réactivité sérotoninergique chez des animaux naïfs.

1. Une injection de PCA précédée d'une injection systémique de WAY 100635, un antagoniste des 5-HT_{1A}-R, induit une libération potentialisée de 5-HT dans le CPF en comparaison de la libération induite par le PCA seul.

Nous avons par la suite testé fonctionnellement l'état de sensibilité des 5-HT_{1A}-R chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine (2mg/kg, i.p.).

2. Chez les animaux sensibilisés après un court ou un long sevrage, on n'observe plus de diminution de libération de 5-HT dans le CPF induite par le 8-OH-DPAT, un agoniste des 5-HT_{1A}-R.

Afin d'identifier le mécanisme qui maintient la désensibilisation 5-HT_{1A}-R, nous avons comparé l'expression des récepteurs dans le raphé dorsal (RD) des souris contrôles et sensibilisées.

3. On n'observe pas de différence d'expression des 5-HT_{1A}-R chez les animaux sensibilisés, ni dans le noyau du raphé ni dans la couche CA1 de l'hippocampe, lorsque ces récepteurs sont marqués par un antagoniste radioactif.

Nous nous sommes alors concentrés sur l'étape consécutive à l'activation du récepteur, le couplage avec la protéine G_{αi}, en mesurant fonctionnellement le couplage des 5-HT_{1A}-R aux protéines G avec la technique du GTPγS et l'expression de ces protéines au niveau du RD.

4. Le couplage entre les 5-HT_{1A}-R et les protéines G est diminué dans le RD des souris sensibilisées après un court et un long sevrage. Cette diminution pourrait être expliquée par la diminution d'expression des protéines G_{αi1}.

Enfin, comme l'activation des récepteurs α_{2A}-AR pendant la sensibilisation bloque totalement le développement de celle-ci, nous avons testé l'activation des 5-HT_{1A}-R pendant les effets de l'amphétamine.

5. Stimuler les 5-HT_{1A}-R avant les injections quotidiennes d'amphétamine avec le 8-OH-DPAT ne semble avoir aucun effet sur la sensibilisation.

Conclusions

Les animaux ayant reçu des injections répétées d'amphétamine présentent des 5-HT_{1A}-R désensibilisés à long terme. Cette désensibilisation est maintenue par une diminution du couplage entre les récepteurs et les protéines G_{ai}, elle-même entretenue par une diminution de la sous-unité G_{ai1}, qui se maintient après un mois de sevrage.

Contrairement au rôle des α_{2A} -AR dans l'induction de la sensibilisation démontré précédemment, la stimulation des 5-HT_{1A}-R pendant l'action de l'amphétamine n'a pas d'effet sur la réponse locomotrice le jour test.

Au-delà des ressemblances évidentes entre ce travail et l'article n°2, soulignons qu'aux doses d'amphétamine utilisées cette drogue ne libère pas la 5-HT chez la souris. Ce point est important car il suggère que la désensibilisation des 5-HT_{1A}-R n'est pas due à une libération directe de 5-HT par l'amphétamine, mais à l'effet d'un autre système sur le système sérotoninergique. En nous basant sur l'importante interaction entre le système sérotoninergique et noradrénergique détaillée précédemment, nous proposons que ce dernier système est capable, à l'état hyper-réactif, de stimuler le système sérotoninergique et d'altérer son rétrocontrôle.

Serotonergic feed-back is disrupted after amphetamine-induced behavioral sensitization

Ana-Clara Bobadilla*, Emilie L. Doucet*, Gérard Godeheu, Christophe Lanteri, Laurence Lanfumey & Jean-Pol Tassin

* These authors contributed equally to this work.

Introduction

Addiction is a chronic, relapsing disorder characterized by the incapacity to stop drug taking behaviour even after realizing the negative consequences of its abuse. One of the hallmarks of addiction is the high risk of relapse, since addicts clearly stay vulnerable to the drug long after quitting drug use (Steketee and Kalivas 2011). Thus, it is accurate to focus on the long-term neurobiological modifications induced by drugs of abuse, in order to find new therapeutic targets to help avoiding relapse.

Classically, many studies show the importance of dopaminergic transmission in addiction and addiction-like behaviours in rodent models (Russo et al. 2010). However, a smaller area of research studies the role of the serotonergic transmission, and how serotonin (5-HT) can influence addictive behaviours, directly or via its interaction with dopamine (DA) (Cunningham, Paris, and Goeders 1992; Nic Dhonnchadha and Cunningham 2008; Miszkiel, Filip, and Przegaliński 2011; De Deurwaerdère and Spampinato 1999).

Regarding to the behavioural sensitization model, in which repeated injections of the same dose of drugs induce a potentiated locomotor activity, recent work has shown that in parallel to that sensitization, a neurochemical sensitization of noradrenergic and serotonergic transmissions occurs (Tassin 2008). Particularly for serotonin, this sensitization is shown by measuring a potentiated serotonergic release in the prefrontal cortex (PFC) after a challenge with para-chloro-amphetamine (PCA), a 5-HT releaser.

Interestingly, neurochemical sensitization measured in sensitized animals is observed for all drugs of abuse (amphetamine, cocaine, morphine, alcohol, MDMA and nicotine coupled with inhibitors of monoamines oxidases) and is maintained up to 1 month of withdrawal (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008; Lanteri et al. 2009; Lanteri et al. 2013).

In order to understand the long-term modifications induced by drugs of abuse modifying serotonergic response, we aimed to understand the molecular mechanisms sustaining this hyper-reactivity.

Because we observe an exacerbated response, one hypothesis focused on a possible alteration of serotonergic inhibitory feed-back function. It is of particular interest that in amphetamine-sensitized animals, the noradrenergic hyper-reactivity, very similar to the serotonergic one, is maintained by a long term desensitization of α_{2A} -adrenergic receptors (Doucet et al. 2013). These receptors control the main inhibitory feed-back of the noradrenergic system.

In the serotonergic system, the main receptors controlling the inhibitory feed-back are the 5-HT_{1A} serotonergic receptors (5-HT_{1A}-R), which are strongly expressed in the raphe nucleus as autoreceptors but are also found as heteroreceptors in projections areas of the brain. 5-HT_{1A}-R belong to the family of G protein coupled receptors (Hoyer, Hannon, and Martin 2002), and agonist-binding leads to the activation of the G_{αi/o} intracellular cascade, which ultimately causes the inhibition of serotonergic neuronal activity (Hamon et al. 1990).

We thus hypothesize that amphetamine-sensitized mice exhibit a sustained desensitization of 5-HT_{1A}-R.

First, we tested whether impairing 5-HT_{1A}-R function in naive mice lead to serotonergic hyper-reactivity. We used WAY 100635, a selective antagonist which exhibits a 100-fold greater affinity for 5-HT_{1A}-R when compared to other 5-HT receptor subtypes (Forster et al. 1995). We then checked the functional activity of 5-HT_{1A}-R-mediated feed-back by measuring cortical 5-HT release after stimulation of these receptors. After quantifying 5-HT_{1A}-R expression, we measured their functional coupling to G proteins, which expression was also assessed. Finally, we strongly activated 5-HT_{1A}-R prior amphetamine injection to evaluate the role of these receptors in the drug-induced locomotor response.

Materials and Methods

Animals. Male C57Bl/6J inbred mice (26 g to 32 g) were purchased from Charles River. They were housed with food and water supplied *ad libitum* and a 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:30 h). They were allowed to get used to the laboratory regimen for one week before the experiments began. Animals were treated in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and the European Community Council Directive 86/609/EEC.

Drugs. D-amphetamine sulfate, para-chloro-amphetamine (PCA), 8-OH-DPAT ((±)-8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin hydrobromide) (0.5 mg/kg) and WAY 100635 maleate salt (N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide maleate salt) were dissolved in saline. 5-carboxamido-tryptamine (5-CT) was dissolved in a buffer described below. Drugs were purchased from Sigma Aldrich (L'isles d'Abeau Chesnes, France). Drugs were injected intraperitoneally (i.p.). Doses are expressed as salts. D-amphetamine sulfate was administered at a dose of 2 mg/kg and PCA at 7mg/kg (Itzhak et al. 2004; Salomon et al. 2006). WAY 100635 and 8-OH-DPAT were administered at a dose of 0.5 mg/kg for microdialysis experiments. 5-CT was used at four different concentrations: 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M. For locomotor measurements, 8-OH-DPAT was administered at a dose of 1 mg/kg.

Locomotor Activity. Mice were introduced into a circular corridor (4.5 cm width, 17 cm external diameter) crossed by four infrared beams (1.5 cm above the base) placed at every 90° (Imetronic, Pessac, France). Locomotor activity was counted when animals interrupted two successive beams and thus had traveled along one quarter and expressed as the number of quarter turns / 5 min. Spontaneous activity was recorded for 120 minutes and the mice were then injected with amphetamine or 8-OH-DPAT plus amphetamine. 8-OH-DPAT was administered twice (30 min before and 1 h after amphetamine injection) to maintain its concentration during the effects of amphetamine. Only mice displaying locomotor activity superior to 120 ¼ turn/5min were considered as sensitized.

Microdialysis Surgery. Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, Sanofi Santé Animale, France). A unilateral permanent cannula (CMA/7 guide cannula; Phymep, Paris, France) was placed at the edge of the PFC. The coordinates for the guide cannula tips were: anteroposterior, +2.6 mm relative to bregma; mediolateral, +0.5 mm; dorsoventral, 0 from dura (Paxinos, G. and Franklin, K.B.J, 199715). After surgery, mice were placed in individual cages and allowed to recover for at least four days.

Microdialysis Experiments. On the day of the experiment, the microdialysis probe was inserted into the PFC (membrane length, 2 mm; diameter, 0.24 mm; cutoff, 6000 Da; CMA/7 microdialysis). Artificial CSF (in mM: 147 NaCl, 3.5 KCl, 1 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1 NaH₂PO₄, 25NaHCO₃, pH7.6) was perfused into the PCF with a CMA100 microinjection pump through the probe at a rate of 1µl/min via FEP catheter (internal diameter, 0.12mm)

connected to a fluid swivel. Appropriate steady-state 5-HT levels in perfusate samples were reached 140 min after probe insertion. Samples (20 µl every 20 min) were collected in a refrigerated fraction collector (CMA/170) over a period of 100 min for the determination of basal extracellular 5-HT levels

Biochemistry. Dialysate samples were placed in a refrigerated automatic injector (Triathlon; Spark Holland). High-performance liquid chromatography was performed with a reverse-phase column (80 x 4.6 mm; 3 µm particle size; HR-80; ESA). The mobile phase (0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 2.75 mM octane sulfonic acid, 0.25 mM triethylamine, 15% methanol, pH = 2.9) was delivered at a rate of 0.7 ml/min by an ESA-580 pump. Electrochemical detection was performed with an ESA coulometric detector (Coulchem II 5100A, with a 5014B analytical cell; Eurosep).

Quantitative Autoradiography of 5-HT_{1A} receptor expression. Mice were decapitated, brains were frozen in -30°C isopentane and stored at -80° C. 16µm sections of interest (RD and CA1 area of the hippocampus) were cut at -20 °C and stored at -80 °C. Sections were incubated for 20 min at room temperature (RT) in 50 mM Tris buffer pH = 7.4 and then for 1h at 20°C with the same buffer supplemented with 0.8 nM [³H]-WAY 100635 (81 Ci/mmol). Sections were washed twice in cold buffer (5 min each), briefly dipped in ice-cold distilled water, dried and exposed for one month. Nonspecific binding was assessed by adding 10µM 5-HT to the incubation medium. A Biocom densitometer was used for quantification. The optical density was measured on 6 to 12 sections/structure/animal. Specific binding was obtained by subtracting nonspecific binding from total binding.

Quantitative autoradiography of 5-HT_{1A}-mediated [³⁵S]GTPγS binding

Mice were decapitated and their brains were frozen by immersion in isopentane chilled at -30°C with dry ice, then stored at -80°C. 20 µm thick coronal sections were cut at -20°C, and thaw-mounted onto gelatin-coated slides. Autoradiographic measurement of 5-HT_{1A} receptor-stimulated [³⁵S] GTPγS binding in the dorsal raphe nucleus and the CA1 area of the hippocampus was performed according to Kelai et al. 2008. Briefly, brain sections were preincubated then incubated with 0.05 nM [³⁵S] GTPγS (1000 Ci/ mmol) either in the absence (basal conditions) or the presence (stimulated conditions) of 5-carboxamido-tryptamine (5-CT), a non selective 5-HT₁ receptor agonist with nanomolar affinity for 5-HT_{1A} receptors at three different concentrations (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ M). Serial sections were equally dispatched on the slides so that all section levels could be incubated with the three 5-CT concentrations. Non-specific binding was determined in the presence of 10⁻⁵ M WAY

100635 to block 5-HT_{1A} receptors (Fletcher et al. 1996). Optical density was measured on Biomax MR autoradiographic films (Kodak, Rochester, NY, USA) using computerized image software (Samba). 5-CT-stimulated [³⁵S] GTPγS binding is expressed as percentage over the baseline: [(stimulated-basal)/ basal] · 100.

Immunodetection of Gαi/o

Preparation of homogenates: Brains were obtained as described above and 400μm serial coronal sections were cut at -18 °C in a cryostat. We punched 10 mg of RD (n=8 mice/group) from the slices according to the atlas of Paxinos and Franklin (1997). These RD samples were sonicated (1 g/10 V) in ice-cold Tris-HCl buffer (50 mM Tris, pH = 7.3; 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.32 M sucrose) supplemented with a Protease Inhibitor Mixture tablet (Roche Diagnostics).

Western blot analysis: The protein concentrations were determined by the method of Bradford, with bovine serum albumin as the protein standard. Protein samples (35 μg) were boiled for 5 min at 95°C in NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen) containing 2.5% β-mercaptoethanol, and were then run on a 10% NuPAGE® SDS-PAGE Gel Electrophoresis System and transferred to PVDF membrane (Immobilon®, Millipore). Membranes were blocked by incubation for 1 h at RT in Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR Biosciences), and incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antibodies against G_{αi1} (1:600, ab19932), G_{αi2} (1:500, ab78193), rabbit polyclonal antibodies against G_{αi3} (1:300, SC-262), G_{αo} (1:300, SC-387), plus Tween-20 (0.1%). G_{αo} and G_{αi3} were purchased from Santa Cruz Biotech (Heldelberg, Germany), whereas G_{αi1} and G_{αi2} were obtained from Abcam (Cambridge, UK). Membranes were incubated for 1 h at RT in Odyssey Blocking Buffer plus Tween-20 (0.1%) with a goat anti-rabbit or a goat anti-mouse IR-Dye 680/800-coupled secondary antibody (1:5000, LI-COR Biosciences). Immunoreactivity was detected with the Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Beta actin (A544J; Sigma-Aldrich) immunodetection was performed, as an index of cellular protein level. Immunostaining was quantified with a ChemiGenius2 analyzer and software (Ozyme). Homogenates were studied in triplicate (n=8/group).

Statistics

We used Graph Pad Prism 5.0 software (San Diego, CA). Data from microdialysis and locomotor activity experiments are expressed as a function of time. Microdialysis data were normalized as a percentage of the respective mean basal value. Extracellular 5-HT levels were compared and analyzed by two-way ANOVA. When interactions were significant, we used Fisher's PLSD *post-hoc* test. In the 5-HT_{1A} agonist-induced [³⁵S]GTPγS binding, we used two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. For locomotor activity data obtained after amphetamine treatment, differences were assessed by two-way ANOVA (repeated measures) followed by a Tukey-Kramer *post-hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Each group contained eight animals, except for microdialysis experiments, for which each group contained five to eight animals.

Results

5-HT_{1A} antagonist potentiates the PCA-induced release of 5-HT in the PFC.

In saline-treated mice, an injection of PCA increased extracellular 5-HT levels in the PFC up of 600% whereas in sensitized mice, the same injection induced a release of 1000% [Figure 1A, Two-way ANOVA with time and treatment as first factor and sensitization (i.e. saline or amphetamine) as second factor: global interaction ($F_{(5,50)} = 4.016$, $p < 0.005$); Fisher's PLSD test $p < 0.05$ from 60 and 100 min]. We thus reproduce the serotonergic hyperreactivity observed in Salomon et al. 2006.

To test whether 5-HT_{1A}-R dysfunction could have a role in the potentiated serotonergic response observed in sensitized animals, we blocked these receptors with WAY 100635, a 5-HT_{1A} antagonist, in naïve mice. The injection of WAY 100635 30 min before PCA potentiated cortical 5-HT release to levels similar to those observed in amphetamine-sensitized mice [Figure 1A,B, two-way ANOVA with time and challenge (i.e., PCA or saline) as factors ($F_{(5,5)} = 11.73$ $p < 0.005$) Fisher's PLSD $p < 0.05$ from 60 and 120 min]. The 5-HT cortical release induced by both the injection of WAY 100635 and amphetamine is higher than those induced by PCA in amphetamine sensitized-mice. This stronger response is probably due to a too high dose of WAY 100635. Nevertheless, this result supports the idea of a possible alteration of 5-HT_{1A}-R in sensitized animals. 5-HT basal values were not different between saline and amphetamine groups (t test, $p = 0.8290$; basal values of 5-HT: naïve mice 0.341 ± 0.096 pg/sample, sensitized 0.326 ± 0.0157 pg/sample).

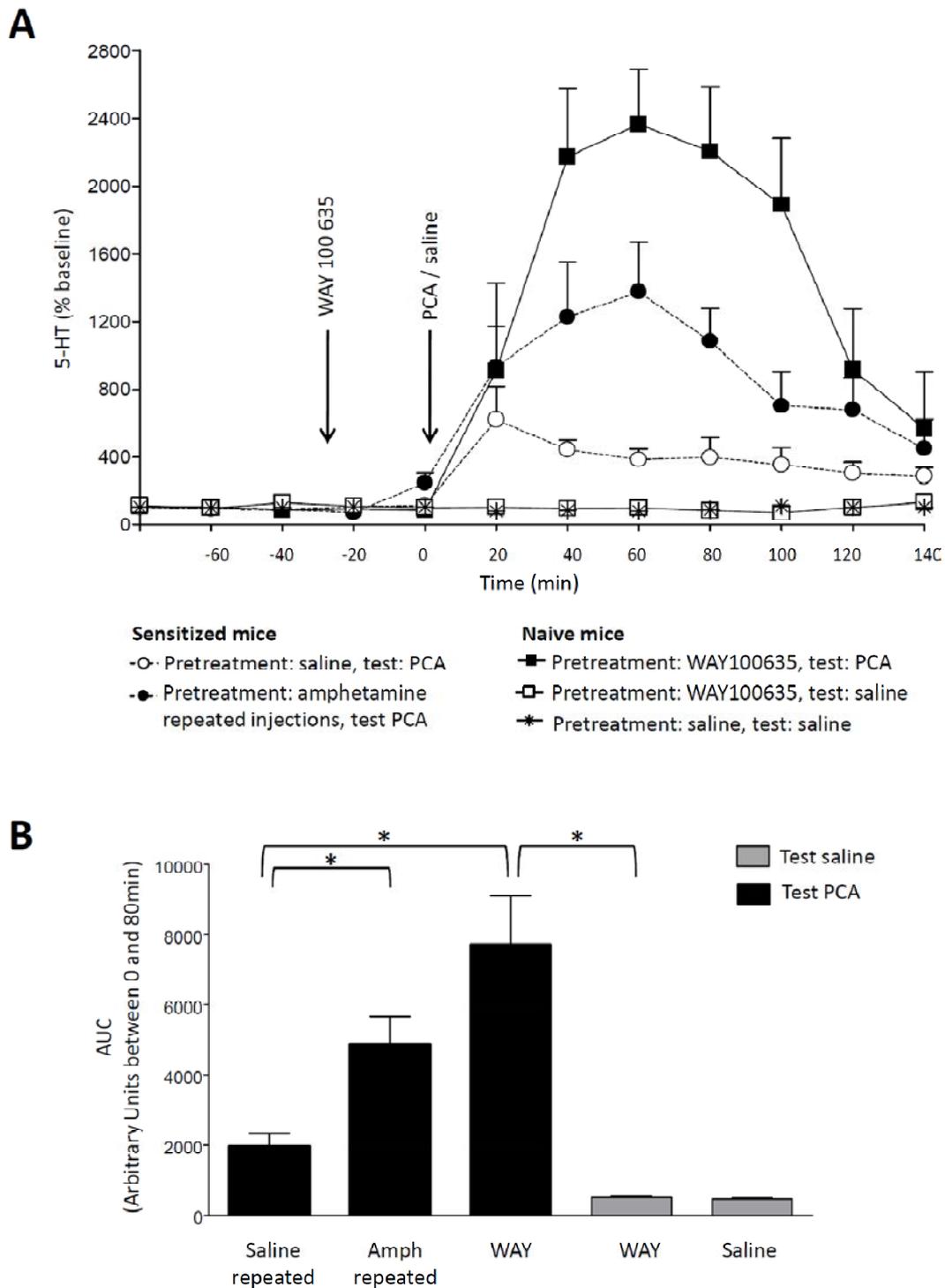


Figure 1: 5-HT_{1A} autoreceptors blockade in naïve mice induces similar PCA- induced 5-HT release to that observed in sensitized mice.

Mice received an injection of WAY 100 635 (0.5mg/kg, i.p.) followed 30 min later by para-chloro-amphetamine (PCA) (7mg/kg, i.p.) or saline. **(A)** Time course of 5-HT release in the prefrontal cortex. **(B)** Histograms of areas under the curve (AUC) between 0 and 100 min. Note that the 5-HT release induced by PCA in sensitized mice is similar after a 4-day and one month withdrawal (Salomon et al. 2006).

Effect of 8-OH-DPAT on cortical extracellular 5-HT levels in amphetamine-sensitized mice.

As expected and previously shown (Ago et al. 2003), an injection of 8-OH-DPAT decreased cortical 5-HT content over a period of 80 min in naïve mice. This decrease is significantly lower in amphetamine-sensitized mice after 4-days and 1-month withdrawal [Figure 2A,B, two-way ANOVA with time and treatment as factors, ($F_{(3,101)} = 16,65$; $p < 0,0001$); Fisher's PLSD test $p < 0,05$ from 20 and 60 min between control and 4-day withdrawal and from 20 and 80 min between control and 1-month]. These results suggest a long-lasting functional alteration of 5-HT_{1A} receptors. The 5-HT basal values were not significantly different between saline and sensitized animals after a 4-day or 1-month withdrawal (saline/4 days-withdrawal, t test=0.05934, $p=0.9525$; saline/1 month-withdrawal, t test=0.05389, $p=0.9573$). Basal values of 5-HT: control mice 0.371 ± 0.180 pg/sample, 4-day withdrawal sensitized 0.349 ± 0.179 pg/sample, 1-month withdrawal sensitized 0.343 ± 0.177 pg/sample).

Membrane Expression of 5-HT_{1A}-R in Sensitized Mice

To test whether 5-HT_{1A}-R functional alteration measured in sensitized mice was due to a decrease of receptors expression, we performed a quantitative autoradiography of 5-HT_{1A}-R using the radio-labeled antagonist [³H]-WAY 100635 in the RD (autoreceptors) and in the CA1 area of the hippocampus (heteroreceptors) (Figure 3A). There was no difference between [³H]-WAY 100635 binding in control or sensitized animals after a 4-days of withdrawal in none of the two areas (Figure 3B). Since serotonergic potentiation is already measure after a short withdrawal but no difference in 5-HT_{1A}-R expression was seen at that time point, it is unlikely that serotonergic neurochemical sensitization is sustained by a change of receptors expression.

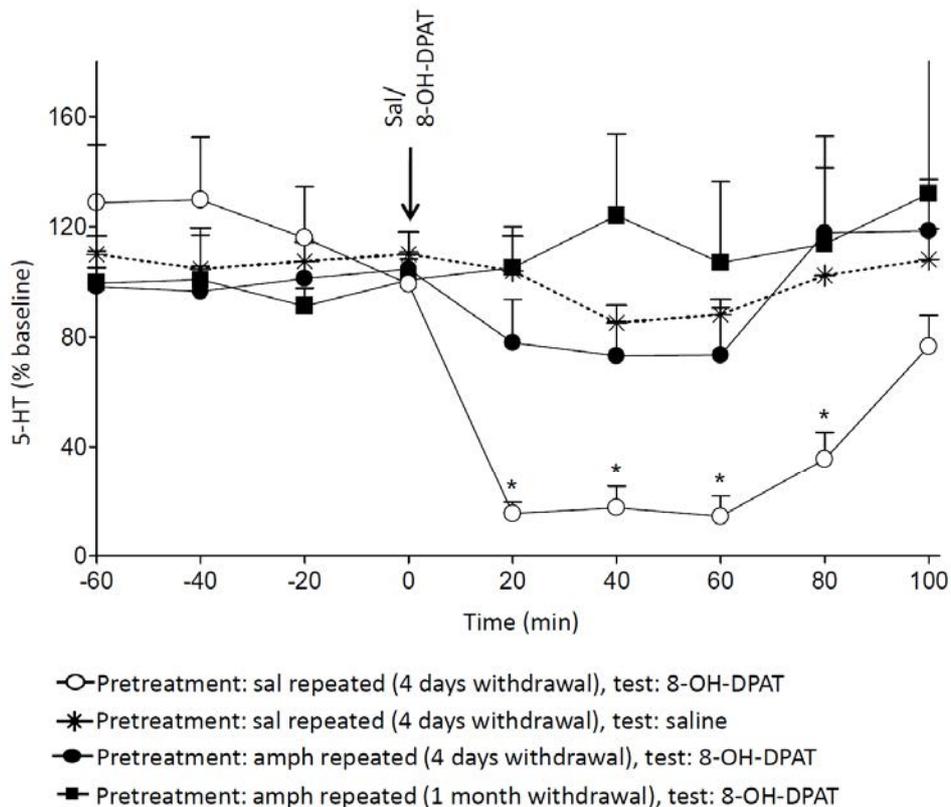
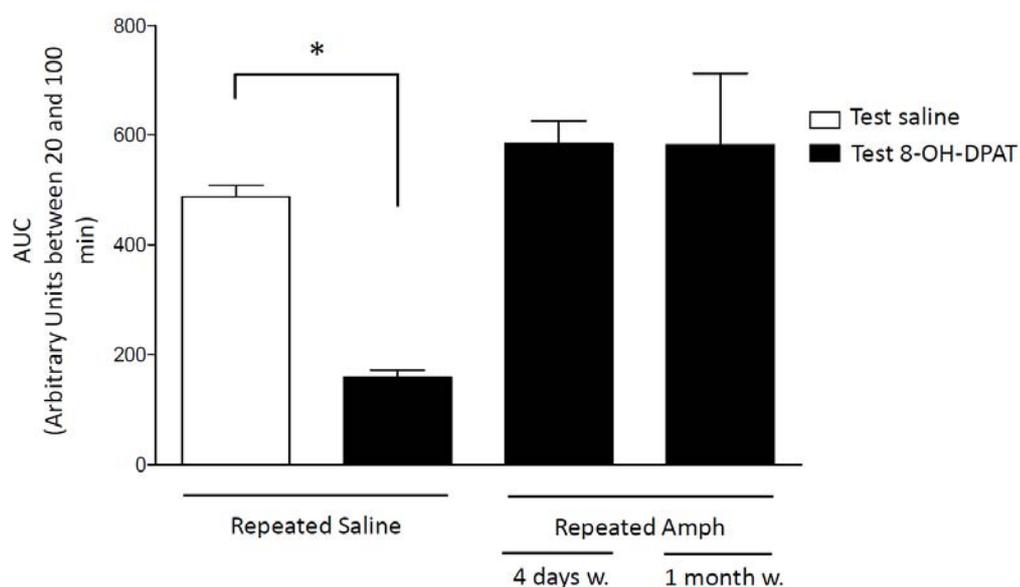
A**B**

Figure 2: Loss of 8-OH-DPAT capacity to induce decrease of 5-HT release in sensitized mice.

Mice received repeated amphetamine or saline injection followed, 4 days or 1 month later, by an 8-OH-DPAT injection. **(A)** Time course of 5-HT release. **(B)** Histograms of area under curves between 20 and 100 min (* $p < 0.05$ significantly different from repeated saline, test saline).

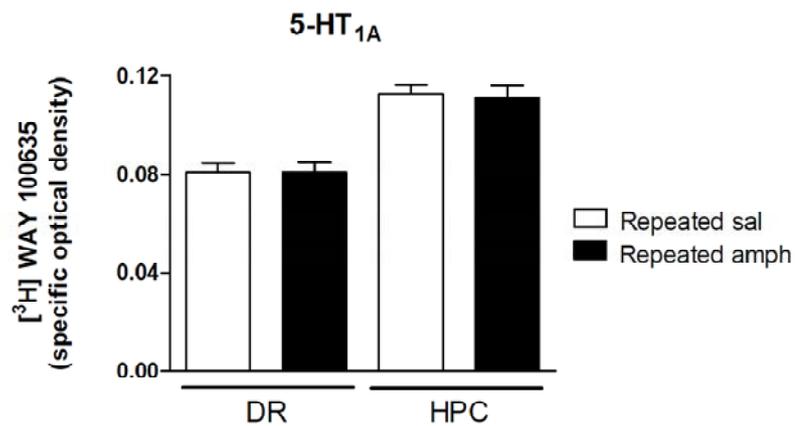
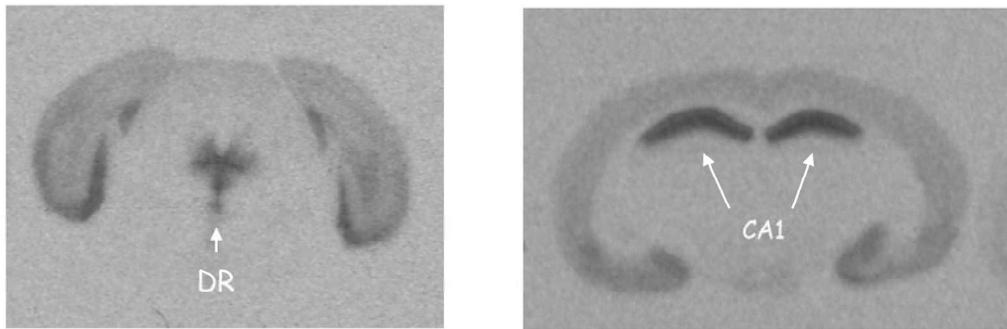


Figure 3: The expression of 5-HT_{1A}-R doesn't change after amphetamine-induced sensitization.

Labelled antagonist binding to 5-HT_{1A}-R in mice dorsal raphe (DR) and hippocampus (CA1). Animals received repeated amphetamine (2mg/kg) or saline injection **(A)** Autoradiography of the DR and CA1. **(B)** Optical density in the DR and CA1 of naïve and amphetamine-sensitized mice (differences are not significant).

Quantitative autoradiography of 5-HT_{1A} agonist-induced [³⁵S]GTPγS binding

Because 5-HT_{1A}-R expression was unchanged, we went a step further in the receptor signalling and measured the functional binding of 5-HT_{1A}-R to the coupled G protein for both the autoreceptors (located mainly in the DR) and the heteroreceptors (measured in the hippocampus). The percentage of agonist-induced [³⁵S]GTPγS binding was lower in the DR of amphetamine-sensitized mice after 3 weeks of withdrawal (Figure 4A, B), showing a decreased coupling between the receptors and the G protein (two-way ANOVA, $F_{(14,168)}=9.093$, Bonferroni post-hoc test $*p<0.05$). Interestingly, this decreased coupling was not observed at the level of the CA1 area of the hippocampus (Figure 4C), suggesting a specific decrease in the 5-HT_{1A} autoreceptors.

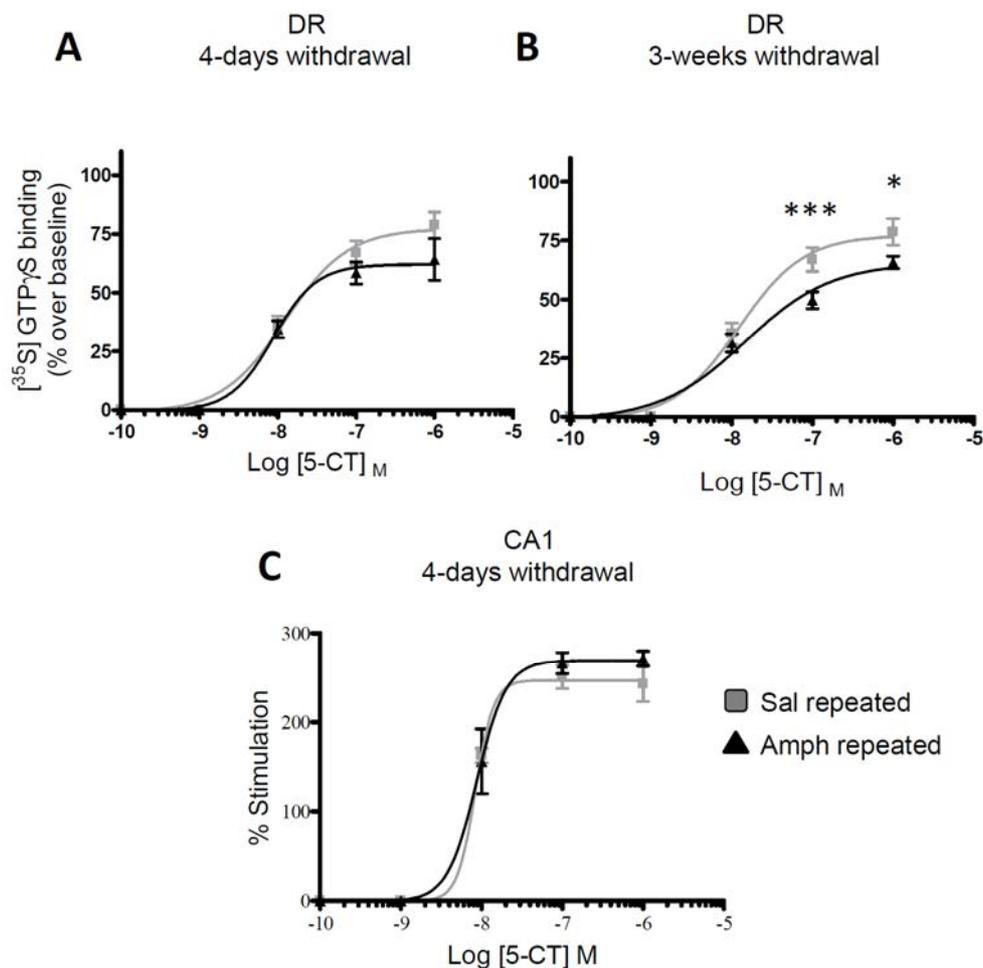


Figure 4: Amphetamine-sensitized mice exhibit a decreased 5-HT_{1A}/G_oi protein coupling after a long withdrawal. Quantitative autoradiography of 5-HT_{1A}-R-mediated [³⁵S]GTPγS binding in the dorsal raphe (DR) after 4-days (A) or one-month (B) of withdrawal and hippocampus (CA1) after 4-days of withdrawal (C) ($*p<0.05$)

G α i/o Levels in amphetamine-Sensitized Mice.

Since the 5-HT_{1A}-R expression is unchanged in sensitized animals but we measure functional decrease of coupling between these receptors and G proteins, we focused on G protein expression in sensitized animals. Western-blot analysis revealed that G α _{i1} levels were significantly lower in the DR tissues of amphetamine-sensitized mice after 4-days (G α _{i1} $t_{4.008}$, $p < 0.05$) and 1-month withdrawal (G α _{i1} $t_{2.842}$, $p < 0.05$) than in control (Figure 5). No difference was found in the levels of G α _{i2}, G α _{i3} and G α _o ($p > 0.05$).

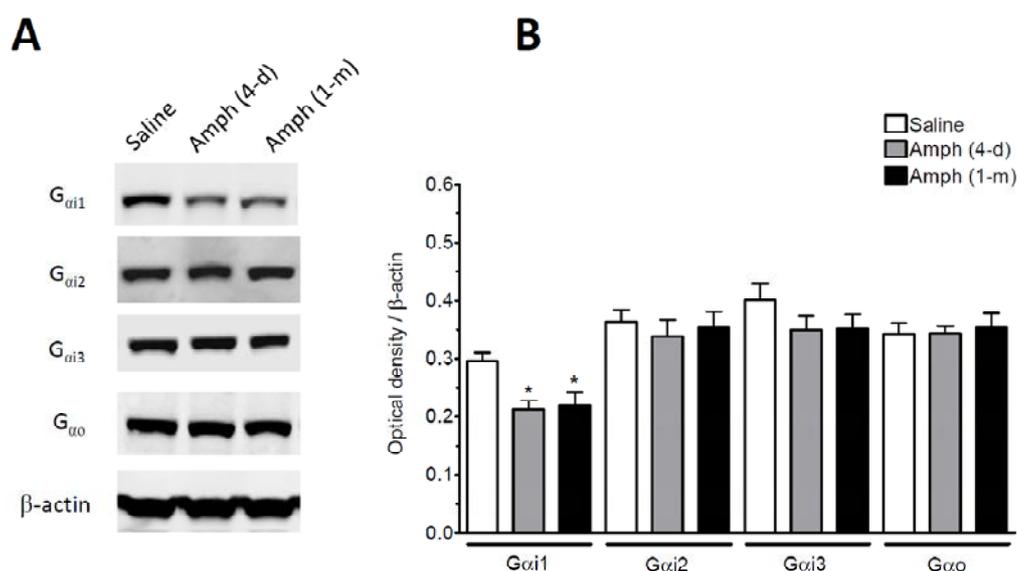


Figure 5: G α _{i1} protein expression is decreased in amphetamine-sensitized mice after a short and a long withdrawal. (A) Representative western-blot of the density of G α _{i1}, G α _{i2}, G α _{i3}, G α _o and β -actin proteins in sample of dorsal raphe nucleus tissue from control and amphetamine-sensitized mice after a 4-day or 1-month withdrawal. Each G α _{i/o} protein was detected with the corresponding antibody and migrated to its expected molecular weight (40 kDa). The β -actin migrated at 42KDa. (B) Histograms of optical density relative to that of β -actin, for each of the G α _{i/o} proteins, in amphetamine-sensitized animals after a 4-day or 1-month withdrawal (* $p < 0.05$ vs. the corresponding control).

Stimulation 5-HT_{1A}-R during amphetamine-induced behavioral sensitization

Activating 5-HT_{1A}-R while amphetamine is still active allowed us to test if a strong stimulation of these receptors had an effect on the induction of sensitization. Pre-treatment of 5-HT_{1A}-R with 8-OH-DPAT (1mg/kg) before amphetamine modified neither the induction nor the expression of amphetamine induced behavioral sensitization (Figure 6). However, for the first amphetamine injection coupled with 8-OH-DPAT agonist, we could measure a slight, non significant lower locomotor response (data not shown).

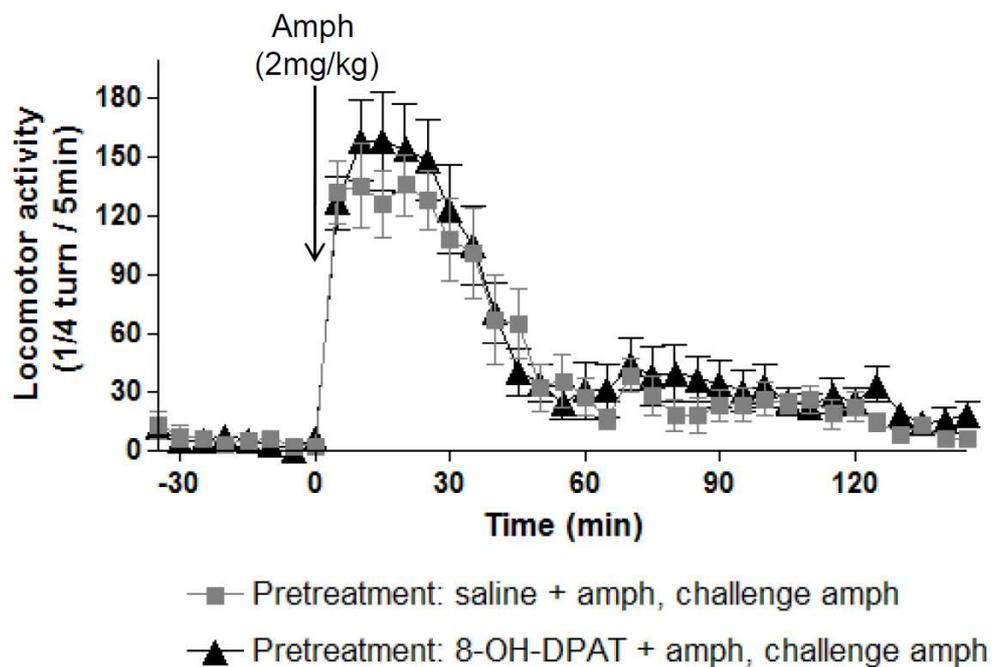


Figure 6: Activating 5-HT_{1A}-R feed-back with 8-OH-DPAT during sensitization doesn't affect amphetamine-induced behavioural sensitization. 8-OH-DPAT (1mg/kg) was injected with amphetamine on 4 consecutive days and mice were challenged with amphetamine alone 3 weeks later.

Discussion

We have shown that amphetamine-sensitized mice exhibit a persistent desensitization of 5-HT_{1A}-R. This alteration of the main serotonergic inhibitory feed-back is sustained by a decreased of G_{o1} protein expression, which decreases the functional coupling between the receptors and the G protein. It appears that the expression of 5-HT_{1A}-R is not changed in sensitized animals. Moreover, strongly stimulating serotonergic autoreceptors doesn't affect the induction or the expression of amphetamine-induced sensitization.

Before focusing on the function of 5-HT_{1A}-R in sensitized animals, we tested whether the blockade of these receptors could induce the same hyper-reactivity observed in treated animals but in naïve animals. 5-HT_{1A}-R blockade with WAY 100635 actually induced a high potentiated 5-HT release in the PFC after a PCA challenge. This result, similarly obtained by others (Luz Romero and Artigas 1997), suggests that the hypothesis of an impairment of 5-HT_{1A}-R in sensitized mice is accurate. It is noteworthy that WAY 100635 injection alone did not release 5-HT in control mice, according to its role as a silent 5-HT_{1A}-R antagonist (Forster et al. 1995; Routledge et al. 1993).

The hypothesis was then tested in amphetamine-sensitized animals. When possible, we set two time points: 4-days and 3-weeks to one-month of withdrawal (short and long withdrawal, respectively). In naïve mice, systemic injection of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A-7}-R agonist (Hedlund et al. 2004) induced a decrease of cortical 5-HT release, that is not observed any more in sensitized mice, after a short and a long withdrawal. This result suggests a long-lasting impairment of 5-HT_{1A}-R in amphetamine-sensitized mice. The inhibitory effect of 8-OH-DPAT on DR's areas of projection has been shown many times in the literature (Romero, Celada, and Artigas 1994; Bonvento et al. 1992) and it is thought to be mainly the result of 5-HT_{1A} autoreceptors-mediated activation of inhibitory feed-back. Nonetheless, because the injection of 8-OH-DPAT was systemic, we cannot rule out a possible role of the 5-HT_{1A}-R expressed post-synaptically. This result differs with one study carried out on rats, in which the authors measured an increase of [³H]8-OH-DPAT binding to 5-HT_{1A}-R in the DR of amphetamine-induced sensitized animals after one day and 15 days of withdrawal (Bonhomme et al. 1995). However, in addition to the difference of species, the dose of amphetamine used in the later study is around 5 times higher than the dose we used, and is given twice a day for 6 days, contrary to once a day for 4 days in our protocol. In this respect, the authors assess behavioural sensitization rating stereotyped behaviours, while with our dose of amphetamine, this behaviour is not observed. The conflicting results

can thus be explained by the difference of drug exposure, since locomotor response and stereotyped behaviours are competitive behaviours probably controlled by different neuronal systems (Vanderschuren and Pierce 2010).

After proving the long-term desensitization of 5-HT_{1A}-R in sensitized mice, we focused on the mechanisms sustaining this desensitization. The first logical hypothesis was a down regulation of receptors expression. However, quantitative autoradiography of 5-HT_{1A}-R showed no changes in receptor expression after amphetamine treatment after a short withdrawal. In an attempt to discriminate autoreceptors from heteroreceptors, we measured the labeling of the antagonist [³H]-WAY 100635 in the RD (autoreceptors) and in the CA1 area of the hippocampus (heteroreceptors), but the same optical density was measured between saline or amphetamine treated animals in both regions.

We then shifted our attention to the following step of the intracellular signaling, the coupling with the G_{oi} proteins. Using agonist-induced [³⁵S] GTPγS binding, we obtained a functional measure of the coupling between 5-HT_{1A}-R and G_{oi} proteins. In amphetamine sensitized mice, this coupling was decreased after a long withdrawal. Interestingly, this decrease was only observed in the RD and not in the hippocampus, suggesting a specific change of presynaptic 5-HT_{1A}-R only.

Undoubtedly, because agonist and antagonist injections are systemic, our data cannot ascertain that the desensitization concerns only autoreceptors, but a body of evidence leads to that conclusion. First of all, it has been suggested that pre and post-synaptic 5-HT_{1A}-R differ in response to 5-HT_{1A} ligands (Ago et al. 2003). Indeed, pindolol, a 5-HT_{1A}-R weak partial agonist and antagonist, seems to have more potent blocking properties of pre-synaptic 5-HT_{1A}-R than post-synaptic ones (Romero et al. 1996). A different response to a same treatment between auto and heteroreceptors has also previously been observed. Indeed, a study shows an uncoupling between 5-HT_{1A}-R and G_{oi} proteins only in the RD after chronic fluoxetine treatment, but no change in other regions where 5-HT_{1A}-R are expressed as heteroreceptors (substantia nigra and hippocampus) (Pejchal et al. 2002). Lastly, a study shows that the presynaptic 5-HT_{1A}-R of the RD is more sensitive to inhibition by the antagonist WAY 100635 than the postsynaptic 5-HT_{1A}-R (Ago et al. 2003). The reason for this divergence is still unknown. It has been suggested that differences in receptor reserve or the efficacy of coupling with the signal transduction system could explain these distinctions, since K_d values of WAY 100635 and its potency in antagonizing 5-HT_{1A}-R-

mediated responses are similar for pre and postsynaptic receptors (Corradetti et al. 1996; Castro et al. 2000; Ago et al. 2003).

Moreover, the expression of $G_{\alpha 1}$ was decreased after both 4-days and one-month of withdrawal, suggesting that this down regulation of $G_{\alpha 1}$ expression could explain the decreased coupling to the 5-HT_{1A} autoreceptors. Although a pool of several $G_{\alpha i}$ proteins are expressed in the RD ($G_{\alpha 1}$, $G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 3}$, $G_{\alpha/o}$), a study reports that 5-HT_{1A}-R interact exclusively with the $G_{\alpha 3}$ subtype in the rat raphe area (Mannoury la Cour et al. 2006). In our conditions, $G_{\alpha 3}$ expression isn't modified in sensitized mice, and we believe $G_{\alpha 1}$ down regulation still can affect 5-HT_{1A}-R intracellular signalling. First, we speculate that differences of coupling partners can be seen between species. Secondly, down regulation of $G_{\alpha 1}$ subtype could logically impact the functioning the pool of $G_{\alpha i}$ of proteins. Like so, in sensitized mice, receptors usually binding several $G_{\alpha i}$ proteins would compensate $G_{\alpha 1}$ down regulation with increased $G_{\alpha 3}$ binding. This would decrease $G_{\alpha 3}$ availability and result in a lower efficacy of 5-HT_{1A}-R/ $G_{\alpha 3}$ coupling. Mechanisms showing heteroregulation of 5-HT_{1A}-R by another receptor have been described in the literature. One example establishes that the blockade of CB1 receptors induced a functional desensitization of 5-HT_{1A}-R in the RD (Aso et al. 2009).

Finally, activating serotonergic feed-back during amphetamine's effect doesn't have any impact on drug-induced behavioural sensitization. Our result contrasts with other studies which main findings show an attenuation of methamphetamine sensitization by a 5-HT_{1A}-R agonist (Ago et al. 2006) or a complete inhibition of amphetamine sensitization by 8-OH-DPAT, another 5-HT_{1A}-R agonist (Przegaliński et al. 2000). Our result implies that 5-HT_{1A}-R do not take a part in sensitisation, but that desensitization of these receptors would be a secondary effect of amphetamine exposure. It isn't surprising, since in our conditions, 2mg/kg of amphetamine doesn't release 5-HT in mice. However, several results suggest a shared, similar role of noradrenergic and serotonergic receptors in drug-induced behavioural sensitization, since the specific blockade of α_{1B} -adrenergic and 5-HT_{2A} serotonergic receptors completely block sensitization (Tassin 2008). Recent work showed a long-lasting desensitization of α_{2A} -adrenergic receptors, the receptors controlling noradrenergic inhibitory feed-back (Doucet et al. 2013). Modifying α_{2A} -adrenergic receptors drastically influenced amphetamine-induced behavioural sensitization. It is tempting to think that for drugs of abuse inducing a release of 5-HT, like morphine or heroin, 5-HT_{1A}-R could exhibit a similar control of induced locomotor response.

Conclusion

The main result of this work is that, at low doses, 2mg/kg amphetamine-induced behavioural sensitization long-lastingly impairs 5-HT_{1A}-R signalling. This desensitization is maintained by a persistent decrease of G_{α1} protein expression which most likely decreases 5-HT_{1A}-R/G_{α3} coupling. Since, at this dose, amphetamine doesn't release 5-HT in mice, it would be interesting to analyze 5-HT_{1A}-R desensitization with other more serotonergic drugs, to see if this alteration can impact drug-induced behavioural responses.

References

- Ago, Y, S Nakamura, M Uda, Y Kajii, M Abe, A Baba, et T Matsuda. 2006. « Attenuation by the 5-HT_{1A} receptor agonist osetozotan of the behavioral effects of single and repeated methamphetamine in mice. » *Neuropharmacology* 51: 914-22. doi:S0028-3908(06)00186-9 [pii] 10.1016/j.neuropharm.2006.06.001.
- Ago, Y., Y. Koyama, A. Baba, et T. Matsuda. 2003. « Regulation by 5-HT_{1A} receptors of the in vivo release of 5-HT and DA in mouse frontal cortex. » *Neuropharmacology* 45: 1050-6. doi:S0028390803003046 [pii].
- Aso, Ester, Thibault Renoir, Guadalupe Mengod, Catherine Ledent, Michel Hamon, Rafael Maldonado, Laurence Lanfumey, et Olga Valverde. 2009. « Lack of CB1 Receptor Activity Impairs Serotonergic Negative Feedback ». *Journal of Neurochemistry* 109 (3): 935-944. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06025.x.
- Bonhomme, N, M Cador, L Stinus, M Le Moal, et U Spampinato. 1995. « Short and long-term changes in dopamine and serotonin receptor binding sites in amphetamine-sensitized rats: a quantitative autoradiographic study. » *Brain Res* 675: 215-23. doi:0006-8993(95)00067-Z [pii].
- Bonvento, G, B Scatton, Y Claustre, et L Rouquier. 1992. « Effect of Local Injection of 8-OH-DPAT into the Dorsal or Median Raphe Nuclei on Extracellular Levels of Serotonin in Serotonergic Projection Areas in the Rat Brain ». *Neuroscience Letters* 137 (1): 101-104.
- Castro, M E, P J Harrison, A Pazos, et T Sharp. 2000. « Affinity of (±)-Pindolol, (-)-Penbutolol, and (-)-Tertatolol for Pre- and Postsynaptic Serotonin 5-HT_{1A} Receptors in Human and Rat Brain ». *Journal of Neurochemistry* 75 (2): 755-762. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750755.x.
- Corradetti, R., E. Le Poul, N. Laaris, M. Hamon, et L. Lanfumey. 1996. « Electrophysiological Effects of N-(2-(4-(2-Methoxyphenyl)-1-Piperazinyl)ethyl)-N-(2-Pyridinyl) Cyclohexane Carboxamide (WAY 100635) on Dorsal Raphe Serotonergic Neurons and CA1 Hippocampal Pyramidal Cells in Vitro. » *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 278 (2): 679-688.
- Cunningham, KA, JM Paris, et NE Goeders. 1992. « Serotonin neurotransmission in cocaine sensitization. » *Ann N Y Acad Sci* 654: 117-27.
- De Deurwaerdère, Philippe, et Umberto Spampinato. 1999. « Role of Serotonin_{2A} and Serotonin_{2B/2C} Receptor Subtypes in the Control of Accumbal and Striatal Dopamine Release Elicited In Vivo by Dorsal Raphe Nucleus Electrical Stimulation ». *Journal of Neurochemistry* 73 (3): 1033-42. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0731033.x.

- Doucet, Emilie L., Ana-Clara Bobadilla, Vanessa Houades, Christophe Lanteri, Gérard Godeheu, Laurence Lanfumey, Susan J. Sara, et Jean-Pol Tassin. 2013. « Sustained Impairment of α 2A-Adrenergic Autoreceptor Signaling Mediates Neurochemical and Behavioral Sensitization to Amphetamine ». *Biological Psychiatry* 74 (2): 90-98. doi:10.1016/j.biopsych.2012.11.029.
- Fletcher, A., E. A. Forster, D. J. Bill, G. Brown, I. A. Cliffe, J. E. Hartley, D. E. Jones, et al. 1996. « Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT1A receptor antagonist. » *Behav Brain Res* 73: 337-53.
- Forster, Elaine A., Ian A. Cliffe, David J. Bill, Gillian M. Dover, Deborah Jones, Yvonne Reilly, et Allan Fletcher. 1995. « A pharmacological profile of the selective silent 5-HT1A receptor antagonist, WAY-100635 ». *European Journal of Pharmacology* 281 (1): 81-88. doi:10.1016/0014-2999(95)00234-C.
- Hamon, M, L Lanfumey, S el Mestikawy, C Boni, M C Miquel, F Bolaños, L Schechter, et H Gozlan. 1990. « The Main Features of Central 5-HT1 Receptors ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 3 (5-6): 349-360.
- Hedlund, PB, L Kelly, C Mazur, T Lovenberg, JG Sutcliffe, et P Bonaventure. 2004. « 8-OH-DPAT acts on both 5-HT1A and 5-HT7 receptors to induce hypothermia in rodents. » *Eur J Pharmacol* 487: 125-32. doi:S0014299904001104 [pii] 10.1016/j.ejphar.2004.01.031.
- Hoyer, Daniel, Jason P Hannon, et Graeme R Martin. 2002. « Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71 (4): 533-554. doi:10.1016/S0091-3057(01)00746-8.
- Itzhak, Yossef, Cindy N Achat-Mendes, Syed F Ali, et Karen L Anderson. 2004. « Long-lasting behavioral sensitization to psychostimulants following p-chloroamphetamine-induced neurotoxicity in mice ». *Neuropharmacology* 46 (1): 74-84.
- Keläi, S, T Renoir, L Chouchana, F Saurini, N Hanoun, M Hamon, et L Lanfumey. 2008. « Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. » *J Neurochem* 107: 1660-70.
- Lanteri, C, SJ Hernández Vallejo, L Salomon, EL Doucet, G Godeheu, Y Torrens, V Houades, et JP Tassin. 2009. « Inhibition of monoamine oxidases desensitizes 5-HT1A autoreceptors and allows nicotine to induce a neurochemical and behavioral sensitization. » *J Neurosci* 29: 987-97.
- Lanteri, C, L Salomon, Y Torrens, J Glowinski, et JP Tassin. 2008. « Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. » *Neuropsychopharmacology* 33: 1724-34.
- Lanteri, C., E. L. Doucet, S. J. Hernández Vallejo, G. Godeheu, A.-C. Bobadilla, L. Salomon, L. Lanfumey, et J.-P. Tassin. 2013. « Repeated Exposure to MDMA Triggers Long-Term Plasticity of Noradrenergic and Serotonergic Neurons ». *Molecular Psychiatry*, août. doi:10.1038/mp.2013.97. <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/mp/journal/vaop/ncurrent/full/mp201397a.html>.
- Mannoury la Cour, Clotilde Mannoury la, Salah El Mestikawy, Naïma Hanoun, Michel Hamon, et Laurence Lanfumey. 2006. « Regional Differences in the Coupling of 5-Hydroxytryptamine-1A Receptors to G Proteins in the Rat Brain ». *Molecular Pharmacology* 70 (3): 1013-1021. doi:10.1124/mol.106.022756.
- Miszkiel, Joanna, Małgorzata Filip, et Edmund Przegaliński. 2011. « Role of serotonin (5-HT)1B receptors in psychostimulant addiction ». *Pharmacological reports: PR* 63 (6): 1310-1315.

- Nic Dhonnchadha, BA, et KA Cunningham. 2008. « Serotonergic mechanisms in addiction-related memories. » *Behav Brain Res* 195: 39-53. doi:S0166-4328(08)00314-8 [pii] 10.1016/j.bbr.2008.06.026.
- Pejchal, Tina, Melissa A Foley, Barry E Kosofsky, et Christian Waeber. 2002. « Chronic Fluoxetine Treatment Selectively Uncouples Raphe 5-HT1A Receptors as Measured by [35S]-GTPγS Autoradiography ». *British Journal of Pharmacology* 135 (5): 1115-1122. doi:10.1038/sj.bjp.0704555.
- Przegaliński, E, J Siwanowicz, L Baran, et M Filip. 2000. « Activation of serotonin (5-HT)1A receptors inhibits amphetamine sensitization in mice. » *Life Sci* 66: 1011-9. doi:S0024320599006669 [pii].
- Romero, L, P Celada, et F Artigas. 1994. « Reduction of in vivo striatal 5-hydroxytryptamine release by 8-OH-DPAT after inactivation of Gi/G(o) proteins in dorsal raphe nucleus. » *Eur J Pharmacol* 265: 103-6. doi:0014-2999(94)90230-5 [pii].
- Romero, L., N. Bel, F. Artigas, C. de Montigny, et P. Blier. 1996. « Effect of Pindolol on the Function of Pre- and Postsynaptic 5-HT1A Receptors: In Vivo Microdialysis and Electrophysiological Studies in the Rat Brain ». *Neuropsychopharmacology* 15 (4): 349-360. doi:10.1016/0893-133X(95)00240-E.
- Romero, Luz, et Francesc Artigas. 1997. « Preferential Potentiation of the Effects of Serotonin Uptake Inhibitors by 5-HT1A Receptor Antagonists in the Dorsal Raphe Pathway: Role of Somatodendritic Autoreceptors ». *Journal of Neurochemistry* 68 (6): 2593-2603. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.68062593.x.
- Routledge, C, J Gurling, I K Wright, et C T Dourish. 1993. « Neurochemical Profile of the Selective and Silent 5-HT1A Receptor Antagonist WAY100135: An in Vivo Microdialysis Study ». *European Journal of Pharmacology* 239 (1-3): 195-202.
- Russo, Scott J., David M. Dietz, Dani Dumitriu, John H. Morrison, Robert C. Malenka, et Eric J. Nestler. 2010. « The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens ». *Trends in Neurosciences* 33 (6): 267-276. doi:10.1016/j.tins.2010.02.002.
- Salomon, L, C Lanteri, J Glowinski, et JP Tassin. 2006. « Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7476-81.
- Salomon, Lucas, Christophe Lanteri, Jacques Glowinski, et Jean-Pol Tassin. 2006. « Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (19): 7476-7481. doi:10.1073/pnas.0600839103.
- Steketee, J. D., et P. W. Kalivas. 2011. « Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. » *Pharmacol Rev* 63: 348-65. doi:pr.109.001933 [pii] 10.1124/pr.109.001933.
- Tassin, JP. 2008. « Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. » *Biochem Pharmacol* 75: 85-97.
- Vanderschuren, Louk J M J, et R Christopher Pierce. 2010. « Sensitization Processes in Drug Addiction ». *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 3: 179-195. doi:10.1007/7854_2009_21.

Publication n°4 :

L'exposition répétée au MDMA induit une plasticité à long terme des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques

Publication n°4 : L'exposition répétée au MDMA induit une plasticité à long terme des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques.

Auteurs : Christophe Lanteri, Emilie L. Doucet, Sandra J. Hernandez Vallejo, Gérard Godeheu, Ana-Clara Bobadilla, Lucas Salomon, Laurence Lanfumey et Jean-Pol Tassin

Statut : Publié dans le journal « Molecular Psychiatry », 2013

Résumé

Les derniers travaux de l'équipe ont montré l'existence d'une sensibilisation neurochimique, c'est-à-dire d'une hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique corrélée à la sensibilisation comportementale lors d'injections répétées d'amphétamine, de cocaïne, de morphine, d'alcool et de nicotine, lorsque cette dernière est couplée à des inhibiteurs de monoamines oxydases (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008; Lanteri et al. 2009). L'hyper-réactivité exige l'activation des récepteurs α_{1B} -adrénergiques et 5-HT_{2A} sérotoninergiques, sans lesquels les sensibilisations comportementale et neurochimique sont bloquées (Tassin 2008). Un des mécanismes qui maintient cette hyper-réactivité à long terme est une désensibilisation fonctionnelle des autorécepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A} sérotoninergiques (Doucet et al. 2013). Ces récepteurs produisent un rétrocontrôle inhibiteur des transmissions noradrénergique et sérotoninergique, respectivement, et sont couplés aux protéines G_{ai/o}, dont certains sous-types sont sous-exprimés chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine.

Ce travail confirme et généralise les études sur la sensibilisation neurochimique en explorant les effets de l'exposition répétée au MDMA (ou ecstasy), un dérivé amphétaminique détourné pour un usage récréatif. Notons que la dose utilisée pour obtenir la sensibilisation comportementale reste faible (10mg/kg), afin d'éviter les effets toxiques du MDMA à plus fortes doses (Logan et al. 1988).

Résultats principaux

Un des résultats intéressants de cette étude est la mise en évidence de l'effet du MDMA sur la transmission noradrénergique.

1. Une injection aiguë systémique de MDMA induit une libération de noradrénaline (NA) au niveau du cortex préfrontal (CPF). Ce résultat accroît les propriétés du MDMA, substance souvent réduite à l'induction d'une libération de dopamine (DA) et de sérotonine (5-HT) (Baumann, Clark, et Rothman 2008).

Comme toutes les drogues, les injections répétées de MDMA induisent une sensibilisation comportementale (L. H. Gold et Koob 1989).

2. De façon identique aux autres drogues déjà testées, la sensibilisation comportementale est corrélée à une sensibilisation neurochimique. Cette dernière se traduit par une hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique en réponse à des injections d'amphétamine, qui libère la NA et de para-chloro-amphétamine (PCA), qui libère la 5-HT.

Les récepteurs α_{1B} -adrénergiques et 5-HT_{2A} sérotoninergiques jouent également un rôle dans l'hyper-réactivité des deux systèmes. En effet, l'administration simultanée d'antagonistes de ces récepteurs en même temps que l'amphétamine bloque totalement les sensibilisations comportementale et neurochimique.

L'hyper-réactivité est définie par la réponse exacerbée au stimulus, mais celui-ci étant toujours systémique, il était difficile d'établir s'il s'agit d'une réactivité au niveau du soma ou dans les terminaisons.

3. Les injections locales dans le CPF d'amphétamine et de PCA induisent une libération corticale de NA et de 5-HT, mais cette réponse est de même amplitude chez les animaux sensibilisés et chez les contrôles. Ceci suggère que l'hyper-réactivité observée chez les animaux sensibilisés n'est pas une conséquence d'adaptations au niveau terminal, mais une adaptation somato-dendritique des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques.

Le maintien à long terme de la sensibilisation neurochimique passant par une désensibilisation des autorécepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A} sérotoninergiques chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine (Doucet et al. 2013), la fonctionnalité de ces récepteurs a été testée chez les animaux sensibilisés au MDMA.

4. Les animaux sensibilisés au MDMA présentent bien une altération du rétrocontrôle noradrénergique et sérotoninergique. En effet, les agonistes de ces récepteurs induisent une diminution de la libération corticale de NA et de 5-HT plus faible chez les animaux sensibilisés. La dexmedetomidine, agoniste des récepteurs α_{2A} , induit une perte de réflexe de redressement qui dure moins longtemps chez les animaux sensibilisés que chez les contrôles. Quant à l'agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, il induit une hypothermie plus faible chez les animaux sensibilisés au MDMA. Ces deux effets se maintiennent à long terme, puisqu'ils sont observables après 4 jours et un mois de sevrage.

Remarquons que seules les injections locales de l'agoniste des récepteurs α_{2A} -adrénergiques dans le locus coeruleus (LC) ou 5-HT_{1A} dans le raphé dorsal (RD) induisent des libérations de NA ou de 5-HT plus faibles chez les animaux sensibilisés, ce qui confirme l'adaptation somato-dendritique des autorécepteurs α_{2A} -adrénergiques dans le LC ou 5-HT_{1A} dans le RD chez les animaux sensibilisés.

5. La désensibilisation des autorécepteurs est maintenue à long terme par une diminution de l'expression des protéines $G_{\alpha_{i1-2}}$ dans le LC et $G_{\alpha_{i3}}$ dans le RD, diminution non observée dans le CPF, une des zones de projection de ces noyaux où l'expression des récepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A} sont post-synaptiques.
6. La diminution d'expression des protéines G_{α_i} n'est pas accompagnée de diminution des niveaux d'ARNm de ces protéines dans le LC ni dans le RD.

Conclusions

De manière similaire à toutes les autres drogues déjà testées, les injections répétées de MDMA induisent une sensibilisation neurochimique des transmissions noradrénergique et sérotoninergique corrélée à la sensibilisation comportementale.

Cette hyper-réactivité passe par les récepteurs α_{1B} -adrénergiques et 5-HT_{2A} sérotoninergiques et se maintient à long terme grâce notamment à une désensibilisation chronique des récepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A} sérotoninergiques, elle-même maintenue par une diminution de l'expression des protéines G _{α_{i1-2}} du LC et G _{α_{i3}} du RD chez les animaux sensibilisés.

Enfin, la diminution d'expression des protéines G _{α_i} est probablement maintenue au niveau post-transcriptionnel et affecte peut-être la stabilité de la protéine ou à son adressage à la membrane, phénomènes déjà observés dans la littérature (Giguère et al. 2012).

Il est intéressant de remarquer que les résultats des expériences d'injections locales ainsi que la mesure de l'expression des protéines G _{α_i} effectuées dans ce travail complètent les arguments en faveur d'une modification persistante au niveau somato-dendritique, où les récepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A} sérotoninergiques jouent le rôle d'autorécepteurs.

ORIGINAL ARTICLE

Repeated exposure to MDMA triggers long-term plasticity of noradrenergic and serotonergic neurons

C Lanteri^{1,2,3}, EL Doucet^{1,2,3}, SJ Hernández Vallejo⁴, G Godeheu^{1,2,3}, A-C Bobadilla^{1,2,3}, L Salomon⁵, L Lanfumey⁶ and J-P Tassin^{1,2,3}

3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA or 'ecstasy') is a psychostimulant drug, widely used recreationally among young people in Europe and North America. Although its neurotoxicity has been extensively described, little is known about its ability to strengthen neural circuits when administered in a manner that reproduces human abuse (i.e. repeated exposure to a low dose). C57BL/6J mice were repeatedly injected with MDMA (10 mg kg⁻¹, intraperitoneally) and studied after a 4-day or a 1-month withdrawal. We show, using *in vivo* microdialysis and locomotor activity monitoring, that repeated injections of MDMA induce a long-term sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons, which correlates with behavioral sensitization. The development of this phenomenon, which lasts for at least 1 month after withdrawal, requires repeated stimulation of α_{1B} -adrenergic and 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptors. Moreover, behavioral and neuroendocrine assays indicate that hyper-reactivity of noradrenergic and serotonergic networks is associated with a persistent desensitization of somatodendritic α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptor function. Finally, molecular analysis including radiolabeling, western blot and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction reveals that mice repeatedly treated with MDMA exhibit normal α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptor binding, but a long-lasting downregulation of G α proteins expression in both locus coeruleus and dorsal raphe nucleus. Altogether, our results show that repeated MDMA exposure causes strong neural and behavioral adaptations and that inhibitory feedback mediated by α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptors has an important role in the physiopathology of addictive behaviors.

Molecular Psychiatry advance online publication, 20 August 2013; doi:10.1038/mp.2013.97

Keywords: α_{2A} -adrenergic autoreceptors; behavioral sensitization; Gi proteins; 5-HT_{1A} autoreceptors; MDMA; neuroplasticity

INTRODUCTION

3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA), commonly known as 'ecstasy', is a substituted amphetamine with psychostimulant and hallucinogenic properties. This illicit drug is extensively consumed by teenagers and young people in clubs and rave parties, despite the increasing evidence of its putative neurotoxicity^{1–3} and its adverse effects on mental health. Indeed, chronic use of MDMA has been associated with many psychiatric disorders including anxiety, depression or psychosis,^{4–6} and may lead to addiction in vulnerable individuals.

In rodents, MDMA induces locomotor hyperactivity and repeated injections result in behavioral sensitization.^{8–10} This long-lasting phenomenon is thought to have a critical role in the development of compulsive drug seeking and drug taking, as well as in cue-induced relapse.^{11,12}

Studies of the brain circuits underlying addictive behaviors have focused on the mesolimbic dopaminergic system,^{13,14} as it was shown that all drugs of abuse, including MDMA, increase extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens of rodents.^{15–18} However, several *in vitro* studies indicate that MDMA shows higher affinity for both norepinephrine and serotonin transporters than for dopamine transporter.^{19–21}

Moreover, growing evidence suggests that the involvement of both noradrenergic and serotonergic systems in MDMA-induced addictive behaviors may have been seriously underestimated. The pharmacological blockade of either α_1 -adrenergic or 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptors reduces the hyperlocomotor effects

of MDMA and prevents the development of behavioral sensitization.^{22,23} Also, self-administration of MDMA is abolished in mice lacking the serotonin transporter (serotonin transporter KO mice),²⁴ whereas mice lacking 5-HT_{2A} receptors (5-HT_{2A} KO mice) are insensitive to MDMA-induced reinforcement and cue-induced reinstatement of MDMA-seeking behaviors.²⁵

Recently, we identified a new kind of neural plasticity that may be involved in the long-term behavioral effects of drugs of abuse. Indeed, we showed that repeated administration of amphetamine, cocaine, morphine, ethanol or nicotine + monoamine oxidase inhibitor induces long-lasting sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons in C57BL/6J mice.^{26–29} Molecular mechanisms underlying this phenomenon remain however unknown.

The main purpose of this study was to investigate the long-term effects of a repeated MDMA exposure on noradrenergic and serotonergic transmissions. The reactivity of noradrenergic and serotonergic neurons was investigated by *in vivo* microdialysis in the prefrontal cortex (PFC) and behavioral effects were recorded in parallel. The mechanisms underlying MDMA-induced changes were then investigated at the molecular, physiological and behavioral levels.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Animals were 2–3 months old (26–32 g) C57BL/6J male mice (Charles River, L'Arbresle, France). They were housed eight per cage and maintained on a 12 h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. Seven

¹Laboratoire de Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, CNRS UMR 7224, Paris, France; ²Inserm UMR S952, Paris, France; ³Université Pierre et Marie Curie, 7–9 quai Saint Bernard, 75252 Paris, France; ⁴Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France; ⁵CNRS UMR 7148, Collège de France, Paris, France and ⁶Inserm UMR S894, Centre de Psychiatrie et de Neurosciences, Paris, France. Correspondence: Dr C Lanteri, Laboratoire de Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, CNRS UMR 7224, Université Pierre et Marie Curie, 7–9 quai Saint Bernard, 75252 Paris, France.

E-mail: christophe.lanteri@snv.jussieu.fr

Received 2 August 2012; revised 28 June 2013; accepted 10 July 2013

hundred mice were used in this study (300 mice for the microdialysis experiments, 256 mice for the behavioral experiments, 80 mice for the neuroendocrine experiments and 64 mice for the molecular experiments). Each mouse was naive at the beginning of each experiment and was not used repeatedly for the different tests. Animal experimentation was conducted in accordance with the guidelines for care and use of experimental animals of the European Economic Community (86/809).

Drugs

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) hydrochloride, *D*-amphetamine sulfate, *p*-chloroamphetamine (PCA) hydrochloride, prazosin hydrochloride, WAY-100635 (*N*-[2-[4-(2-[*O*-methyl-3*H*]methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-*N*-2-pyridinyl] cyclohexane carboxamide trihydrochloride) hydrochloride and efaroxan hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau-Chesne, France). Dexmedetomidine hydrochloride was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). SR46349B hemifumarate was a generous gift from Sanofi-Aventis (Paris, France) and F13640 was kindly supplied by Pierre Fabre Laboratories (Castres, France). All drugs were dissolved in saline (0.9% NaCl) except prazosin, which was dissolved and sonicated in water (50% of final volume), and then completed with saline and SR46349B, which was dissolved and sonicated in saline plus lactic acid (0.1%), and then finally neutralized with 10 M NaOH. Doses are expressed as salts. MDMA was given at 10 mg kg⁻¹. *D*-amphetamine was given at 2 mg kg⁻¹ and PCA at 7 mg kg⁻¹.²⁶ Doses of prazosin (1 mg kg⁻¹) and SR46349B (1 mg kg⁻¹) were identical to those used in previously reported experiments.²⁶ Efaroxan was given at 2.5 mg kg⁻¹ and WAY-100635 was given at 1 mg kg⁻¹. The dose of F13640 given was between 0.1 and 0.6 mg kg⁻¹ (ref. 30) and of dexmedetomidine was between 0.1 and 0.5 mg kg⁻¹.³¹ In systemic experiments, drugs were injected intraperitoneally (0.1 ml per mouse). In local experiments, drugs were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (see below) at a concentration of 1–1000 μM and infused incrementally in the PFC, the LC or the dorsal raphe nucleus (DRN) through the dialysis probe.

Repeated treatment

Mice were given four consecutive daily injections of saline or MDMA in the cylindrical compartment used for microdialysis or in that used to monitor locomotor activity. After a 4-day or a 1-month withdrawal period, all experiments were performed as described below (Supplementary Figure 1a). To test the effects of prazosin and SR46349B on the development of neurochemical and behavioral sensitization to MDMA, as well as on the MDMA-induced desensitization of α_{2A}-adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptors function, mice were given a pretreatment (saline or prazosin plus SR46349B) every day 30 min before the injection of MDMA.

In vivo microdialysis

Surgery. Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg kg⁻¹; Sanofi Santé Animale, Libourne, France) and placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). An unilateral permanent cannula (CMA/7; CMA Microdialysis, Solna, Sweden) was placed at the edge of the PFC, the LC or the DRN and secured on the skull with screws and dental cement. The coordinates for the guide cannula tip were as follows: PFC—anteroposterior, +2.6 relative to bregma, mediolateral, +0.5 and dorsoventral, 0 mm from dura; LC—anteroposterior, -5.4 relative to bregma, mediolateral, +0.75 and dorsoventral, -2.4 mm from dura; and DRN—anteroposterior, -4.36 relative to bregma, mediolateral, 0, and dorsoventral, -1.5 mm from dura, according to the atlas of Paxinos and Franklin³² (Supplementary Figure 1b). After surgery, mice were allowed to recover for at least 4 days.

Monitoring of cortical extracellular monoamines levels. On the day of the experiment, the microdialysis probe was inserted into the PFC (membrane length, 2 mm; diameter, 0.24 mm; cutoff, 6000 Da; CMA/7; CMA Microdialysis), the LC or the DRN (membrane length, 1 mm). Artificial cerebrospinal fluid (in mM: 147 NaCl, 3.5 KCl, 1 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, pH 7.6) was perfused through the probe at a rate of 1 μl min⁻¹ by a CMA/100 microinjection pump and samples from the PFC were collected in a refrigerated computer-controlled fraction collector (CMA/170). Adequate steady-state monoamines levels in perfusate samples were reached 140 min after probe insertion. Cortical samples (20 μl every 20 min) were collected for 100 min, to determine basal extracellular values. Then, MDMA, amphetamine, PCA, dexmedetomidine or F13640 were injected either intraperitoneally or infused locally into the

PFC, the LC or the DRN through the dialysis probe and cortical samples were collected for 200 min. In local experiments, the concentration of dexmedetomidine and F13640 was gradually increased every 40 min (i.e. every two samples).

Biochemistry. Dialysate samples (20 μl) were injected every 30 min through a rheodyne valve in the mobile phase circuit with a refrigerated automatic injector (Triathlon; Spark Holland, Emmen, The Netherlands). High-performance liquid chromatography was performed with a reverse-phase column (80 × 4.6 mm; 3 μm particle size; HR-80; ESA, Chelmsford, MA, USA). The mobile phase (for NE analysis: 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 2.75 mM octane sulfonic acid, 0.25 mM triethylamine, 3% methanol, pH 2.9; for 5-HT analysis: 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 2.75 mM octane sulfonic acid, 0.25 mM triethylamine, 15% methanol, 5% acetonitrile, pH 2.9; and for DA analysis: 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 2.75 mM octane sulfonic acid, 0.25 mM triethylamine, 6% methanol, pH 2.9) was delivered at 0.7 ml min⁻¹ by an ESA-580 pump. An ESA coulometric detector (Coulochem II 5100A, with a 5014B analytical cell; Eurosep Instruments, Cergy, France) was used for electrochemical detection. The conditioning electrode was set at -0.175 mV and the detecting electrode was set at +0.175 mV.

Histology. At the end of the experiment, a blue dye was infused through the microdialysis probe. Then, the brain was quickly removed and immediately frozen at -30 °C using isopentane cooled by dry ice and serial coronal slices were cut on a microtome to ensure the accurate probe implantation.

Locomotor activity

Mice were introduced into a circular corridor (4.5 cm width, 17 cm external diameter) crossed by four infrared beams (1.5 cm above the base) placed at every 90° (Imetronic, Pessac, France). Locomotor activity was scored when animals interrupted two successive beams and thus had traveled one-quarter of the circular corridor. Spontaneous activity was recorded for 120 min (habituation to the experimental procedure), and then mice were injected with amphetamine or PCA, and locomotor responses were recorded for an additional 200 min.

Dexmedetomidine-induced sedation

Mice were injected with dexmedetomidine (0.1–0.5 mg kg⁻¹, intraperitoneally) and gently rolled onto their backs 30 min later. The hypnotic response to dexmedetomidine was defined as the loss of the mouse's righting reflex (LORR). The sleep time was measured as the time from the mouse's inability to right itself when placed on its back until the time when it spontaneously and completely reverted to the prone position.

F13640-induced hypothermia

Body temperature was measured by inserting a 2-cm-long 2-mm-diameter thermistor probe into the rectum of mice that had been gently handled for 20 s. Measurements were made every 10 min for 30 min (basal temperature). Then, the response to a systemic injection of F13640 (0.1–0.6 mg kg⁻¹, intraperitoneally) was assessed every 10 min until the temperature had returned to the basal value. For each animal, the hypothermic response to F13640 was calculated as the difference between basal body temperature (calculated as the average temperature during the period before injection) and the minimal body temperature after injection.

Quantitative autoradiography

Mice were killed by decapitation. The brain was quickly removed and immediately frozen at -30 °C using isopentane cooled by dry ice. Sections (16 μm thick) were cut at -20 °C in a cryostat (Leica CM3050 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and stored at -80 °C for <2 weeks until used for radiolabeling. Locus coeruleus (LC) sections were located between -5.80 and -5.34 mm from bregma, raphe sections between -4.84 and -4.36 mm and PFC sections between +2.22 and +2.80 mm, according to the atlas of Paxinos and Franklin.³²

α_{2A}-Adrenergic receptor labeling. Sections were preincubated for 20 min at room temperature in 170 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 20 mM MgCl₂ and then incubated for 90 min with the same buffer supplemented with 1.1 nM [¹²⁵I]-*para*-iodoclonidine (2200 Ci mmol⁻¹) in a humidified chamber. After two 5-min washes in cold buffer, the sections were quickly dipped in ice-cold distilled water, dried in cold air and exposed for 36 h to [¹²⁵I]Hyperfilm

(GE Healthcare, Little Chalfont, UK) at -80°C . Nonspecific binding was determined by the inclusion of $10\ \mu\text{M}$ clonidine in the incubation medium.

5-HT_{1A} receptor labeling. Sections were preincubated for 30 min at 20°C in $50\ \text{mM}$ Tris-HCl, pH 7.4, and then incubated for 1 h at 20°C in the same buffer supplemented with $0.8\ \text{nM}$ [^3H]WAY-100635 ($81\ \text{Ci}\ \text{mmol}^{-1}$). After two 5-min washes in cold buffer, the sections were quickly dipped in ice-cold distilled water, dried in cold air and apposed for 6 weeks to [^3H]Hyperfilm (GE Healthcare). Nonspecific binding was estimated on adjacent sections processed through the same steps except that a saturating concentration ($10\ \mu\text{M}$) of 5-HT was added to the incubation medium.

Labeling quantification. Autoradiographic results were analyzed and quantified with MCID software (Imaging Research, Brock University, St Catharines, ON, Canada). Optical density within structures was measured on 10–18 sections for each structure in each animal. Values for specific binding were obtained by subtracting nonspecific binding from total binding.

Immunodetection of G α i/o proteins

Preparation of homogenates. Brains were obtained as described above and serial coronal sections ($400\ \mu\text{m}$ thick for LC, $500\ \mu\text{m}$ for DRN and $1000\ \mu\text{m}$ for PFC) were cut at -18°C in a cryostat (Leica CM3050 S). Ten milligram samples of LC and DRN and $50\ \text{mg}$ samples of PFC (corresponding to eight mice in each group) were punched from the slices according to the atlas of Paxinos and Franklin³² (Supplementary Figure 1c). The punched samples of LC, DRN and PFC were homogenized by sonication, ($1\ \text{g}/10\ \text{V}$) in ice-cold Tris-HCl buffer ($50\ \text{mM}$ Tris, $100\ \text{mM}$ NaCl, $2\ \text{mM}$ MgCl₂, $1\ \text{mM}$ ethylenediaminetetraacetic acid, $1\ \text{mM}$ ethylene glycol tetraacetic acid, $0.5\ \text{mM}$ dithiothreitol, $0.32\ \text{M}$ sucrose, pH 7.3) supplemented with Protease Inhibitor Mixture tablet (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Western blot analysis. The protein concentration in all extracted samples was determined by the method of Bradford and bovine serum albumin was used as a protein standard. Protein samples ($35\ \mu\text{g}$) were boiled for 5 min at 95°C in NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 2.5% β -mercaptoethanol, and then run on a 10% NuPAGE SDS-PAGE Gel Electrophoresis System and transferred to PVDF membrane (Immobilon; Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were then blocked 1 h at room temperature in Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA), and further incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antibodies against G α i₁ (1:500, ab19932) or G α i₂ (1:500, ab78193) or rabbit polyclonal antibodies against G α i₃ (1:300, sc-262), or G α o (1:200, sc-387), plus Tween-20 (0.1%). G α i₁ and G α i₂ antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK), and G α i₃ and G α o antibodies were purchased from Santa Cruz Biotech (Heidelberg, Germany). Membranes were then incubated for 1 h at room temperature in Odyssey Blocking Buffer plus Tween-20 (0.1%) with a goat anti-mouse or a goat anti-rabbit IR-Dye 680/800-coupled secondary antibody (1:5000; LI-COR Biosciences). Immunoreactivity was detected with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Each G α protein subtype migrated at approximately $40\ \text{kDa}$. β -Actin (A544; Sigma-Aldrich) was immunoprobed as loading control. Tyrosine hydroxylase (LI-COR Biosciences) and tryptophan hydroxylase (LI-COR Biosciences) were immunoprobed as markers of tissue specificity. MCID software (Imaging Research) was used for analysis and quantification of immunostaining results.

Isolation of total mRNA and quantification analysis by quantitative RT-PCR of G α i/o mRNA

mRNA extraction. Samples of LC and DRN ($1\ \text{mg}$ tissue per structure per mouse) were dissected as described above (Supplementary Figure 1c) and total cellular mRNA was purified using RNeasy Micro Kit from Qiagen (Courtabeuf, France).

Quantitative RT-PCR of G α i/o mRNA. After extraction, $200\ \text{ng}$ of mRNA were reverse transcribed. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was performed with SYBR green detection of amplified products in a light cycler instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Primers used for G α i/o were as follows: G α i₁ (forward, 5'-GTCAGCTGCCCTTACCCTGAA-3'; reverse, 5'-AATTGATCAAAGGCAGGTG-3'); G α i₂ (forward, 5'-CATCCGTTCCGGTTTTCTAA-3'; reverse, 5'-ACATTTGGACTTGGGTCAGG-3'); G α i₃ (forward, 5'-GCATGACAGGACCAAGGAAT-3'; reverse, 5'-GAAGCGACGACCTCAACTC-3'); and G α o (forward,

5'-TCGTGATTTCTCCCCCTTG-3'; reverse 5'-TTTTTCTCAATCGCCTTGCT-3'). The relative quantification for a given gene was corrected to the β -actin mRNA values.

Statistics

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA). Data from microdialysis and locomotor activity experiments are described as a function of time. Data from microdialysis are expressed as percentages of the respective mean basal value. Extracellular monoamine levels and locomotor activity data obtained after MDMA, amphetamine, PCA, dexmedetomidine or F13640 injection were analyzed for 120 min and compared with a two-way analysis of variance (repeated-measures). Dose-dependent effects of dexmedetomidine (sleep time) and F13640 (hypothermia) were compared with a two-way analysis of variance, followed by a Student's *t*-test. Differences in the amounts of α_{2A} -AR, 5-HT_{1A}R, G α i/o protein and mRNA were assessed using an unpaired Student's *t*-test. Pharmacological treatments correspond to independent groups of animals. Each group contained eight mice except microdialysis and qRT-PCR experiments, for which five to six animals were used. Western blot experiments were performed three times with $n=8$ mice per group. The threshold for significant differences was set at $P<0.05$.

RESULTS

Acute MDMA increases norepinephrine, serotonin and dopamine levels in the mouse PFC

Acute injection of MDMA ($10\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$, intraperitoneally) induced a 4.2-fold increase in extracellular NE levels in the PFC of mice ($F_{(1,5)}=26.70$, $P<0.0001$) (Figure 1a). The maximum effect was observed 20 min after drug injection and NE levels remained significantly higher than those of control mice for at least 80 min. MDMA also induced a fivefold increase in cortical extracellular 5-HT levels ($F_{(1,5)}=47.13$, $P<0.0001$) (Figure 1b) and a 2.5-fold increase in cortical extracellular DA levels ($F_{(1,5)}=19.39$, $P<0.005$) (Figure 1c).

Repeated MDMA administration induces a long-lasting sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons, which is correlated to behavioral sensitization

The reactivity of noradrenergic neurons was tested using *D*-amphetamine as an NE releaser, whereas that of serotonergic neurons was assessed with *p*-chloroamphetamine, an amphetamine analog that releases 5-HT without modifying extracellular NE levels in mice.²⁶ As expected, acute injection of amphetamine ($2\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$, intraperitoneally) induced an increase in cortical extracellular NE levels ($F_{(1,5)}=276.7$, $P<0.0001$) (Figure 2a) and locomotor hyperactivity ($F_{(1,23)}=16.89$, $P<0.005$) (Figure 2c). Similarly, PCA ($7\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$, intraperitoneally) induced an increase in cortical extracellular 5-HT levels ($F_{(1,5)}=23.03$, $P<0.0001$) (Figure 2b) and locomotor hyperactivity, but with slightly different magnitude and kinetics ($F_{(1,23)}=23.79$, $P<0.0005$) (Figure 2d). In mice repeatedly injected with MDMA, the amphetamine-induced release of NE and the PCA-induced release of 5-HT were, respectively, 121.1% and 84.9% higher than in mice repeatedly injected with saline, 4 days after withdrawal ($F_{(1,5)}=21.66$, $P<0.005$ and $F_{(1,5)}=20.02$, $P<0.005$, respectively) (Figures 2a and b). Moreover, mice repeatedly injected with MDMA exhibited a greater locomotor response to amphetamine (+349.5%) or PCA (+242.5%), 4 days after withdrawal, than mice repeatedly injected with saline ($F_{(1,23)}=56.89$, $P<0.0001$ and $F_{(1,23)}=36.60$, $P<0.0001$, respectively) (Figures 2c and d).

Strikingly, the amphetamine-induced release of NE and the PCA-induced release of 5-HT were still higher than control values 1 month following repeated MDMA exposure (+106.5%, $F_{(1,5)}=19.91$, $P<0.005$ and +76.5%, $F_{(1,5)}=23.26$, $P<0.0005$ for NE and 5-HT, respectively) (Figures 2a and b). Accordingly, behavioral responses to amphetamine and PCA were still significantly different after 1 month withdrawal when compared with those of control animals (+302.3%, $F_{(1,23)}=34.00$, $P<0.0001$

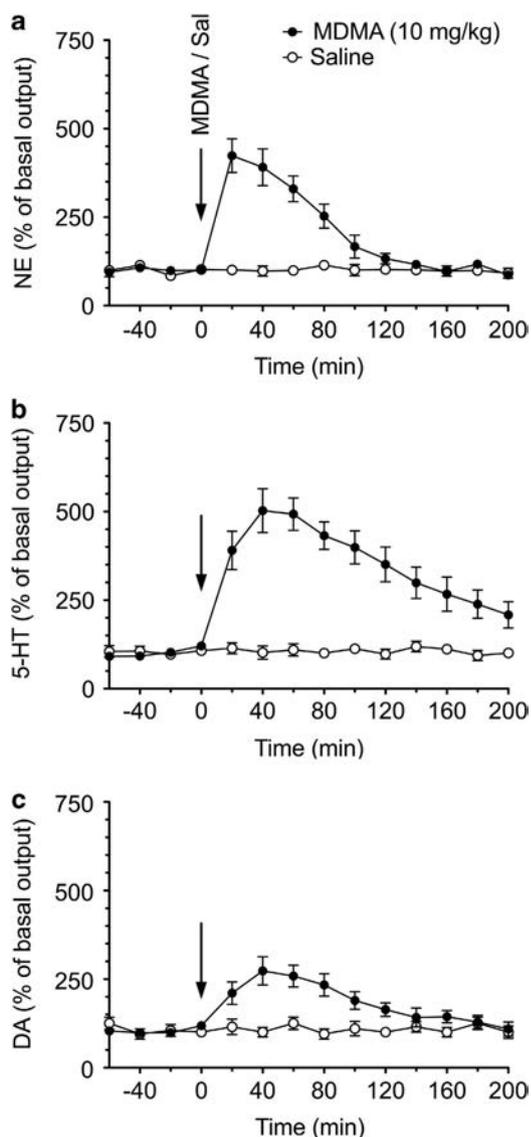


Figure 1. Acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) increases extracellular norepinephrine (NE), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) levels in the mouse prefrontal cortex (PFC). Mice were acutely injected with either saline or MDMA (10 mg kg⁻¹, intraperitoneally) and cortical extracellular NE (a), 5-HT (b) and DA levels (c) were monitored by *in vivo* microdialysis. Cortical extracellular monoamines levels are expressed as a percentage of the respective mean basal value \pm s.e.m. (absolute baseline values: saline, 0.69 \pm 0.06 pg NE/20 min, 0.93 \pm 0.08 pg 5-HT/20 min and 1.2 \pm 0.2 pg DA/20 min; MDMA, 0.72 \pm 0.05 pg NE/20 min, 1.12 \pm 0.16 pg 5-HT/20 min and 0.9 \pm 0.25 pg DA/20 min); $n = 5$ –6 mice per group. There was no significant difference in basal cortical extracellular monoamines levels between the different conditions ($P > 0.05$).

and +268.22%, $F_{(1,23)} = 32.70$, $P < 0.0001$, for amphetamine and PCA, respectively) (Figures 2c and d).

To investigate whether the increased reactivity of noradrenergic and serotonergic neurons induced by repeated injections of MDMA was related to the stimulation of α_{1B} -adrenergic and 5-HT_{2A} receptors, as observed with other drugs of abuse,^{26–28} mice were pretreated with antagonists of these two receptors, prazosin and SR46349B, respectively, 30 min before each injection of MDMA. We found that mice pretreated with prazosin (1 mg kg⁻¹, intraperitoneally) and SR46349B (1 mg kg⁻¹, intraperitoneally) exhibited an amphetamine-induced release of NE and a PCA-

induced release of 5-HT identical to those of animals repeatedly injected with saline ($F_{(1,5)} = 0.144$, $P > 0.05$ and $F_{(1,5)} = 0.416$, $P > 0.05$, respectively) (Figures 2a and b). Moreover, these mice exhibited locomotor responses to amphetamine or PCA identical to those observed in mice repeatedly injected with saline ($F_{(1,23)} = 0.023$, $P > 0.05$ and $F_{(1,23)} = 0.439$, $P > 0.05$, respectively) (Figures 2c and d).

Repeated MDMA fails to sensitize mesocortical dopaminergic neurons

To investigate the role of the mesocortical dopaminergic system in MDMA-induced behavioral sensitization, we also measured cortical extracellular DA levels following repeated MDMA exposure. We found that amphetamine increased extracellular DA levels in the mouse PFC ($F_{(1,5)} = 39.85$, $P < 0.0005$) (Supplementary Figure 2). However, this effect was not significantly different between mice repeatedly injected with MDMA and those repeatedly injected with saline, after a 4-day withdrawal ($F_{(1,5)} = 0.5747$, $P > 0.05$).

The MDMA-induced sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons is not a consequence of adaptations at the axon terminal level in the PFC

We have shown that the development of behavioral and neurochemical sensitization to MDMA requires the repeated stimulation of α_{1B} -adrenergic and 5-HT_{2A} receptors. Nevertheless, the neurobiological changes allowing the long-term persistence of this phenomenon remain unknown. To test whether MDMA-induced sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons is mediated by adaptations at the axon terminal level, mice repeatedly injected with MDMA were infused with amphetamine or PCA directly through the dialysis probe, 4 days after withdrawal. Figures 3a–c shows that local infusion of 1–1000 μ M amphetamine by reverse microdialysis dose-dependently increased cortical extracellular NE levels ($F_{(1,5)} = 242.43$, $P < 0.0001$); administration of 10 μ M of amphetamine was required to reach NE levels equivalent to those observed after systemic injection of 2 mg kg⁻¹. Similarly, local infusion of 1–1000 μ M PCA dose-dependently increased cortical extracellular 5-HT levels ($F_{(1,5)} = 239.9$, $P < 0.0001$) (Figures 3b–d). Nevertheless, the increase of extracellular monoamines levels obtained in these experimental conditions did not differ significantly between mice repeatedly injected with MDMA and those repeatedly injected with saline, whatever the dose tested ($F_{(1,5)} = 0.1956$, $P > 0.05$ and $F_{(1,5)} = 0.1452$, $P > 0.05$, for NE and 5-HT levels, respectively) (Figures 3a–d).

The MDMA-induced sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons is associated with sustained desensitization of somatodendritic α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptor functions

The reactivity of brain monoamines systems is under the negative control of autoreceptors. Noradrenergic neurons that innervate the PFC are inhibited by α_{2A} -adrenergic autoreceptors located in the LC nucleus,^{33,34} whereas serotonergic neurons are inhibited by 5-HT_{1A} autoreceptors located in the DRN and the median raphe nucleus.^{35,36} At the axon terminal level, NE and 5-HT release is controlled by α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1B} autoreceptors, respectively.

To test whether repeated MDMA exposure impairs the sensitivity of α_{2A} -adrenergic autoreceptors, we analyzed the ability of dexmedetomidine, a selective α_2 -adrenergic agonist, to decrease cortical extracellular NE levels in mice repeatedly injected with MDMA or saline. As expected, dexmedetomidine (0.5 mg kg⁻¹, intraperitoneally) decreased cortical extracellular NE levels of control mice ($-83 \pm 6\%$, $F_{(1,5)} = 108.9$, $P < 0.0001$) (Figure 4a). We found that mice repeatedly injected with MDMA were significantly less sensitive to the effects of dexmedetomidine than those repeatedly injected with saline both 4 days ($-39 \pm 7\%$,

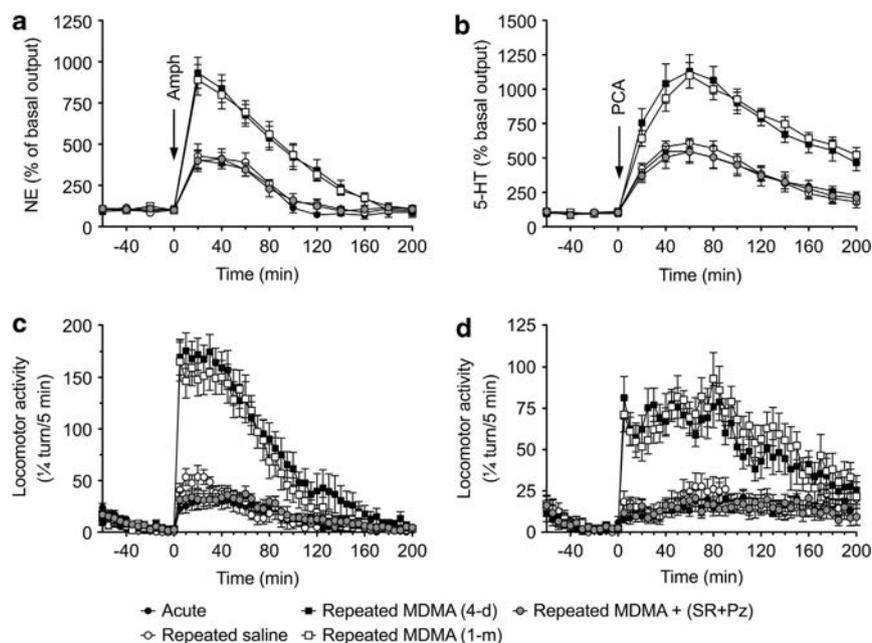


Figure 2. Repeated 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induces a long-lasting sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons, which is correlated to behavioral sensitization. Mice were repeatedly injected with either saline or MDMA (10 mg kg^{-1} , intraperitoneally). To investigate the role of α_{1B} -adrenergic and 5-hydroxytryptamine (5-HT) $_2A$ receptors in the action of MDMA, mice were pretreated with either saline or SR46349B (SR, 1 mg kg^{-1} , intraperitoneally) plus prazosin (Pz, 1 mg kg^{-1} , intraperitoneally) 30 min before each injection of the drug. Four days or 1 month after the last injection, amphetamine (2 mg kg^{-1} , intraperitoneally) or *p*-chloroamphetamine (PCA) (7 mg kg^{-1} , intraperitoneally) was administered and cortical extracellular norepinephrine (NE) (a) or 5-HT (b) levels as well as locomotor responses (c and d) were monitored. Cortical extracellular monoamines levels are expressed as a percentage of the respective mean basal value \pm s.e.m. (absolute baseline values: acute, $0.67 \pm 0.08 \text{ pg NE/20 min}$ and $0.81 \pm 0.07 \text{ pg 5-HT/20 min}$; repeated saline, $0.73 \pm 0.11 \text{ pg NE/20 min}$ and $1.04 \pm 0.07 \text{ pg 5-HT/20 min}$; repeated MDMA 4-d, $0.75 \pm 0.13 \text{ pg NE/20 min}$ and $0.99 \pm 0.09 \text{ pg 5-HT/20 min}$; repeated MDMA 1-m, $0.77 \pm 0.08 \text{ pg NE/20 min}$ and $0.91 \pm 0.13 \text{ pg 5-HT/20 min}$; repeated MDMA + SR/Pz, $0.68 \pm 0.09 \text{ pg NE/20 min}$ and $0.82 \pm 0.16 \text{ pg 5-HT/20 min}$). There was no significant difference in basal cortical extracellular monoamines levels between the different conditions ($P > 0.05$). Locomotor activity is expressed as one-fourth turn per 5 min \pm s.e.m. Each group included at least five mice for microdialysis experiments and eight mice for behavioral experiments. Locomotor activity following acute saline injection was almost zero and is not shown for clarity. It was verified that repeated (SR + Pz) did not modify the amphetamine and PCA-induced neurochemical and behavioral responses on the test day (data not shown for clarity). 4-d, 4 days after withdrawal; 1-m, 1 month after withdrawal.

$F_{(1,5)} = 19.26$, $P < 0.005$) and 1 month after withdrawal ($-44 \pm 9\%$, $F_{(1,5)} = 8.368$, $P < 0.05$) (Figure 4a). Interestingly, the MDMA-induced desensitization of dexmedetomidine effects is prevented when mice were pretreated with prazosin (1 mg kg^{-1} , intraperitoneally) plus SR46349B (1 mg kg^{-1} , intraperitoneally) ($F_{(1,5)} = 0.03$, $P > 0.05$ when compared with the control group after a 4-day withdrawal) (Figure 4a).

To distinguish which subtype of autoreceptors (axon terminal versus somatodendritic) is involved in dexmedetomidine-induced decrease of cortical NE levels, we then analyzed the effects of this compound when infused locally either in the LC or the PFC through the microdialysis probe. We found that dexmedetomidine ($1\text{--}1000 \mu\text{M}$) dose-dependently decreased cortical extracellular NE levels when injected into the LC ($F_{(1,10)} = 21.55$, $P < 0.0001$) or the PFC ($F_{(1,10)} = 20.22$, $P < 0.005$) (Figure 4c). As shown when injected systematically, we found that mice repeatedly injected with MDMA were significantly less sensitive to the effects of dexmedetomidine than those repeatedly injected with saline after a 4-day withdrawal, when infused locally in the LC ($F_{(1,10)} = 9.045$, $P < 0.05$). In contrast, the effects of dexmedetomidine were not significantly different between the two groups (saline versus MDMA), when infused locally in the PFC ($F_{(1,10)} = 0.36$, $P > 0.05$).

We also analyzed dexmedetomidine-induced sedation in mice repeatedly injected with MDMA or saline as it has been well demonstrated that the hypnotic effects of α_2 -adrenergic receptors agonists are mediated, at least partly, by the activation of α_{2A} -adrenergic receptors within the LC.^{31,37,38} As expected, dexmedetomidine ($0.1\text{--}0.5 \text{ mg kg}^{-1}$, intraperitoneally) dose-

independently increased mouse sleep time, measured as the period of loss of the righting reflex ($296 \pm 27 \text{ min}$ at 0.5 mg kg^{-1} , $P < 0.0001$) (Figures 4e–g). We found that mice repeatedly injected with MDMA were significantly less sensitive to the hypnotic effects of dexmedetomidine than those repeatedly injected with saline both 4 days ($209 \pm 14 \text{ min}$ at 0.5 mg kg^{-1} ; $P < 0.05$) and 1 month after withdrawal ($227 \pm 19 \text{ min}$ at 0.5 mg kg^{-1} ; $P < 0.05$) (Figures 4e–g).

To test the sensitivity of 5-HT $_{1A}$ autoreceptors after MDMA-induced sensitization, we analyzed the ability of F13640, a highly specific 5-HT $_{1A}$ agonist,³⁰ to decrease extracellular cortical 5-HT levels in mice repeatedly injected with MDMA or saline. We found that F13640 (0.6 mg kg^{-1} , intraperitoneally) significantly decrease cortical extracellular 5-HT levels of control mice ($-81 \pm 6\%$, $F_{(1,5)} = 81.96$, $P < 0.0001$), but the effects observed in mice repeatedly injected with MDMA were significantly lower both 4 days ($-30 \pm 3\%$, $F_{(1,5)} = 32.26$, $P = 0.0005$) and 1 month ($-27 \pm 12\%$, $F_{(1,5)} = 18.98$, $P < 0.005$) after withdrawal (Figure 4b). Interestingly, the MDMA-induced desensitization of F13640 effects is also prevented when mice were pretreated with prazosin (1 mg kg^{-1} , intraperitoneally) plus SR46349B (1 mg kg^{-1} , intraperitoneally) ($F_{(1,5)} = 0.643$, $P > 0.05$ when compared with the control group after a 4-day withdrawal) (Figure 4b).

To confirm that somatodendritic 5-HT $_{1A}$ autoreceptors are involved in F13640-induced decrease of cortical extracellular 5-HT levels, we then analyzed the effects of this compound when infused locally either in the DRN or the PFC through the microdialysis probe. We found that F13640 ($1\text{--}1000 \mu\text{M}$)

dose-dependently decrease cortical extracellular 5-HT levels when infused locally in the DRN ($F_{(1,10)} = 26.85$, $P < 0.001$) but not in the PFC ($F_{(1,10)} = 0.012$, $P > 0.05$) (Figure 4d). As shown when injected systematically, we found that mice repeatedly injected with MDMA were significantly less sensitive to the effects of F13640 than those repeatedly injected with saline after a 4-day withdrawal, when infused locally in the DRN ($F_{(1,10)} = 10.36$, $P < 0.05$).

We also analyzed the ability of F13640 to decrease mouse body temperature, an effect mediated by presynaptic 5-HT_{1A} receptors.^{30,39} As expected, F13640 (0.1–0.6 mg kg⁻¹, intraperitoneally) dose-dependently decreased body temperature of the control mice, the maximum effect being observed at 0.6 mg kg⁻¹ (-3.78 ± 0.21 °C, $F_{(1,7)} = 122.9$, $P < 0.0001$) (Figures 4f–h). We found

that mice repeatedly injected with MDMA were significantly less sensitive to the hypothermic effects of F13640 than those repeatedly injected with saline, both 4 days and 1 month after withdrawal (-2.48 ± 0.2 °C, $F_{(1,7)} = 12.77$, $P < 0.005$ after 4 days and -2.27 ± 0.28 °C, $F_{(1,7)} = 15.17$, $P < 0.005$ after 1 month, at 0.6 mg kg⁻¹) (Figures 4f–h).

Repeated MDMA does not alter α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors binding, but lastingly decreases G α i proteins expression in LC and DRN cells

We investigated whether the decreased effects of α_2 -adrenergic and 5-HT_{1A} agonists are mediated by decreased expression of α_{2A} -

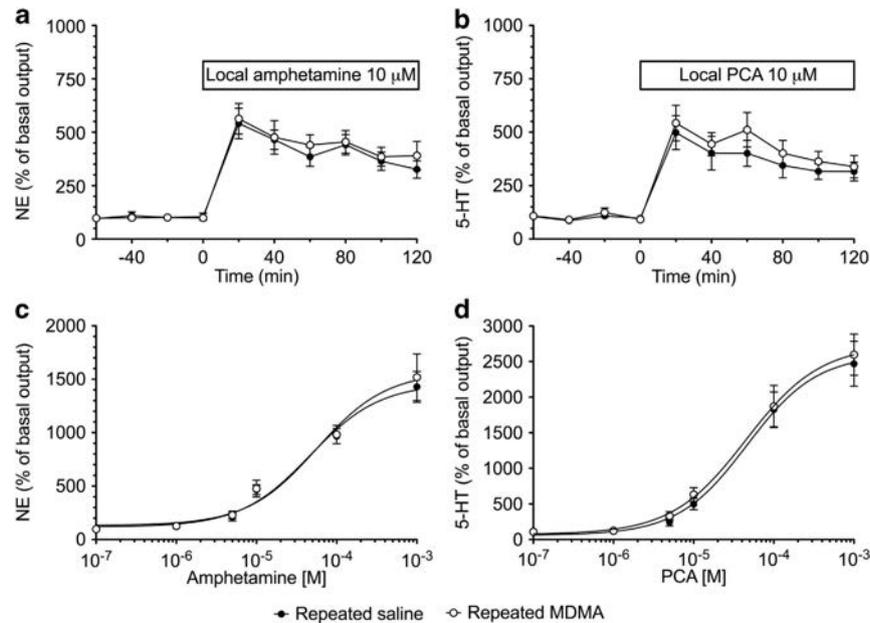


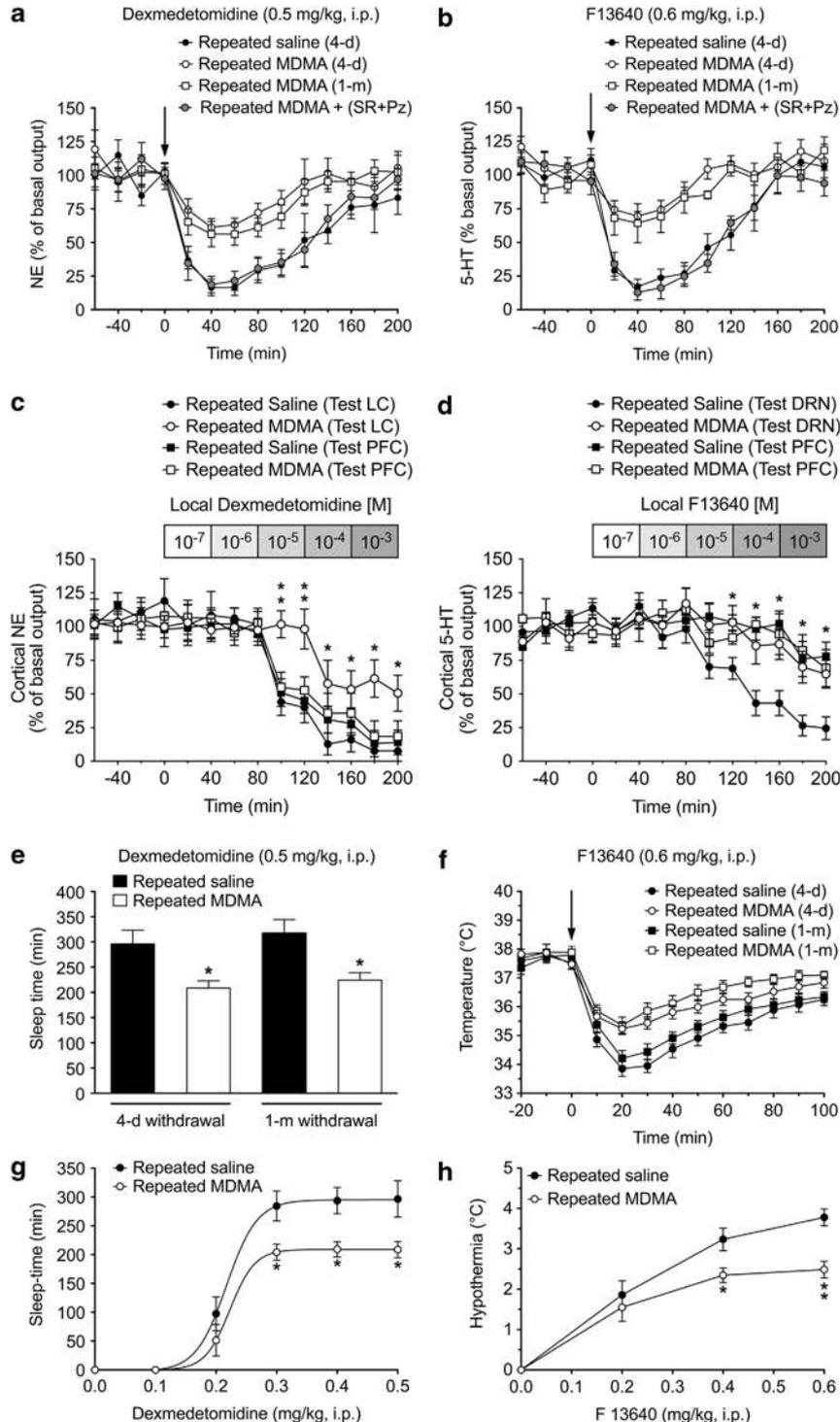
Figure 3. The 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons is not a consequence of adaptations at the axon terminal level in the prefrontal cortex (PFC). Mice were repeatedly injected with either saline or MDMA (10 mg kg⁻¹, intraperitoneally). After a 4-day withdrawal, amphetamine (0.1–1000 μM) or *p*-chloroamphetamine (PCA) (0.1–1000 μM) was infused *locally* in the PFC by reverse microdialysis and cortical extracellular norepinephrine (NE) (a and c) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels (b and d) were monitored. Cortical extracellular monoamines levels are expressed as a percentage of the respective mean basal value \pm s.e.m. (absolute baseline values: repeated saline, 0.62 ± 0.05 pg NE/20 min and 0.85 ± 0.09 pg 5-HT/20 min; repeated MDMA, 0.75 ± 0.13 pg NE/20 min and 0.99 ± 0.16 pg 5-HT/20 min; $n = 5$ –6 mice per group). There was no significant difference in basal cortical extracellular monoamines levels between the different conditions ($P > 0.05$).

Figure 4. The 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons is associated with enduring desensitization of somatodendritic α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptors functions. Mice were repeatedly injected with either saline or MDMA (10 mg kg⁻¹, intraperitoneally) after being pretreated with either saline or SR46349B (SR, 1 mg kg⁻¹, intraperitoneally) plus prazosin (Pz, 1 mg kg⁻¹, intraperitoneally) 30 min before each injection of the drug. After a 4-day or 1-month withdrawal, they were injected with dexmedetomidine or F13640 either systemically or locally (in the locus coeruleus (LC), the dorsal raphe nucleus (DRN) or the prefrontal cortex (PFC)). Cortical extracellular norepinephrine (NE) (a–c) and 5-HT (b–d) levels were monitored by *in vivo* microdialysis. Cortical extracellular monoamines levels are expressed as a percentage of the respective mean basal value \pm s.e.m. (Systemic experiments: Absolute baseline values of NE—repeated saline 4-d, 0.82 ± 0.12 pg NE/20 min; repeated MDMA 4-d, 0.73 ± 0.22 pg NE/20 min; repeated MDMA 1-m, 0.62 ± 0.05 pg NE/20 min; and repeated MDMA + SR + Pz, 0.71 ± 0.15 pg NE/20 min. Absolute baseline values of 5-HT—repeated saline, 0.77 ± 0.09 pg 5-HT/20 min; repeated MDMA 4-d, 0.97 ± 0.14 pg 5-HT/20 min; repeated MDMA 1-m, 0.89 ± 0.12 pg 5-HT/20 min; repeated MDMA + SR + Pz, 0.86 ± 0.2 pg 5-HT/20 min. Local experiments: Absolute baseline values of NE—repeated saline test LC, 0.57 ± 0.13 pg NE/20 min; repeated MDMA test LC, 0.63 ± 0.18 pg NE/20 min; repeated saline test PFC, 0.68 ± 0.06 pg NE/20 min; and repeated MDMA test PFC, 0.81 ± 0.22 pg NE/20 min. Absolute baseline values of 5-HT—repeated saline test DRN, 0.88 ± 0.25 pg 5-HT/20 min; repeated MDMA test DRN, 1.23 ± 0.22 pg 5-HT/20 min; repeated saline test PFC, 0.79 ± 0.15 pg 5-HT/20 min; and repeated MDMA test PFC, 1.05 ± 0.17 pg 5-HT/20 min). There was no significant difference in basal cortical extracellular monoamines levels between the different conditions ($P > 0.05$). It was verified that repeated (SR + Pz) did not modify the dexmedetomidine- and F13640-induced decrease of cortical extracellular monoamines levels on the test day (data not shown for clarity). (e) Sedative effects of dexmedetomidine measured as the loss of the righting reflex (loss of the mouse's righting reflex (LORR) test) (0.5 mg kg⁻¹, intraperitoneally). (g) Dose–response curve of dexmedetomidine-induced sedation (0.1–0.5 mg kg⁻¹). (f) Time course of F13640-induced hypothermia (0.6 mg kg⁻¹, intraperitoneally). (h) Dose–response curve of F13640-induced hypothermia; $n = 6$ mice per group for the microdialysis experiments and $n = 8$ mice per group for the LORR test and the hypothermia assay. Data represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ (unpaired Student's *t*-test).

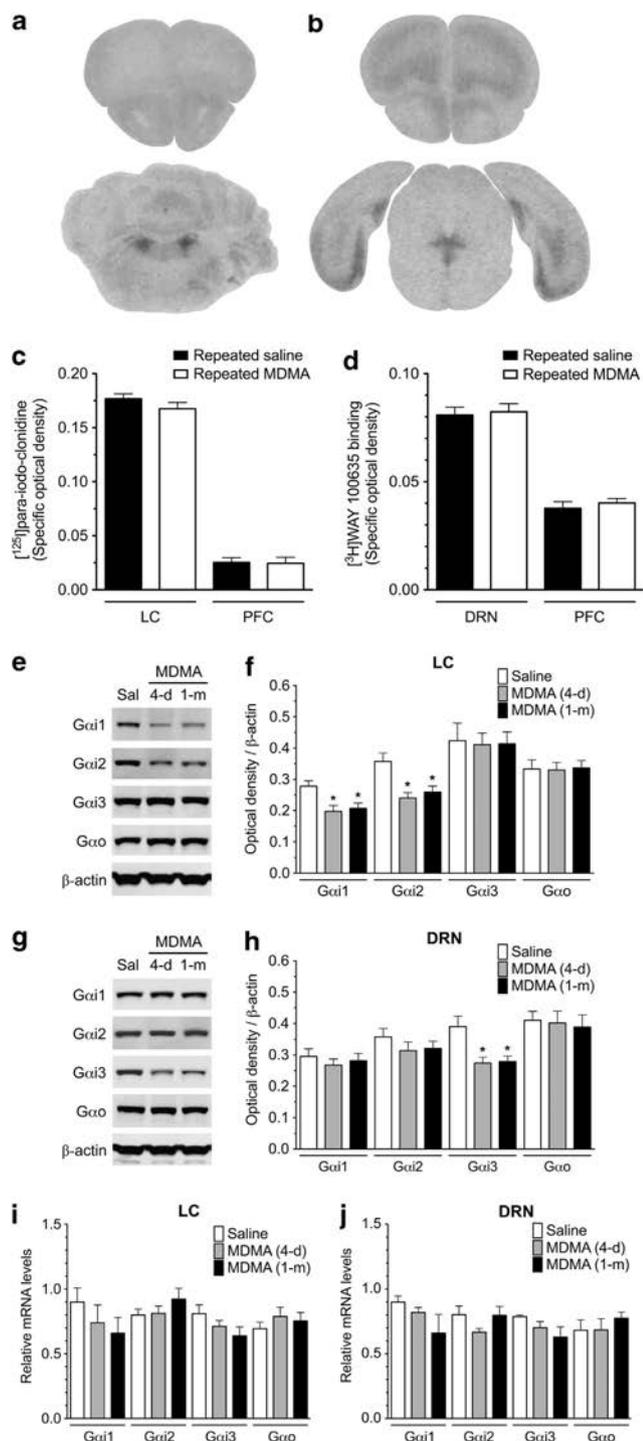
adrenergic and 5-HT_{1A} receptors. We used quantitative autoradiography to measure the density of these two proteins in the brainstem nuclei and the PFC of mice repeatedly injected with MDMA. The labeling of α_2 -adrenergic receptors was assessed by using the selective radioligand [¹²⁵I]-*para*-iodoclonidine (Figure 5a) and that of 5-HT_{1A} receptors was assessed by using the selective radioligand [³H]WAY-100635 (Figure 5b). We found that mice repeatedly injected with MDMA exhibited [¹²⁵I]-*para*-iodoclonidine binding within the LC and the PFC similar to that in

mice repeatedly injected with saline, 4 days after withdrawal ($P > 0.05$) (Figure 5c). Similarly, [³H]WAY-100635 binding within the DRN and the PFC did not differ between the MDMA and the control group ($P > 0.05$) (Figure 5d).

Alternatively, the long-term decrease of α_{2A} -adrenergic receptor- and 5-HT_{1A} receptor-mediated effects may be due to alterations in their downstream signaling pathways. Given that both α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors are coupled to inhibitory G proteins,^{40,41} we used western blotting and qRT-PCR



to assess the expression levels of Gi/o-like proteins and mRNAs in the LC, the DRN and the PFC after a repeated MDMA exposure. We found that mice repeatedly injected with MDMA exhibited significant less $G\alpha_1$ and $G\alpha_2$ immunoreactivity within the LC ($t=3.176$, $P<0.05$ and $t=3.744$, $P<0.05$ for $G\alpha_1$ and $G\alpha_2$, respectively) (Figures 5e and f) and $G\alpha_3$ immunoreactivity within the DRN ($t=3.042$, $P<0.05$) than controls (Figures 5g and h). These differences were observed 4 days after withdrawal and were still significant after 1 month ($t=2.874$, $P<0.05$ and $t=3.015$, $P<0.05$ for $G\alpha_1$ and $G\alpha_2$, respectively, and $t=2.956$, $P<0.05$ for $G\alpha_3$). In contrast, repeated MDMA exposure did not affect $G\alpha$



immunoreactivity in the PFC ($P>0.05$) (Supplementary Figure 3). Despite the persistence of the MDMA-induced decrease in $G\alpha$ protein levels observed within the LC and the DRN, we found that this effect was not associated to any significant modifications in $G\alpha$ mRNA levels ($P>0.05$ for each $G\alpha$ /o mRNA transcript tested) (Figures 5i and j).

Pharmacological blockade of α_2 -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors mimics neurochemical and behavioral sensitization

To verify that the alterations of α_2 -adrenergic autoreceptor- and 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibitory feedback may be involved in MDMA-induced neurochemical and behavioral sensitization, we tested if pharmacological blockade of each receptor could enhance the reactivity of noradrenergic and serotonergic neurons. We found that efaroxan (2.5 mg kg⁻¹, intraperitoneally) potentiated the amphetamine-induced release of cortical NE ($F_{(1,5)}=8.101$, $P<0.05$) (Supplementary Figure 4a) as well as the locomotor hyperactivity of mice ($F_{(1,23)}=8.998$, $P<0.01$) (Supplementary Figure 4c). Similarly, WAY-100635 (1 mg kg⁻¹, intraperitoneally) potentiated the PCA-induced release of cortical 5-HT ($F_{(1,5)}=14.18$, $P<0.005$) (Supplementary Figure 4b) as well as its locomotor effects ($F_{(1,23)}=8.548$, $P<0.05$) (Supplementary Figure 4d). We also verified that neither efaroxan nor WAY-100635 modified cortical extracellular monoamines levels ($F_{(1,5)}=0.8231$, $P>0.05$ and $F_{(1,5)}=0.7499$, $P>0.05$ for NE and 5-HT, respectively) or mice locomotor activity by itself ($F_{(1,23)}=1.587$, $P>0.05$ and $F_{(1,23)}=3.345$, $P>0.05$ for amphetamine and PCA, respectively).

DISCUSSION

The first finding of this study is that acute injection of MDMA (10 mg kg⁻¹, intraperitoneally) significantly increases extracellular NE levels in the mouse prefrontal cortex. This effect is consistent with its pharmacological profile described *in vitro* and indicate that this compound does indeed induce the release of NE *in vivo*, although it is usually considered to be a DA/5-HT releaser.⁴²⁻⁴⁴ This finding suggests that compounds targeting the noradrenergic transmission may be useful for treating symptoms

Figure 5. Repeated 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) does not alter α_2 -adrenergic and 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptors binding, but lastingly decreases Gi proteins' expression in locus coeruleus (LC) and dorsal raphe nucleus (DRN) cells. Mice were repeatedly injected with either saline or MDMA (10 mg kg⁻¹, intraperitoneally). Four days or 1 month after the last injection, α_2 -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors density was analyzed by quantitative autoradiography and inhibitory G-protein expression was investigated at both transcriptional and protein levels by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blot. $[^{125}I]$ -para-iodoclonidine was used to label α_2 -adrenergic receptors in coronal brain sections at the level of the prefrontal cortex (PFC) and of the LC (a). 5-HT_{1A} receptors were labeled with $[^3H]$ WAY-100635 (*N*-[2-[4-(2-[O-methyl-3H]methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-*N*-2-pyridinyl] cyclohexane carboxamide trihydrochloride) in the PFC and the DRN (b). Relative optical density of α_2 -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors is shown in panels c and d. Expression levels of $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ and $G\alpha_o$ were analyzed by western blot in the LC (e) and the DRN (g). Relative expression of each protein is given as a percentage of β -actin signal and is shown in panels f and h. Relative $G\alpha$ /o mRNA levels are given as a ratio of β -actin expression and are shown in panels i and j. Radiolabeling experiments were performed with $n=8$ mice per group. Western blot experiments were performed three times with $n=8$ mice per group. qRT-PCR experiments were performed with $n=6$ mice per group. Data represent mean \pm s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.005$ (unpaired Student's *t*-test).

of acute ecstasy intoxication in humans, as proposed by recent clinical studies.^{45,46} More generally, it highlights the putative role of NE in the mechanisms of action of drugs of abuse^{47–50} and⁵¹ for review.

The second finding of this study is that repeated administration of MDMA elicits a long-lasting sensitization of noradrenergic and serotonergic systems. We found that the reactivity of noradrenergic and serotonergic neurons was higher than control values 4 days after withdrawal, and remained similarly high for at least 1 month; this effect was strongly correlated with the behavioral response.

Psychostimulants are known to trigger neuroplasticity in ventral tegmental area dopaminergic neurons,^{52–54} although no temporal correlation has ever been established between the reactivity of mesolimbic system and the amplitude of the locomotor response. Indeed, the drug-induced increase of extracellular DA levels in the nucleus accumbens is diminished in the early days of withdrawal,^{55,56} possibly due to adaptations in the uptake process and only studies conducted several weeks after withdrawal were able to detect a sensitization of DA release,^{9,57,58} suggesting that this phenomenon may not be primarily involved in the development of behavioral sensitization. Regarding the dopaminergic mesocortical pathway, we show here that MDMA-induced behavioral sensitization is not associated with any increase in the reactivity of DA fibers in the PFC at least in the early stages of its development. Interestingly, several studies suggest that MDMA could elicit behavioral sensitization independently of its ability to stimulate dopaminergic transmission. For example, although pharmacological blockade of D₁ receptors can block the expression of behavioral sensitization to MDMA, it fails to prevent its induction,^{59,60} as shown with cocaine⁶¹ and amphetamine.²⁷

In mice, MDMA is known to induce selective and nearly irreversible loss of brain dopaminergic neurons. For example, it decreases DA tissue concentration, dopamine transporter labeling and tyrosine hydroxylase activity in many brain areas.^{62,63} It is unlikely, however, that the long-term sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons described here is related to the neurotoxicity of MDMA because no MDMA-induced loss of noradrenergic or serotonergic functions has been reported in this species, even at very high dose.^{64,65} Moreover, the dose used in this study was substantially lower than the dose potentially toxic in mice. To our knowledge, this is a first time that a non-toxic dose of MDMA has been shown to induce such potent and enduring adaptations in mouse brain that may be relevant to the recreational abuse of this drug.

The third finding of this study is that the MDMA-induced sensitization of noradrenergic and serotonergic neurons is associated with a desensitization of their respective inhibitory feedback. Local perfusion with amphetamine or PCA in the PFC of mice repeatedly injected with MDMA failed to reproduce the substantial potentiation of NE and 5-HT release observed when these two releasers were injected *systemically*. These findings strongly suggest that the expression of noradrenergic and serotonergic neurons sensitization is not a consequence of adaptations at the nerve terminal level such as increased synthesis, increased storage and release ability and/or upregulation of uptake systems; rather, they suggest adaptations at the somatodendritic level.

Accordingly, we found that mice repeatedly injected with MDMA display a persistent downregulation of somatodendritic α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptors function. This phenomenon is associated with a selective decrease in the expression of G α_{i1} and G α_{i2} proteins in the LC and of G α_{i3} in the DRN but not in the PFC. Finally, we demonstrated that the blockade of α_{2A} -adrenergic receptors potentiated the amphetamine-induced increase in cortical NE, whereas that of 5-HT_{1A} receptors potentiated the PCA-induced increase in cortical 5-HT, as well as the locomotor hyperactivity induced by both compounds. It is

worth noting that the control of locomotor activity and anesthetic-sparing (i.e. the ability of a compound to potentiate the sedative/hypnotic effects of an aesthetic drug and to reduce its effective dose) by α_{2A} -adrenergic receptors requires specific coupling with G α_{i2} subtype in the LC.^{31,41} Moreover, 5-HT_{1A} receptors bind specifically to G α_{i3} protein subtype in the raphe nuclei.^{39,40} Altogether, these findings support the hypothesis that the hypersensitivity observed in MDMA-treated mice is a consequence of the impairment of somatodendritic α_{2A} -adrenergic autoreceptor- and 5-HT_{1A} autoreceptor-mediated inhibitory feedback. The findings of our local microdialysis experiments suggest that the function of terminal autoreceptors was not significantly altered by repeated administration of MDMA. These data may point to differential control of α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors at terminal versus somatodendritic level that may be related to different Gi/o proteins coupling, which has been previously hypothesized.⁴⁰

The mechanism that leads to the downregulation of Gi proteins in noradrenergic and serotonergic neurons remains, however, unknown. Chronic psychostimulants have been shown to downregulate Gi expression in important brain structures such as the ventral tegmental area and nucleus accumbens,⁶⁶ but the mechanism involved in this process has not been described. Given that MDMA does not significantly alter the levels of Gi mRNA, we can assume that such regulations occur at the post-translational level and may affect the proteins stability and their targeting to the plasma membrane as described by Giguère *et al.*⁶⁷ It cannot be excluded, however, that because of the limits of the experimental procedure and the small number of NE and 5-HT neurons in each structure, a decrease of Gi mRNA may occur but be too small to be statistically detected.

We found that pharmacological blockade of α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors before each MDMA injection did not prevent the desensitization of their mediated effects nor the behavioral sensitization (data not shown), suggesting that this phenomenon is not due to their overactivation by the repeated release of NE and 5-HT, but is a consequence of a much more complex process. Interestingly, we found instead that the desensitization of α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptors function and the consecutive neurochemical and behavioral sensitization were prevented by pretreatment with antagonists of α_{1} -adrenergic and 5-HT_{2A} receptors, as shown with other drugs of abuse.^{26–28} Several anatomical and functional studies have demonstrated that α_{1B} -adrenergic and 5-HT_{2A} receptors are critically involved in regulating the reactivity of noradrenergic and serotonergic systems at the subcortical level. In the brainstem, noradrenergic fibers arising from the LC control DRN firing through the activation of α_{1B} -adrenergic receptors located on serotonergic neurons.^{68,69} Conversely, the DRN exerts a tonic modulation of the LC via 5-HT_{2A} receptors expressed by both noradrenergic and GABAergic cells.^{70,71} Therefore, the repeated stimulation of α_{1B} -adrenergic and 5-HT_{2A} receptors may alter the expression of proteins involved in regulating neuronal excitability, such as inhibitory G proteins, possibly through the activation of the Gq/11 signaling pathway, thereby leading to a decrease of α_{2A} -adrenergic autoreceptor- and 5-HT_{1A} autoreceptor-mediated inhibition.

Interestingly, electrophysiological studies have shown that chronic stress increases LC neurons excitability and that these effects are mediated at least in part by a desensitization of α_{2A} -adrenergic autoreceptors.^{72,73} Chronic stress also downregulates 5-HT_{1A} autoreceptors within the DRN.^{74,75} It is not known how long such adaptations may persist after recovery but our findings are nevertheless consistent with the putative role of stress in the physiopathology of addiction. Indeed, it should be recorded that stress cross-sensitizes with the behavioral effects of most drugs of abuse, including MDMA.^{76–78} Therefore, the sensitization of noradrenergic and/or serotonergic neurons by chronic stressful conditions may explain how the environment

could facilitate the development of compulsive drug seeking. By activating both nuclei through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis,^{79–81} acute stressful stimuli may also promote relapse after withdrawal in the absence of any drug stimulation.

CONCLUSION

In humans, the abuse potential of ecstasy is still controversial.⁷ Here we showed that only four injections of a subtoxic dose of MDMA in mice are able to trigger the same long-term neural modifications as compounds with high potential of abuse such as amphetamine, cocaine, morphine, ethanol and nicotine + monoamine oxidase inhibitor, suggesting that ecstasy's addictivity may have been underestimated. Moreover, we demonstrated that this drug-induced long-term plasticity is a consequence of a sustained impairment of inhibitory feedback mediated by α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} autoreceptors in the LC and the DRN, respectively. These latter findings provide potentially new targets for treatment of addiction.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Institut Cochin, Université Paris Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). We thank Drs Francis Colpaert (†) and Pierre Sokoloff (Laboratoires Pierre Fabre, Castres, France) for kindly providing us F13640. We also thank Dr Marie-Pascale Martres and Caroline Chevarin for her help with radiolabeling experiments; Dr Marie Picot and Nicolas 'boubou' Bouveyron for their precious advices on western blot experiments; and Carole Jacq for her help with behavioral experiments. CL would like to thank Vanessa Houades for her support. This work is dedicated to the memory of Iderlinda Deus de Sousa.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL and JPT designed the study. CL, ELD, SJHV, GG, ACB and LS performed research. CL, ELD, SJHV, ACB, LL and JPT analyzed the data. CL wrote the manuscript.

REFERENCES

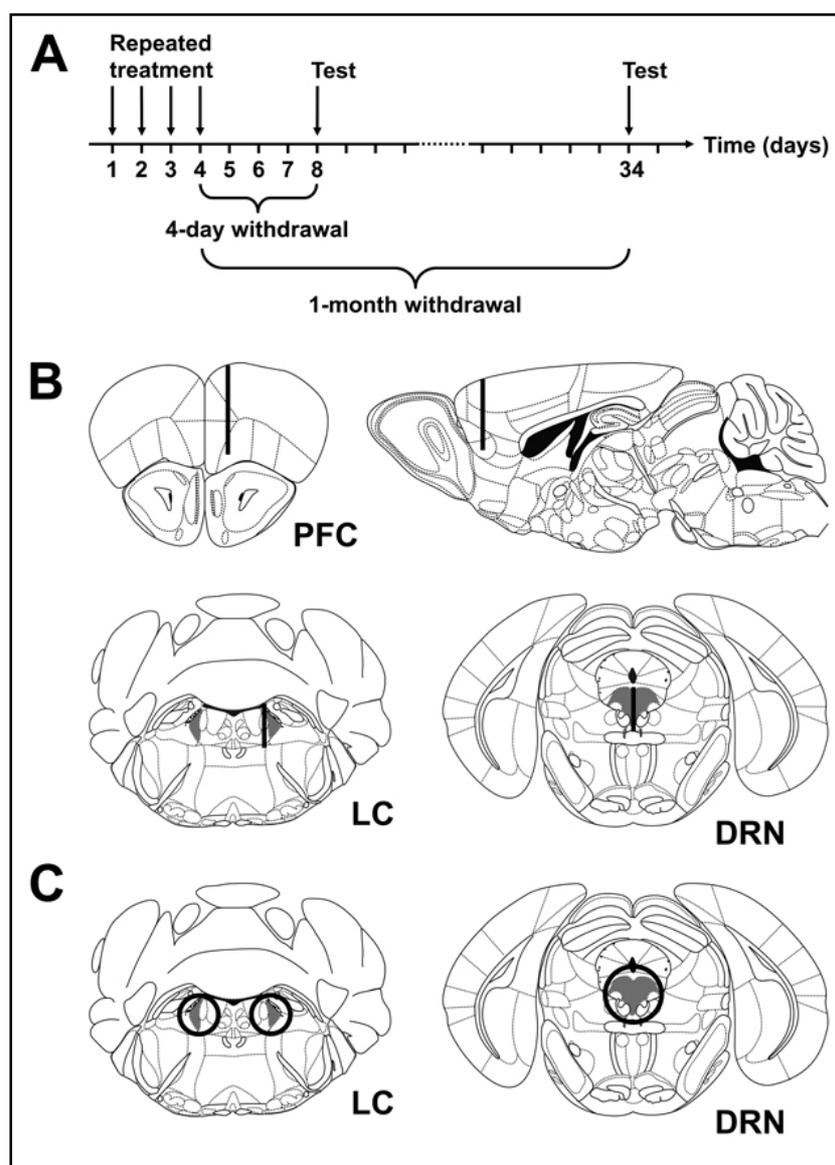
- Ricaurte G, Bryan G, Strauss L, Seiden L, Schuster C. Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science* 1985; **229**: 986–988.
- McCann UD, Szabo Z, Scheffel U, Dannals RF, Ricaurte GA. Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ('Ecstasy') on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* 1998; **352**: 1433–1437.
- Urban NB, Girgis RR, Talbot PS, Kegeles LS, Xu X, Frankle WG et al. Sustained recreational use of ecstasy is associated with altered pre and postsynaptic markers of serotonin transmission in neocortical areas: a PET study with [¹¹C]DASB and [¹¹C]MDL 100907. *Neuropsychopharmacology* 2012; **37**: 1465–1473.
- Schifano F. Chronic atypical psychosis associated with MDMA ('ecstasy') abuse. *Lancet* 1991; **338**: 1335.
- Benazzi F, Mazzoli M. Psychiatric illness associated with 'ecstasy'. *Lancet* 1991; **338**: 1520.
- Scott RM, Hides L, Allen JS, Burke R, Lubman DI. Depressive and anxiety symptomatology in ecstasy users: the relative contribution of genes, trauma, life stress and drug use. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; **209**: 25–36.
- Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet* 2007; **369**: 1047–1053, review.
- Gold LH, Koob GF. MDMA produces stimulant-like conditioned locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)* 1989; **99**: 352–356.
- Kalivas PW, Duffy P, White SR. MDMA elicits behavioral and neurochemical sensitization in rats. *Neuropsychopharmacology* 1998; **18**: 469–479.
- Doly S, Bertran-Gonzalez J, Callebert J, Bruneau A, Banas SM, Belmer A et al. Role of serotonin via 5-HT_{2B} receptors in the reinforcing effects of MDMA in mice. *PLoS One* 2009; **4**: e7952.

- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 1993; **18**: 247–291.
- Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 2000; **95**(Suppl 2): S91–117.
- Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 1997; **278**: 58–63review.
- Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 2005; **8**: 1445–1449, review.
- Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5274–5278.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996; **382**: 255–257.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 1997; **276**: 2048–2050.
- Cadoni C, Solinas M, Pisanu A, Zernig G, Acquas E, Di Chiara G. Effect of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core. *Brain Res* 2005; **1055**: 143–148.
- Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI et al. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* 2001; **39**: 32–41.
- Han DD, Gu HH. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol* 2006; **6**: 6.
- Verrico CD, Miller GM, Madras BK. MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 2007; **189**: 489–503.
- Selken J, Nichols DE. Alpha1-adrenergic receptors mediate the locomotor response to systemic administration of (+/-)-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; **86**: 622–630.
- Herin DV, Liu S, Ullrich T, Rice KC, Cunningham KA. Role of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the hyperlocomotive and hyperthermic effects of (+)-3,4-methylenedioxyamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; **178**: 505–513.
- Trigo JM, Renoir T, Lanfumey L, Hamon M, Lesch KP, Robledo P et al. 3,4-methylenedioxyamphetamine self-administration is abolished in serotonin transporter knockout mice. *Biol Psychiatry* 2007; **62**: 669–679.
- Orejarena MJ, Lanfumey L, Maldonado R, Robledo P. Involvement of 5-HT_{2A} receptors in MDMA reinforcement and cue-induced reinstatement of MDMA-seeking behavior. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; **14**: 1–14.
- Salomon L, Lanteri C, Glowinski J, Tassin JP. Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 7476–7481.
- Lanteri C, Salomon L, Torrens Y, Glowinski J, Tassin JP. Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 2008; **33**: 1724–1734.
- Lanteri C, Hernández Vallejo SJ, Salomon L, Doucet EL, Godeheu G, Torrens Y et al. Inhibition of monoamine oxidases desensitizes 5-HT_{1A} autoreceptors and allows nicotine to induce a neurochemical and behavioral sensitization. *J Neurosci* 2009; **29**: 987–997.
- Tassin JP. Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**: 85–97.
- Colpaert FC, Tarayre JP, Koek W, Pauwels PJ, Bardin L, Xu XJ et al. Large-amplitude 5-HT_{1A} receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology* 2002; **43**: 945–958.
- Lakhlani PP, MacMillan LB, Guo TZ, McCool BA, Lovinger DM, Maze M et al. Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via 'hit and run' gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 9950–9955.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd edn. Academic Press: New York, 1997.
- Aghajanian GK, VanderMaelen CP. Alpha 2-adrenoceptor-mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Science* 1980; **215**: 1394–1396.
- Young 3rd WS, Kuhar MJ. Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: light microscopic autoradiographic localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 1696–1700.
- Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 1983; **305**: 140–142.
- Haddjeri N, Lavoie N, Blier P. Electrophysiological evidence for the tonic activation of 5-HT_{1A} autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 2004; **29**: 1800–1806.

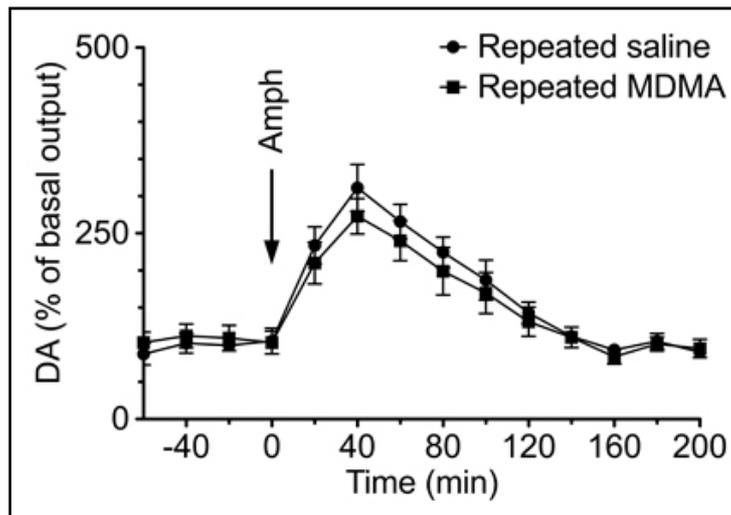
- 37 Doze VA, Chen B-X, Maze M. Dexmedetomidine produces a hypnotic-anesthetic action in rats via activation of central, alpha sub 2-adrenoceptors. *Anesthesiology* 1989; **71**: 75–79.
- 38 Correa-Sales C, Rabin B, Maze M. A hypnotic response to dexmedetomidine, an alpha sub 2-agonist, is mediated in the locus coeruleus in rats. *Anesthesiology* 1992; **76**: 948–952.
- 39 Bortolozzi A, Castañé A, Semakova J, Santana N, Alvarado G, Cortés R *et al*. Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT1A autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Mol Psychiatry* 2012; **17**: 612–623.
- 40 Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L. Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol* 2006; **70**: 1013–1021.
- 41 Albarrán-Juárez J, Gilsbach R, Piekorz RP, Pexa K, Beetz N, Schneider J *et al*. Modulation of alpha2-adrenoceptor functions by heterotrimeric Galphai protein isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; **331**: 35–44.
- 42 Nash JF, Brodtkin J. Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: effect of dopamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **259**: 820–825.
- 43 Gudelsky GA, Nash JF. Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin–dopamine interactions. *J Neurochem* 1996; **66**: 243–249.
- 44 Baumann MH, Clark RD, Rothman RB. Locomotor stimulation produced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is correlated with dialysate levels of serotonin and dopamine in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; **90**: 208–217.
- 45 Hysek CM, Simmler LD, Ineichen M, Grouzmann E, Hoener MC, Brenneisen R *et al*. The norepinephrine transporter inhibitor reboxetine reduces stimulant effects of MDMA ('ecstasy') in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2011; **90**: 246–255.
- 46 Hysek CM, Simmler LD, Nicola VG, Vischer N, Donzelli M, Krähenbühl S *et al*. Duloxetine inhibits effects of MDMA ('ecstasy') *in vitro* and in humans in a randomized placebo-controlled laboratory study. *PLoS One* 2012; **7**: e36476.
- 47 Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S *et al*. Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci* 2002; **22**: 2873–2884.
- 48 Ventura R, Cabib S, Alcaro A, Orsini C, Puglisi-Allegra S. Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. *J Neurosci* 2003; **23**: 1879–1885.
- 49 Ventura R, Alcaro A, Puglisi-Allegra S. Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. *Cereb Cortex* 2003; **15**: 1877–1886.
- 50 Olson VG, Heusner CL, Bland RJ, During MJ, Weinschenker D, Palmiter RD. Role of noradrenergic signaling by the nucleus tractus solitarius in mediating opiate reward. *Science* 2006; **311**: 1017–1020.
- 51 Sofuoglu M, Sewell RA. Norepinephrine and stimulant addiction. *Addict Biol* 2009; **14**: 119–129, review.
- 52 Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A. Single cocaine exposure *in vivo* induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 2001; **411**: 583–587.
- 53 Zweifel LS, Argilli E, Bonci A, Palmiter RD. Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron* 2008; **59**: 486–496.
- 54 Mameli M, Halbout B, Creton C, Engblom D, Parkitna JR, Spanagel R *et al*. Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAC. *Nat Neurosci* 2009; **12**: 1036–1041.
- 55 Segal DS, Kuczenski R. *In vivo* microdialysis reveals a diminished amphetamine-induced DA response corresponding to behavioral sensitization produced by repeated amphetamine pretreatment. *Brain Res* 1992; **571**: 330–337.
- 56 Segal DS, Kuczenski R. Repeated cocaine administration induces behavioral sensitization and corresponding decreased extracellular dopamine responses in caudate and accumbens. *Brain Res* 1992; **577**: 351–355.
- 57 Kalivas PW, Duffy P. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J Neurosci* 1993; **13**: 266–275.
- 58 Paulson PE, Robinson TE. Amphetamine-induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats. *Synapse* 1995; **19**: 56–65.
- 59 Ramos M, Goñi-Allo B, Aguirre N. Studies on the role of dopamine D1 receptors in the development and expression of MDMA-induced behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; **177**: 100–110.
- 60 Ramos M, Goñi-Allo B, Aguirre N. Administration of SCH 23390 into the medial prefrontal cortex blocks the expression of MDMA-induced behavioral sensitization in rats: an effect mediated by 5-HT2C receptor stimulation and not by D1 receptor blockade. *Neuropsychopharmacology* 2005; **30**: 2180–2191.
- 61 White FJ, Joshi A, Koeltzow TE, Hu XT. Dopamine receptor antagonists fail to prevent induction of cocaine sensitization. *Neuropsychopharmacology* 1998; **18**: 26–40.
- 62 Granado N, O'Shea E, Bove J, Vila M, Colado MI, Moratalla R. Persistent MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum and substantia nigra of mice. *J Neurochem* 2008; **107**: 1102–1112.
- 63 O'Callaghan JP, Miller DB. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **270**: 741–751.
- 64 Logan BJ, Lavery R, Sanderson WD, Yee YB. Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 1988; **152**: 227–234.
- 65 Stone DM, Hanson GR, Gibb JW. Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology* 1987; **26**: 1657–1661.
- 66 Nestler EJ, Terwilliger RZ, Walker JR, Sevarino KA, Duman RS. Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain. *J Neurochem* 1990; **55**: 1079–1082.
- 67 Giguère PM, Laroche G, Oestreich EA, Duncan JA, Siderovski DP. Regulation of the subcellular localization of the G-protein subunit regulator GSPM3 through direct association with 14-3-3 protein. *J Biol Chem* 2012; **287**: 31270–31279.
- 68 Baraban JM, Aghajanian GK. Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* 1980; **19**: 355–363.
- 69 Bortolozzi A, Artigas F. Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of alpha-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology* 2003; **28**: 421–434.
- 70 Gorea E, Adrien J. Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT2 receptors. *Eur J Pharmacol* 1988; **154**: 285–291.
- 71 Szabo ST, Blier P. Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res* 2001; **922**: 9–20.
- 72 Jedema HP, Grace AA. Chronic exposure to cold stress alters electrophysiological properties of locus coeruleus neurons recorded *in vitro*. *Neuropsychopharmacology* 2003; **28**: 63–72.
- 73 Jedema HP, Gold SJ, Gonzalez-Burgos G, Sved AF, Tobe BJ, Wensel T *et al*. Chronic cold exposure increases RGS7 expression and decreases alpha(2)-autoreceptor-mediated inhibition of noradrenergic locus coeruleus neurons. *Eur J Neurosci* 2008; **27**: 2433–2443.
- 74 Lanfumey L, Pardon MC, Laaris N, Joubert C, Hanoun N, Hamon M *et al*. 5-HT1A autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *NeuroReport* 1999; **10**: 3369–3374.
- 75 Froger N, Palazzo E, Boni C, Hanoun N, Saurini F, Joubert C *et al*. Neurochemical and behavioral alterations in glucocorticoid receptor-impaired transgenic mice after chronic mild stress. *J Neurosci* 2004; **24**: 2787–2796.
- 76 Antelman SM, Eichler AJ, Black CA, Kocan D. Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science* 1980; **207**: 329–331.
- 77 Deroche V, Marinelli M, Maccari S, Le Moal M, Simon H, Piazza PV. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 1995; **15**: 7181–7188.
- 78 Rougé-Pont F, Marinelli M, Le Moal M, Simon H, Piazza P. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 1995; **15**: 7189–7195.
- 79 Abercrombie ED, Jacobs BL. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. II. Adaptation to chronically presented stressful stimuli. *J Neurosci* 1987a; **7**: 2844–2848.
- 80 Abercrombie ED, Jacobs BL. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful and nonstressful stimuli. *J Neurosci* 1987b; **7**: 2837–2843.
- 81 Price ML, Curtis AL, Kirby LG, Valentino RJ, Lucki I. Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity. *Neuropsychopharmacology* 1998; **18**: 492–502.

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

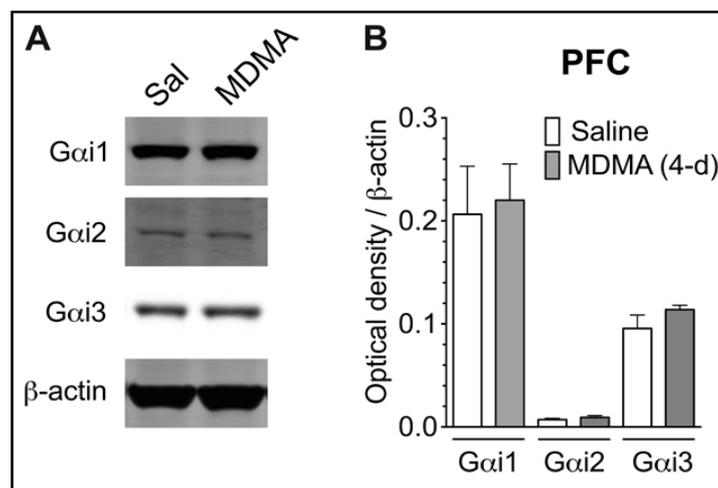
Supplementary information



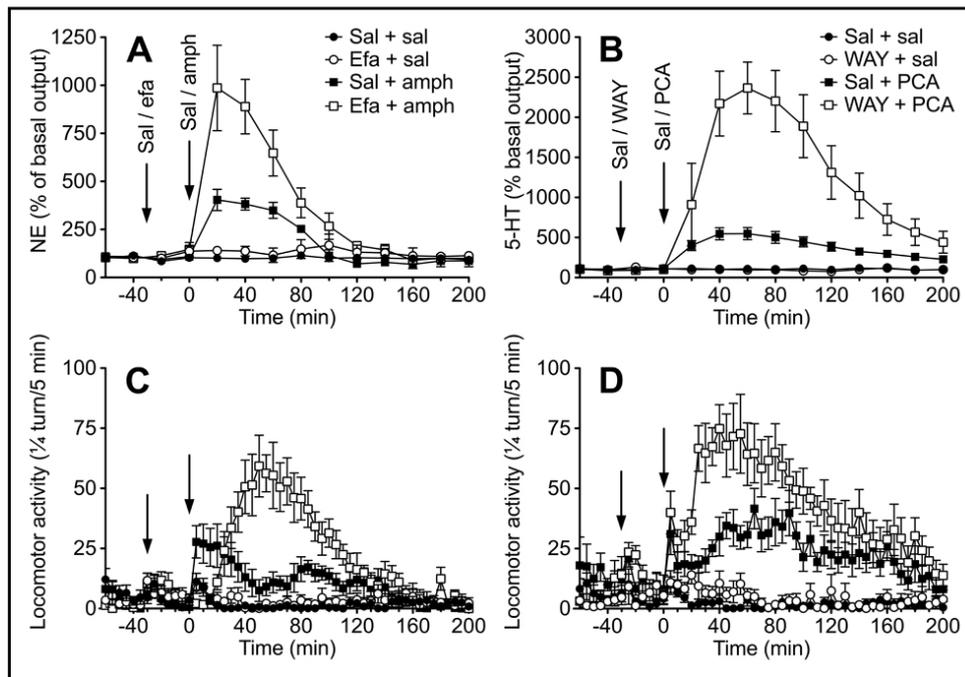
Supplemental Figure 1. (A) Schematic representation of the experimental procedure. Mice were injected once daily for 4 days with either saline, MDMA or SR46349B + prazosin + MDMA. Then, both *in vivo* experiments (microdialysis analysis, locomotor activity monitoring, LORR test, hypothermia assay) as well as *in vitro* experiments (radiolabeling of α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors, western blot and qRT-PCR analysis of G α i/o proteins and mRNAs expression in the LC and the DRN) were conducted 4 days or 1 month after this repeated treatment. (B) Schematic illustration of the localization of the dialysis probe in the mouse PFC, LC and DRN (adapted from the atlas by Paxinos and Franklin, 1997). (C) Schematic illustration of the microdissection of the LC and the DRN (adapted from the atlas by Paxinos and Franklin, 1997).



Supplemental Figure 2. Repeated MDMA fails to sensitize mesocortical dopaminergic neurons. Mice were repeatedly injected with either saline or MDMA (10 mg/kg, i.p.) and extracellular DA levels were monitored by *in vivo* microdialysis following amphetamine injection (2 mg/kg, i.p.) 4 days after withdrawal. Cortical extracellular DA levels are expressed as a percentage of the respective mean basal value \pm SEM (absolute baseline values: repeated saline, 1.3 ± 0.18 pg DA/20 min; repeated MDMA, 0.92 ± 0.2 pg DA/20 min). $n = 5-6$ mice per group. There was no significant difference in cortical extracellular DA levels between the different conditions ($p > 0.05$).



Supplemental Figure 3. Repeated MDMA does not alter Gi proteins expression in the PFC. Mice were repeatedly injected with either saline or MDMA (10 mg/kg, i.p.). Four days or one month after the last injection, expression levels of $G\alpha_1$, $G\alpha_2$ and $G\alpha_3$ were analyzed by western blot in the PFC. Experiments were performed 3 times with $n = 8$ mice per group. Data represent mean \pm SEM. ($p > 0.05$) (unpaired Student's t test).



Supplemental Figure 4. Pharmacological blockade of α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors mimics neurochemical and behavioral sensitization. Mice were acutely injected with either saline, amphetamine (2 mg/kg, i.p.) or PCA (7 mg/kg, i.p.) after being pre-treated with either saline, efaroxan (2.5 mg/kg, i.p.) or WAY-100635 (1 mg/kg, i.p.) 30 min before. Cortical extracellular NE (A) and 5-HT (B) levels were monitored by *in vivo* microdialysis as well as the locomotor response induced by both compounds (C and D). Cortical extracellular monoamines levels are expressed as a percentage of the respective mean basal value \pm SEM (absolute baseline values of NE: sal + sal, 0.55 ± 0.28 pg NE/20 min; efa + sal, 0.58 ± 0.32 pg NE/20 min; sal + amph, 0.59 ± 0.42 pg NE/20 min; efa + amph, 0.83 ± 0.59 pg NE/20 min. Absolute baseline values of 5-HT: sal + sal, 0.63 ± 0.51 pg 5-HT/20 min; WAY + sal, 0.95 ± 0.58 pg 5-HT/20 min; sal + PCA, 0.4 ± 0.12 pg 5-HT/20 min; WAY + PCA, 0.27 ± 0.09 pg 5-HT/20 min). There was no significant difference in basal cortical extracellular monoamines levels between the different conditions ($p > 0.05$). Locomotor activity is expressed as ¼ turn per 5 min \pm SEM. Each group included at least 6 mice for microdialysis experiments and 8 mice for behavioral experiments.

Discussion

Discussion

1. Avancées effectuées et liens avec la littérature

Présentés sous la forme de 4 articles distincts, notre travail a cherché à approfondir les connaissances du modèle de la sensibilisation comportementale et à identifier quelles sont les modifications persistantes dans les systèmes d'autorégulation des transmissions noradrénergiques et sérotoninergiques.

Maintien de la sensibilisation comportementale (Publication n°1)

Concernant le modèle de la sensibilisation comportementale, le premier article présenté analyse le maintien dans la durée de l'hyperactivité locomotrice en réponse à des injections d'amphétamine. Contrairement au très long maintien qui avait été décrit chez le rat (Paulson, Camp, et Robinson 1991), nous n'observons ici qu'un maintien de la réponse potentialisée jusqu'à un mois après la 4^{ème} et dernière injection d'amphétamine. De 2 à 4 mois de sevrage, l'hyperactivité chute à 40% de la réponse sensibilisée. De manière intéressante, un rappel d'amphétamine induit une réponse locomotrice totalement potentialisée et ce, quel que soit le temps de sevrage.

Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats en apparence divergents. Tout d'abord, on peut observer de nombreuses différences de protocole. Au-delà des spécificités liées à l'espèce (le travail cité utilise des rats Holtzman femelles tandis que nous travaillons avec des souris mâles C57Bl/6J), l'exposition à l'amphétamine est très différente. Pendant 42 jours, les rats reçoivent des injections non-contingentes d'amphétamine deux fois par jour à des doses croissantes (1-10 mg/kg), avec des arrêts de traitement le week-end. Notre protocole se limite à une injection d'amphétamine quotidienne à dose constante pendant 4 jours consécutifs.

La dose utilisée et la durée d'exposition à la drogue sont des paramètres décisifs dans le maintien de la sensibilisation et surtout dans la nature de la sensibilisation mesurée. En effet, de fortes doses de drogue induisent des comportements stéréotypés (mouvements de la tête, mouvements répétitifs, ruminations,...).

La locomotion induite par les drogues et les stéréotypies sont des comportements qui sont compétitifs, puisque lorsque l'animal s'engage dans les stéréotypies, il présente moins ou plus du tout de locomotion horizontale (Segal et Mandell 1974). On considère d'ailleurs que ces deux réponses comportementales sont contrôlées par deux systèmes neuronaux différents (Vanderschuren et Pierce 2010). Ainsi, les animaux présentant des lésions bilatérales des neurones dopaminergiques induites par la 6-OH-DA au niveau du NAc. ne présentent plus aucune réponse locomotrice à l'amphétamine, tandis que les lésions au niveau du noyau caudé préviennent les formes intenses de stéréotypie (Kelly, Seviour, et Iversen 1975). Un autre travail vient confirmer ces résultats : la lésion des neurones dopaminergiques et noradrénergiques induite par la 6-OH-DA au niveau du striatum dorsal provoque une diminution des stéréotypies et une augmentation de la réponse locomotrice à différentes doses d'amphétamine (Joyce et Iversen 1984). Les auteurs suggèrent que, de façon similaire à l'incompatibilité entre les comportements stéréotypés contrôlés par les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée et les comportements alimentaires, il existerait une incompatibilité entre la voie nigro-striée et le système mésolimbique au niveau du NAc. qui favoriserait la locomotion induite par les drogues.

Paulson et collaborateurs montrent donc que, chez les rats, les stéréotypies se maintiennent jusqu'à au moins un an après une exposition intense à l'amphétamine, cependant la réponse locomotrice des animaux traités ne reste pas potentialisée (Paulson, Camp, et Robinson 1991).

Puisque nous cherchons à déterminer les modifications neuronales des systèmes impliqués dans les comportements liés à la prise de drogue, nos conditions expérimentales se limitent à des doses faibles, qui n'induisent pas de stéréotypies mais bien une activation dopaminergique mésolimbique contrôlant la locomotion.

Concernant le rebond de sensibilisation lors d'une 6^{ème} injection d'amphétamine, il est intéressant d'observer que même les animaux qui ne paraissaient plus sensibilisés restent tout de même sensibles à l'amphétamine très longtemps et qu'une seule exposition supplémentaire suffit à retrouver une réponse pleinement potentialisée. Bien qu'il soit difficile de comparer directement ces expériences avec les résultats cliniques, il est frappant de remarquer que les ex-fumeurs dépendants restent longtemps vulnérables aux rechutes. Refumer une seule cigarette entraîne souvent une reprise de la consommation au niveau où elle avait été arrêtée.

L'exposition répétée à l'amphétamine induit une altération persistante des principaux systèmes de rétrocontrôle inhibiteur noradrénergique et sérotoninergique (Publications n°2 et n°3)

Après avoir analysé le maintien de la sensibilisation comportementale, nous avons utilisé ce modèle pour étudier les modifications à long terme (jusqu'à un mois) induites par les drogues.

Nous avons montré que les animaux sensibilisés à l'amphétamine présentent une altération du rétrocontrôle inhibiteur des systèmes noradrénergique et sérotoninergique. Cette altération passe par une désensibilisation des récepteurs α_{2A} -adrénergiques (α_{2A} -AR) et 5-HT_{1A} sérotoninergiques suivi d'une diminution d'expression des protéines G_{oi} dans le locus coeruleus (LC) et dans le raphé dorsal (RD) maintenue après un mois de sevrage. Le dysfonctionnement du rétrocontrôle explique, en partie, le maintien à long terme de l'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique observée chez les animaux sensibilisés.

En gardant une correspondance entre le système noradrénergique et sérotoninergique, tous deux modifiés de façon similaire chez les animaux sensibilisés, nous avons réalisé différentes expériences en tenant compte des spécificités de chaque système.

Dysfonctionnement du rétrocontrôle noradrénergique

Le système noradrénergique est celui qui semble subir de profondes modifications et avoir le rôle le plus décisif, notamment dans l'induction de la sensibilisation mesurée en locomotion. En effet, l'activité basale des neurones noradrénergiques du LC est augmentée chez les animaux sensibilisés, et on observe une diminution de l'effet de l'agoniste des α_{2A} -AR, la clonidine. De plus, le blocage ou la stimulation pharmacologique des récepteurs α_{2A} -AR influence significativement l'induction et l'expression de la sensibilisation, mesuré après 3 semaines de sevrage.

Quelques études ont décrit l'effet de l'amphétamine sur l'activité basale des neurones noradrénergiques du LC et l'effet de cette drogue sur l'inhibition induite par la clonidine. Dans ces travaux, le traitement répété à l'amphétamine ne modifie pas l'activité basale des neurones noradrénergiques du LC (Ramirez et Wang 1986a; Ramirez et Wang 1986b). Cependant on observe bien une diminution de la sensibilité des α_{2A} -AR aux effets

inhibiteurs de la clonidine (Ramirez et Wang 1986b). La différence d'activité basale après un traitement répété d'amphétamine pourrait être expliquée par le protocole de sensibilisation utilisé. En effet, Ramirez et collaborateurs sensibilisent des rats avec deux injections quotidiennes d'amphétamine (5mg/kg) pendant 7 jours et mesurent l'activité des neurones noradrénergiques du LC un jour après la dernière injection. Dans les expériences réalisées par le Dr Houades et le Prof. Sara, co-auteurs de l'article n°2, les rats sensibilisés ont subi une injection quotidienne de 0,75mg/kg d'amphétamine pendant 4 jours, et les enregistrements de neurones ont été effectués après un sevrage d' 1 mois. Il est possible que la modification de l'activité noradrénergique basale nécessite un peu de temps pour se mettre en place.

Dans nos conditions expérimentales, le système noradrénergique des souris sensibilisées est hyperactif à l'état basal. Il est donc envisageable de penser que n'importe quel stimulus qui active les neurones noradrénergiques pourra induire une libération de noradrénaline (NA) plus importante chez les animaux sensibilisés par rapport aux contrôles.

L'hypothèse d'une excitabilité noradrénergique altérée a été testée en mesurant la décharge des neurones noradrénergiques du LC chez des rats sensibilisés après un mois de sevrage. La stimulation de la patte induit une séquence d'excitation suivie d'une inhibition bien caractérisée (F.-J. Chen et Sara 2007). Lorsque des stimulations électriques d'intensité croissante sont effectuées sur la patte controlatérale, les animaux sensibilisés à l'amphétamine présentent une réponse typique à de plus faibles intensités que les animaux contrôles (Houades et Sara, communication personnelle). Cette diminution du seuil de sensibilité suggère une excitabilité noradrénergique basale chez les animaux sensibilisés.

Comme nous l'avons développé précédemment, les projections noradrénergiques sont très diffuses et induisent des libérations de NA dans de nombreuses régions, dont l'amygdale basolatérale et l'hippocampe. Grâce à des expériences où la transmission noradrénergique est modifiée pendant la période de consolidation de la mémoire, de nombreux auteurs ont mis en évidence une influence de la NA dans la consolidation de la mémoire à long-terme (McGaugh et Roozendaal 2009; Sara 2009). La NA a également un rôle dans la récupération de la mémoire. Une équipe a ainsi montré que les souris qui n'expriment plus l'enzyme nécessaire à la synthèse de NA, la dopamine- β -hydroxylase, présentent une altération de la récupération de la mémoire contextuelle et spatiale (Murchison et al. 2004). Le rôle noradrénergique semble passer par les récepteurs β 1-adrénergiques de l'hippocampe. On peut supposer que la transmission noradrénergique étant plus excitable chez les animaux

sensibilisés, la consolidation de la mémoire liée à la consommation de drogue et au contexte associé est plus importante. Cela expliquerait en partie le fort apprentissage observé chez les animaux dans des paradigmes d'auto-administration associée à des indices, ainsi que l'induction de comportement de recherche de drogue lors de la présentation d'un indice précédemment associé à la drogue. Ces expériences modélisent bien la vulnérabilité persistante du toxicomane en sevrage et le risque de rechute augmenté lorsqu'il est en présence d'éléments associés à la drogue (par exemple, une seringue pour un héroïnomane).

Nous avons aussi montré que le blocage des récepteurs α_{2A} -AR lors de l'injection d'amphétamine facilite l'induction et l'expression de la sensibilisation comportementale tandis que la stimulation des α_{2A} -AR avec la clonidine bloque ces deux phases. Ce résultat atteste de l'importance de la transmission noradrénergique dans le développement de la sensibilisation comportementale et de la possibilité de contrôler la réponse noradrénergique à l'amphétamine en modifiant son rétrocontrôle inhibiteur.

Une équipe finlandaise a étudié le rôle de l'atipamezole, un antagoniste des récepteurs α_2 -AR sur la sensibilisation comportementale à l'amphétamine (Juhila et al. 2003). Leurs résultats sont en accord avec les nôtres, puisque le prétraitement à l'atipamezole réduit le développement de la sensibilisation, ainsi que l'expression mesurée lors d'une injection aiguë d'amphétamine.

Afin de préciser l'effet adrénérgique observé avec cet antagoniste non spécifique des récepteurs α_{2A} -AR, cette même équipe a par la suite étudié la sensibilisation à l'amphétamine des souris qui n'expriment plus le récepteur α_{2A} -AR (Juhila et al. 2005). Ces souris présentent une sensibilisation à l'amphétamine fortement diminuée par rapport aux contrôles. Cependant, il est difficile de conclure sur le rôle des α_{2A} -AR dans la sensibilisation car les souris mutantes se sensibilisent après un traitement répété au sérum physiologique. Il semble donc que ces souris répondent au stress de l'injection plus qu'à la drogue elle-même. Des travaux montrent d'ailleurs que le stress chronique augmente l'excitabilité des neurones noradrénergiques du LC et que ces effets sont dus en partie à une désensibilisation des autorécepteurs α_{2A} -adrénérgiques (Jedema et Grace 2003; Jedema et al. 2008).

Le rôle de la clonidine sur les effets induits par l'abus de drogues a été étudié pour les opiacés chez l'Homme et plusieurs travaux montrent que le Catapressan[®] (la clonidine),

soulage les symptômes de sevrage physique des héroïnomanes, ce qui évite la rechute (Gold, Redmond, et Kleber 1978). Il paraît cependant difficile de comparer cet effet de la clonidine à l'effet sur l'induction de la sensibilisation. Chez les héroïnomanes, la clonidine diminue probablement l'hyperactivité de la synthèse d'AMPcycloique des neurones noradrénergiques du LC observée après des injections chroniques d'opioïdes (Nestler, Alreja, et Aghajanian 1994). L'augmentation stable dans le temps de cette voie de signalisation est une réponse compensatrice à l'effet aigu des opioïdes qui inhibent les neurones noradrénergiques du LC.

Il a également été montré que la clonidine empêche les comportements de recherche d'héroïne induits par un stress chez le rat, mais l'effet semble être dépendant exclusivement des α_{2A} -AR exprimés par les neurones noradrénergiques du tegmentum latéral, puisque les injections intra-LC ne reproduisent pas cet effet (Shaham et al. 2000).

Bien que nous ayons montré un effet significatif sur la sensibilisation, la stimulation des autorécepteurs α_{2A} -AR a été effectuée simultanément aux injections de drogue. Afin de tester si l'effet de la clonidine sur la réponse locomotrice peut également influencer des animaux sensibilisés, nous avons traité de manière répétée des animaux sensibilisés à l'amphétamine avec l'agoniste adrénergique (résultats non montrés). Ce traitement n'influence pas la sensibilisation, puisqu'après une injection d'amphétamine, les animaux maintiennent leur réponse potentialisée. Jusqu'à présent, seule l'exposition prolongée à un environnement enrichi est capable d'annuler la sensibilisation comportementale et la préférence de place à la cocaïne chez des animaux ayant acquis ces comportements (Solinas et al. 2008).

Dysfonctionnement du rétrocontrôle sérotoninergique

On observe également une altération du rétrocontrôle inhibiteur sérotoninergique. En effet, l'injection de 8-OH-DPAT, un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, n'induit plus de diminution de libération de 5-HT dans le CPF des souris sensibilisées, ce qui suggère une désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A}.

A l'instar de la désensibilisation noradrénergique, cette altération du rétrocontrôle inhibiteur des récepteurs 5-HT_{1A} est probablement à l'origine de l'hyper-réactivité sérotoninergique observée chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine (Salomon et al. 2006). En accord avec cette hypothèse, les souris n'exprimant plus le récepteur 5-HT_{1A} (5-

HT_{1A}-KO) n'ont pas de changement au niveau du taux extracellulaire basal de 5-HT, mais on observe une libération de 5-HT dans le RD plus importante chez les mutants que chez les contrôles après un stress ainsi qu'après l'administration de fluoxétine, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (Bortolozzi et al. 2004).

Il est intéressant de noter que si la désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A} induit un phénotype comparable aux souris 5-HT_{1A}-KO au niveau de la libération de 5-HT, les réponses des animaux sensibilisés pourraient également être comparables au phénotype anxieux observé chez les 5-HT_{1A}-KO. En effet, les souris n'exprimant plus le récepteur 5-HT_{1A} de manière constitutive présentent une anxiété et une réponse au stress plus importante que les contrôles (Parks et al. 1998). A l'inverse, l'exposition à un stress très léger chronique, ou léger chronique, désensibilise les autorécepteurs 5-HT_{1A} du RD (Lanfumey et al. 1999; Froger et al. 2004). L'ensemble de ces résultats apporte des éléments de réponse quant au mécanisme qui induit la sensibilisation croisée entre le stress et les comportements induits par les drogues (Antelman et al. 1980; Deroche et al. 1995; Rouge-Pont et al. 1995).

Concernant le rôle des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'induction et l'expression de la sensibilisation à l'amphétamine, stimuler ces récepteurs n'influence aucune de ces étapes. Bien que d'autres équipes aient montré que l'injection de l'agoniste 8-OH-DPAT atténue la sensibilisation à la méthamphétamine (Ago et al. 2006) et bloque complètement la sensibilisation à l'amphétamine (Przegaliński et al. 2000), l'absence d'influence dans nos conditions n'est pas une surprise. En effet, les doses d'amphétamine utilisées pour la sensibilisation n'induisent pas de libération de 5-HT chez la souris, il semble cohérent de ne pas observer d'effet de la stimulation du rétrocontrôle inhibiteur. Un effet totalement différent serait attendu dans le cadre de la sensibilisation comportementale aux opiacés ou au MDMA. Ces drogues induisent une forte libération de 5-HT et par conséquent bloquer cette libération pourrait altérer la sensibilisation induites par celles-ci.

Maintien de la désensibilisation à long terme des autorécepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} ?

Afin de déterminer le mécanisme qui permet le maintien de la désensibilisation fonctionnelle des autorécepteurs, nous avons quantifié la liaison de la [¹²⁵I]para-iodoclonidine et du [³H]WAY 100 635 aux α_{2A} -AR et aux récepteurs 5-HT_{1A}. Nous n'observons pas de différences d'expression des protéines entre les animaux sensibilisés à l'amphétamine ou au MDMA et les contrôles. Nous avons donc cherché une altération en aval des récepteurs chez les animaux sensibilisés. Nous avons observé une diminution du couplage des récepteurs 5-HT_{1A} aux protéines G_{αi} au niveau du RD mesuré avec le GTPγS, ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines G_{α1-2} au niveau du LC et G_{α3} au niveau du RD.

Bien que nous n'ayons pas montré dans nos conditions l'interaction entre les α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} et ces sous-types de protéines G, de nombreux travaux montrent que cette interaction existe. Une étude montre ainsi l'expression G_{α1-3} au niveau du LC et suggère un couplage préférentiel à la sous-unité G_{α2}, puisque les effets des agonistes α_{2A} -AR ne sont plus observés dans les souris n'exprimant plus cette sous-unité (Albarrán-Juárez et al. 2009).

Pour le récepteur 5-HT_{1A}, le couplage au niveau du RD a été montré exclusivement avec la sous-unité G_{α3} chez le rat (Mannoury la Cour et al. 2006). Or, dans nos conditions expérimentales, seule l'expression de la sous-unité G_{α1} est modifiée chez les souris sensibilisées après un mois de sevrage. Au-delà de possibles spécificités de couplage inter espèces, nous pensons que la diminution persistante de l'expression de G_{α1} pourrait influencer le couplage 5-HT_{1A}/G_{α3}. En effet, altérer l'expression d'un sous-type pourrait influencer l'ensemble des protéines G_{αi} et créer une hétérorégulation entre récepteurs, comme cela a été montré lors du blocage des récepteurs CB1 aux cannabinoïdes qui induit une désensibilisation fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{1A} du RD (Aso et al. 2009).

Nos résultats concernant la diminution de l'expression des protéines G_{αi} induite par les drogues rejoignent d'autres études qui montrent une modification de l'expression de ces protéines dans différentes régions du cerveau, dont le NAc. et le LC, après une exposition répétée à différentes drogues (Nestler et al. 1990; Striplin et Kalivas 1993). Ce phénomène a d'ailleurs aussi été observé chez les humains, puisqu'une étude post-mortem montre une diminution de 32 à 49% de l'expression des sous-unités G_{α1} et G_{α2} spécifiquement dans le NAc. de consommateurs d'héroïne et de méthamphétamine (McLeman et al. 2000).

Un autre travail montre le rôle complexe des protéines $G_{\alpha_{olf}}$, couplées au récepteur dopaminergique D_1 dans le striatum, dans la réponse aiguë et chronique aux drogues. En effet, les souris hétérozygotes pour le gène codant pour $G_{\alpha_{olf}}$ présentent une réponse diminuée à des injections aiguës d'amphétamine et de cocaïne et une sensibilisation locomotrice plus forte pour ces deux drogues, tandis que la préférence de place n'est pas altérée (Corvol et al. 2006).

Les mécanismes qui maintiennent la diminution des protéines G_{α_i} dans les neurones noradrénergiques et sérotoninergiques restent à déterminer, mais un début de réponse est apporté par quelques expériences préliminaires. Les ANRm des sous-unités $G_{\alpha_{i1-3}}$ ont été mesurés dans le LC et le RD, et la sensibilisation au MDMA ne semble pas altérer leur niveau d'expression. Il pourrait s'agir donc de modifications post-transcriptionnelles (Giguère et al. 2012). Une autre hypothèse testée concerne la modification des protéines régulatrices de la signalisation des protéines G_{α_i} , les RGS (Regulators of G protein signaling) et AGS (activators of G-protein signaling), après un traitement répété à l'amphétamine. Il a été montré que ces protéines régulatrices sont modifiées après une exposition aux drogues (Rahman et al. 2003; Han et al. 2010; Bishop et al. 2002). En fonction du résultat de ces études et de l'expression des protéines, nous avons analysé par la méthode de Western Blot l'expression des RGS 2,4 et 7 dans le LC, des protéines RGS 2, 4, 7 et 10 dans le RD, ainsi que l'expression de l'AGS3 dans les deux noyaux. Aucune différence d'expression n'a été observée après un traitement répété à l'amphétamine ni au MDMA (résultats non montrés).

Une hétéro-régulation entre les récepteurs α_{1B} -AR/5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}/ α_{2A} -AR est-elle possible ?

La facilitation de la sensibilisation obtenue par le blocage de ces récepteurs est un résultat déconcertant, puisque nous pensions que « protéger » ces récepteurs en les bloquant allait empêcher cette désensibilisation. Afin de vérifier ce résultat, nous avons analysé la sensibilisation à l'amphétamine à deux doses (1 et 2 mg/kg) en bloquant les récepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} (Figure 12). Bloquer ces récepteurs facilite bien la sensibilisation à 1mg/kg, non observée à cette dose en conditions contrôles.

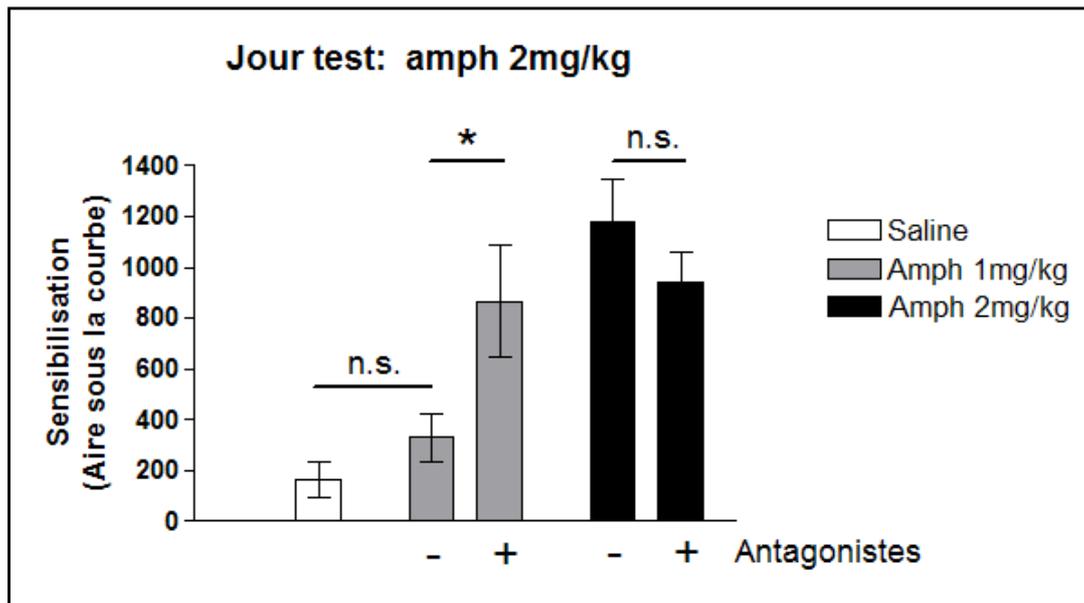


Figure 12 : Le blocage des récepteurs α_{2A} -AR et 5-HT $_{1A}$ facilite et permet la sensibilisation à de faibles doses d'amphétamine
 Amph : amphétamine, Antagonistes : Efaroxan (2.5 mg/kg, i.p.) + WAY 100 635 (1 mg/kg, i.p.), *p< 0.05, n.s.: non significatif

Ce résultat complémentaire suggère que la désensibilisation à long terme des récepteurs α_{2A} -AR et 5-HT $_{1A}$ n'est pas la conséquence de la stimulation répétée de ces récepteurs par la NA ou la 5-HT, mais pourrait être induite par des mécanismes intracellulaires. Or, la stimulation des récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT $_{2A}$ est nécessaire pour observer l'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique chez les animaux sensibilisés (Tassin 2008).

On observe une grande homologie entre les récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT $_{2A}$. Ils activent tous deux la voie G $_q$ /G $_{11}$, qui favorise la libération d'inositol-triphosphate (IP3) et de diglycéride (DAG). L'IP3 augmente la libération de calcium intracellulaire et le DAG active la PKC. Au niveau de l'expression de ces récepteurs, le récepteur α_{1B} -AR est exprimé par les neurones sérotoninergiques du RD, et le récepteur 5-HT $_{2A}$ est exprimé par les interneurons GABAergiques qui entourent le LC ainsi que par les neurones noradrénergiques du LC eux-mêmes. Les neurones noradrénergiques du LC expriment donc à la fois les récepteurs α_{2A} -AR et 5-HT $_{2A}$ et les neurones sérotoninergiques du RD expriment les récepteurs 5-HT $_{1A}$ et α_{1B} -AR (Figure 13). Nous proposons que l'activation continue des récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT $_{2A}$ active la cascade intracellulaire G $_q$ /G $_{11}$ et induit la phosphorylation des autorécepteurs 5-HT $_{1A}$ et α_{2A} -AR et/ou de leur protéine associée, respectivement, et le maintien de leur désensibilisation.

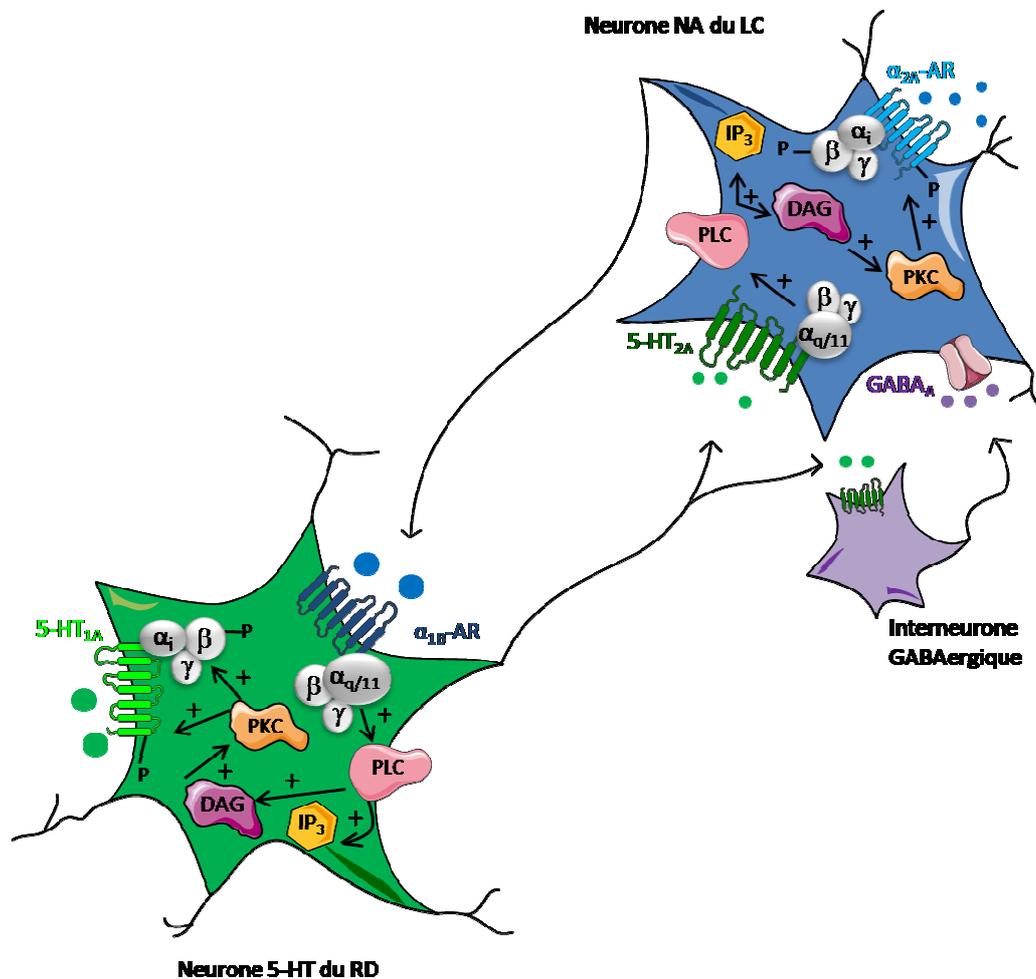


Figure 13 : Modèle d'hétérorégulation entre les récepteurs α_{1B} -AR/ $5-HT_{1A}$ et $5-HT_{2A}$ / α_{2A} -AR. 5-HT : sérotonine ; DAG: diacylgérol ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; IP_3 : inositol-triphosphate ; LC : locus coeruleus ; NA : noradrénaline ; P: phosphorylation ; PKC: phosphokinase C ; PLC: phospholipase C ; RD : raphé dorsal

Plusieurs études suggèrent qu'un tel mécanisme pourrait avoir lieu au niveau intracellulaire. Tout d'abord, il a été montré *in vitro* que l'activation de la PKC induit la phosphorylation des récepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} et leur désensibilisation (Liang et al. 1998; Y. Chen et Penington 1996). Cependant, la phosphorylation entraîne une internalisation suivie d'une dégradation des récepteurs désensibilisés, or dans notre modèle il n'y a pas de diminution d'expression des récepteurs.

On observe en revanche une diminution de l'expression des protéines G_{qi}. D'autres études *in vitro* montrent que l'activation de la PKC phosphoryle les protéines G_{qi} et induit un découplage entre le récepteur et la protéine G associée (Chen et Penington 1996; Sasaki et al. 1997; Di Marzo et al. 1993). Ce mécanisme PKC-dépendant a été montré spécifiquement pour la phosphorylation des sous-unités G_{qi1} et G_{qi2} (Murthy, Grider, et Makhoulouf 2000).

Ainsi, l'activation des récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT_{2A} respectivement par la NA libérée dans le RD et par la 5-HT libérée dans le LC induirait une activation de la PKC qui pourrait phosphoryler les protéines G_{qi} des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques et induire une diminution de couplage entre ces protéines et les autorécepteurs 5-HT_{1A} et α_{2A} -AR.

2. Limites du travail et généralisations

Les résultats obtenus sont-ils spécifiques des injections non-contingentes de drogue ?

Le modèle utilisé, la sensibilisation comportementale, se base sur des injections non-contingentes de drogue et ne prend pas en compte la volonté de l'animal. La prise de décision est pourtant un paramètre décisif dans la consommation de drogues et le passage à l'abus chez l'humain. De manière générale, la sensibilisation comportementale n'est pas associée aux prises de drogues chez l'humain, même si quelques travaux montrent des caractéristiques communes (Strakowski et al. 1996; Strakowski et Sax 1998; Boileau I et al. 2006).

Comme nous l'avons exposé dans l'introduction, certains modèles tiennent compte de ce paramètre. Le plus couramment utilisé est probablement celui de l'auto-administration de drogues (O'Connor et al. 2011; Vanderschuren et Ahmed 2013). Dans ce modèle, des études ont montré un effet sur la prise de drogue lorsque les systèmes noradrénergiques

ou sérotoninergiques sont altérés (Zhang et Kosten 2005; Greenwell et al. 2009; Trigo et al. 2007; Maurel, De Vry, et Schreiber 1999; Drouin, Darracq, et al. 2002). En particulier, les autorécepteurs α_{2A} -AR semblent avoir un rôle dans le comportement de recherche de cocaïne et d'héroïne induit par le stress, puisque des injections de clonidine effectuées juste avant le stress évitent ces comportements (Shaham et al. 2000; Erb et al. 2000). Rappelons que la clonidine est le catapresan® qui est utilisé en clinique.

Nous n'avons pas étudié l'état de sensibilité des autorécepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A}, après des protocoles d'auto-administration, mais les quelques articles qui montrent un rôle des transmissions noradrénergiques et sérotoninergiques dans ces modèles incitent à s'y intéresser.

Peut-on étendre les résultats obtenus avec l'amphétamine et le MDMA aux autres drogues ou, au moins, aux psychostimulants ?

Par définition les drogues partagent la capacité commune d'induire un comportement toxicomanogène, mais ont des propriétés d'action et des effets sur les systèmes neuronaux qui sont très hétérogènes. L'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique a été montrée pour une grande majorité de drogues : l'amphétamine, la cocaïne, la morphine, le MDMA, l'alcool et la nicotine, lorsque cette dernière est couplée à des inhibiteurs de monoamines oxydases (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008; Lanteri et al. 2009; Tassin 2008). Nos résultats expliquant le mécanisme de maintien se limite cependant aux injections répétées d'amphétamine (Publications n°2 et 3) et de MDMA (Publication n°4). Quelques études trouvées dans la littérature nous permettent néanmoins d'observer les modifications des autorécepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} induites par l'exposition à d'autres drogues.

Un premier travail analyse l'effet de l'exposition prénatale à la cocaïne sur la transmission noradrénergique testée sur des rats à l'âge de jeune adulte (Elsworth et al. 2007). Un léger stress induit une augmentation du taux de renouvellement de la NA dans le CPF des rats exposés à la cocaïne avant la naissance. Chez ces mêmes animaux, on observe une diminution de la liaison de la [¹²⁵I] para-iodo-clonidine aux autorécepteurs α_{2A} du LC, ce qui suggère une diminution d'expression de ces récepteurs après l'exposition à la cocaïne in utero qui se maintient à l'âge adulte.

Une autre étude a analysé l'état de sensibilité des autorécepteurs 5-HT_{1A} après une sensibilisation à la cocaïne. Chez des rats sensibilisés à cette drogue, l'agoniste 8-OH-DPAT induit une inhibition des neurones sérotoninergiques du RD plus importante que chez les contrôles, ce qui suggère une hypersensibilité des autorécepteurs 5-HT_{1A}. Cette modification ne semble pas passer par une surexpression de ces récepteurs, puisque le marquage de l'agoniste radioactif n'augmente que dans l'amygdale medio-centrale, et non dans le RD (Cunningham, Paris, et Goeders 1992). Bien que notre étude sur les autorécepteurs 5-HT_{1A} se limite à l'amphétamine et au MDMA, l'hyper-réactivité sérotoninergique a été montrée également pour la cocaïne, après une exposition à la drogue similaire à celle utilisée dans le papier de Cunningham et ses collaborateurs. Il serait donc logique pour nous d'observer la même désensibilisation des 5-HT_{1A} chez les animaux sensibilisés à la cocaïne, après un mois de sevrage. Or, dans l'étude citée (Cunningham, Paris, et Goeders 1992), la réactivité des autorécepteurs a été testée après des sevrages courts, de 18 et 24h.

Dans nos conditions expérimentales, le couplage fonctionnel entre le récepteur 5-HT_{1A} et les protéines G_{αi} est diminué chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine. Un autre article étudie l'influence de la prise volontaire chronique d'éthanol sur les autorécepteurs 5-HT_{1A} et sur l'activité spontanée basale des neurones sérotoninergiques du RD. Les animaux qui ont bu de façon volontaire l'éthanol présentent une augmentation du couplage entre ces récepteurs et les protéines G_{αi} dans le RD, ce qui suggère une hypersensibilité des autorécepteurs (Kelaï et al. 2008). La prise d'éthanol ne modifie pas l'activité spontanée des neurones. Il est important de souligner que ces mesures ont été effectuées le jour même de la dernière prise d'éthanol, sans aucune étape d'abstinence ou de sevrage, dans des conditions très différentes de nos sevrages à long terme.

Dans toutes ces études, l'importance du temps de sevrage est fondamentale, puisque cela permet de différencier entre des adaptations qui cherchent à compenser l'effet immédiat de la drogue et des modifications à long terme qui pourraient expliquer les altérations permanentes des systèmes neuronaux. Ainsi, on observe qu'un traitement répété à la morphine induit une augmentation de couplage du récepteur 5-HT_{1A} aux protéines G_{αi} dans le CPF tout de suite après le traitement, tandis qu'après une semaine de sevrage, ce même couplage est diminué dans le RD (Lutz et al. 2011).

Il est intéressant de remarquer que, seule, la nicotine n'induit pas de sensibilisation comportementale (Marks, Burch, et Collins 1983; Kita et al. 1988; Sparks et Pauly 1999;

Villégier, Salomon, Blanc, et al. 2006). En revanche, en présence d'inhibiteurs de monoamines oxydases, contenues dans le tabac et dans sa fumée, la nicotine induit des réponses locomotrices et récompensantes similaires à toutes les autres drogues (Villégier, Salomon, Granon, et al. 2006). Il a été démontré que cet effet des inhibiteurs de monoamines oxydases passe par une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} du RD, probablement *via* une internalisation de ces récepteurs (Lanteri et al. 2009). Il semble donc que la désensibilisation des 5-HT_{1A} soit essentielle pour les mécanismes neurobiologiques induits par le tabac.

Les autorécepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} sont-ils les seuls à être touchés ?

En plus du rétrocontrôle inhibiteur exercé par les autorécepteurs 5-HT_{1A}, les neurones sérotoninergiques expriment également des autorécepteurs 5-HT_{1B} au niveau des terminaisons synaptiques. L'activation de ces récepteurs inhibe la libération de 5-HT au niveau des zones de projection (Sinton et Fallon 1988; Sharp, Bramwell, et Grahame-Smith 1989, 1989; Hjorth et Tao 1991) et, de manière similaire aux récepteurs 5-HT_{1A}, le contrôle 5-HT_{1B} semble être phasique puisque les souris n'exprimant pas ce récepteur présentent la même activité sérotoninergique de base (Evrard et al. 1999). Quelques auteurs ont étudié le rôle de ces récepteurs dans la réponse aux drogues et les résultats indiquent que les récepteurs 5-HT_{1B} peuvent agir sur celle-ci en modifiant directement l'activité sérotoninergique mais aussi via le contrôle de la libération de DA dans le NAc. (Przegalinski et al. 2001). Les deux sous-types de récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} ayant un rôle similaire mais des adressages neuronaux différents, il serait possible d'observer une augmentation de l'activité 5-HT_{1B} afin de compenser la désensibilisation à long terme mesurée chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine. Nous n'avons pas étudié cette possibilité, mais quelques études suggèrent que la compensation n'est pas systématique. En effet, chez les animaux qui n'expriment plus de 5-HT_{1A}, on n'observe pas de changement dans l'efficacité des récepteurs 5-HT_{1B} du RD à diminuer la libération locale de 5-HT (Bortolozzi et al. 2004) ni de changement de densité de ces récepteurs dans ce même noyau (Ase et al. 2001).

Quels autres mécanismes peuvent expliquer l'hyper-réactivité des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques ?

L'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique observée chez les animaux sensibilisés est donc en partie expliquée par une désensibilisation à long terme des rétrocontrôles inhibiteurs respectifs de ses systèmes. Mais une autre hypothèse plausible concerne les afférences glutamatergiques reçues par le LC et le RD. Ces arrivées excitatrices pourraient être renforcées chez les animaux sensibilisés, ce qui induirait une réactivité noradrénergique et sérotoninergique augmentée.

La transmission glutamatergique est essentielle au développement de comportements de type addictif dans les modèles animaux, en particulier celui de la sensibilisation comportementale. En effet, le blocage des récepteurs NMDA prévient le développement de la sensibilisation comportementale aux psychostimulants (Karler et al. 1989; Wolf et Khansa 1991; Vanderschuren et Kalivas 2000).

Une quantité croissante d'études propose que les processus addictifs peuvent être considérés comme une forme anormale de plasticité synaptique (Wolf et al. 2004). Une des transmissions les plus étudiées à cet égard est la transmission dopaminergique et, particulièrement, la plasticité des synapses dans l'ATV et le NAc. qui reçoivent des afférences glutamatergiques du CPF. La première démonstration de cette théorie a décrit une LTP AMPA-dépendante dans les synapses glutamatergiques des neurones dopaminergiques de l'ATV induite par une injection aiguë de cocaïne (Ungless et al. 2001). Cette plasticité se maintient 5 jours après l'injection, et n'est plus mesurée après 10 jours de sevrage. Par la suite, la même LTP a été testée et obtenue pour des injections aiguës de toutes les drogues : amphétamine, morphine, nicotine et éthanol (Saal et al. 2003; Faleiro, Jones, et Kauer 2004). La LTP semble avoir lieu également après des injections répétées, puisque ce phénomène est observé après un traitement répété de cocaïne (Liu, Pu, et Poo 2005).

La LTP a également été mesurée dans les neurones glutamatergiques du CPF après des injections de cocaïne (Huang, Lin, et Hsu 2007; Lu et al. 2010). Compte tenu du contrôle glutamatergique cortical sur les noyaux du LC et du RD, ces modifications laissent supposer une activation plus forte des transmissions noradrénergiques et sérotoninergiques.

Mais la plasticité synaptique ne se limite pas à des modifications induites par des injections non-contingentes de drogues. Récemment, une potentialisation des fibres

glutamatergiques du NAc. *core* a été mise en évidence après une extinction de l'auto-administration de cocaïne (Moussawi et al. 2009). Lors de la restauration du comportement d'auto-administration, après une longue période de sevrage, une potentialisation rapide et éphémère supplémentaire de ces synapses est observée (Gipson et al. 2013; Gipson, Kupchik, et Kalivas 2013). Cette potentialisation est spécifique de l'auto-administration de cocaïne et n'est pas observée avec l'auto-administration de sucre. Ces résultats suggèrent que la plasticité glutamatergique a aussi un rôle dans les comportements de recherche de cocaïne et de rechute.

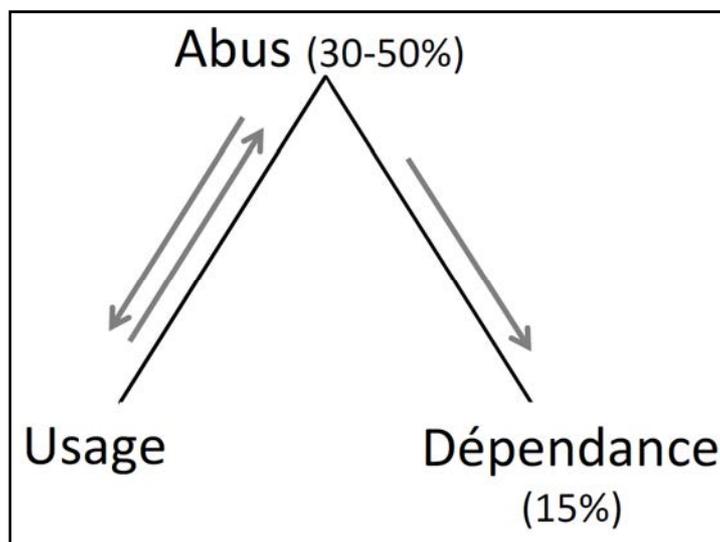
Pour le moment, aucune étude n'a analysé la plasticité glutamatergique au niveau du LC et du RD, mais il paraît plausible qu'elle existe. Tout d'abord, il existe un contrôle clair de ces deux noyaux par les voies glutamatergiques descendantes (Hajós et al. 1998; Lu et al. 2012). De plus, la NA et la 5-HT ont toutes deux été impliquées dans des processus de plasticité. Ainsi, la NA est nécessaire pour bloquer l'inhibition GABAergique et permettre l'induction de LTP dans les synapses des projections thalamiques sur l'amygdale (Tully et al. 2007). La sérotonine est également capable d'induire une LTP des transmissions synaptiques de l'amygdale (Y.-Y. Huang et Kandel 2007). Enfin, certaines formes de LTP nécessitent la stimulation de la PKC, qui a lieu lors de l'activation des récepteurs α_{1B} -AR et 5-HT_{2A} (Malinow, Madison, et Tsien 1988).

Nous proposons donc que, en parallèle du dysfonctionnement du rétrocontrôle inhibiteur noradrénergique et sérotoninergique observé chez les animaux sensibilisés, une plasticité de type LTP s'établit au niveau des synapses glutamatergiques du LC et du RD. Cette plasticité induirait une plus forte réactivité des transmissions noradrénergiques et sérotoninergiques chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine.

Quels systèmes neuromodulateurs sont altérés dans les différentes étapes de la transition vers l'addiction ?

Toutes les thèses décrites dans la première partie de ce travail apportent des notions clés pour comprendre et mieux modéliser l'addiction. Étant donné la complexité de ce trouble, il est d'ailleurs plausible que toutes les hypothèses soient exactes à un moment donné du processus addictif.

En restant proche de la clinique, nous nous fondons sur la division des pratiques addictives en 3 paliers progressifs : l'usage, l'abus et la dépendance ([Figure 14](#)) (Reynaud, Parquet, et Lagrue 1999).



[Figure 14](#) : Illustration des trois paliers usage, abus et dépendance

Les trois étapes sont les mêmes que celles développées dans le rapport des pratiques addictives (Reynaud, Parquet, et Lagrue 1999) et reprises dans la transition par étapes vers l'addiction (Piazza et Deroche-Gamonet 2013). Ainsi, l'usage est caractérisé par une consommation sans dommage induit. Les dommages sont cependant possibles et la pratique est qualifiée de « à risque ». Il est difficile d'avancer un pourcentage de la population touchée, car ce palier est hétérogène et regroupe la non-consommation, la consommation socialement réglée et la consommation à risque. A titre d'exemple, en France, la non consommation d'alcool est de 10%, tandis que 90% des français ne consomment pas de drogues illicites. Les chiffres sont donc extrêmement dépendants de la drogue et des facteurs de sexe et d'âge (Reynaud, Parquet, et Lagrue 1999).

Notons que tous les stimuli récompensants n'induisent pas le passage de l'usage à l'abus, mais que le stimulus doit être récompensant pour induire ce passage (drogues).

La répétition de la prise et les vulnérabilités individuelles favoriseraient le passage vers le deuxième palier, l'abus. Ici, la consommation répétée induit des dommages dans des domaines somatiques, psychoaffectifs ou sociaux. Le passage vers l'abus pourrait être principalement soutenu par la transmission dopaminergique, puisque les drogues activeraient les circuits de récompense en attribuant à celle-ci la notion de plaisir ([Figure](#)

15). C'est à ce niveau que se situent les paradigmes d'auto-administration et de préférence de place conditionnée, qui montrent un comportement motivé pour des stimuli plaisants. En effet, les animaux apprennent à s'auto-administrer une drogue, mais aussi du sucre (Lenoir et al. 2007) et on observe une préférence de place pour une multitude de stimuli appétitifs naturels, comme la nourriture, la copulation ou l'exercice (Bardo et Bevins 2000). Ces paradigmes sont intéressants car ils permettent une dissection précise des mécanismes dopaminergiques impliqués dans les comportements motivés par des récompenses.

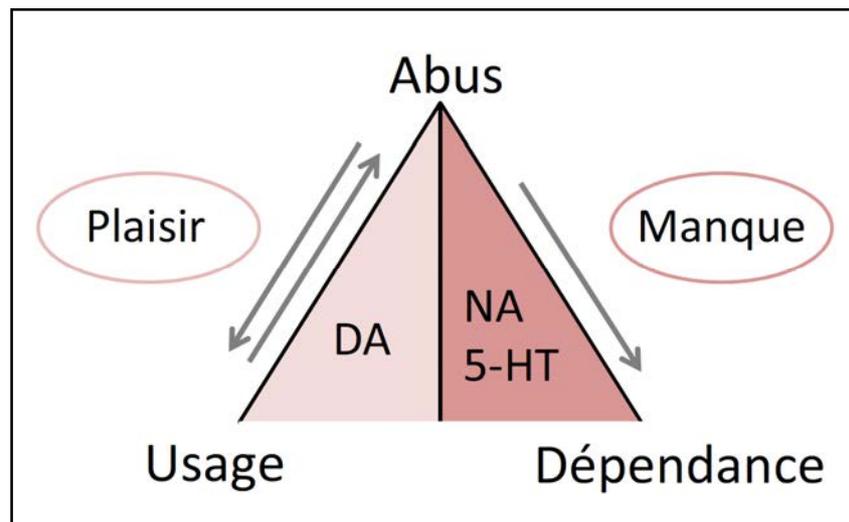


Figure 15 : Illustration des trois paliers usage, abus et dépendance avec les transmissions neuromodulatrices hypothétiquement associées

Dans l'abus, la drogue prend de plus en plus d'importance, tant au niveau du temps consacré comme des doses croissantes, surtout pour les opiacés, pour lesquels la tolérance se met en place avec la répétition des prises. Bien que le rapport à la drogue a changé par rapport au stage d'usage, ce stade ne serait pas encore considéré comme de l'addiction. Il serait logique d'inclure dans ce palier les animaux qui favoriseraient une récompense naturelle à la drogue, lorsque le choix est possible (Lenoir et al. 2007), ou les animaux ne validant qu'un ou deux critères définis par le modèle de Deroche-Gamonet et collaborateurs (Deroche-Gamonet, Belin, et Piazza 2004). Il serait également possible d'inclure dans ce groupe les animaux qui augmentent leur consommation de cocaïne lors d'un accès prolongé à celle-ci. (Ahmed et Koob 1998).

Enfin, et toujours en fonction de la vulnérabilité personnelle, le palier de l'abus pourrait être franchit pour tomber dans la dépendance. Cette dernière étape est caractérisée par

une perte de contrôle et une perte de la notion de plaisir, remplacée par une sensation de manque difficilement supportable pour le toxicomane. Seraient inclus dans cette catégorie les animaux répondant aux trois critères décrits dans le modèle animal sur lequel se base la théorie de la transition par étapes vers l'addiction (Deroche-Gamonet, Belin, et Piazza 2004). D'après ce modèle et d'autres études (Anthony, Warner, et Kessler 1994), l'état de dépendance aux psychostimulants serait atteint pour, en moyenne et selon les produits, 15% de la population consommatrice de départ.

Nous proposons que les transmissions noradrénergique et sérotoninergique sont à la base de cette dernière étape ([Figure 15](#)). Les vulnérabilités individuelles génétiques ou psychologiques induiraient l'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique observée chez les animaux sensibilisés à long terme (Tassin 2008) et maintenue en partie par l'altération persistante des rétro-contrôles inhibiteurs de ces deux systèmes.

Un des arguments qui encouragent l'idée d'une ascendance noradrénergique et sérotoninergique sur la dopamine est le fait que bloquer les récepteurs α_{1B} -adrénergiques et 5-HT_{2A} sérotoninergiques prévient complètement la sensibilisation comportementale à l'amphétamine, la cocaïne, la morphine, l'alcool et la nicotine, lorsque celle-ci est couplée à des inhibiteurs de monoamine oxydase (Salomon et al. 2006; Lanteri et al. 2008; Lanteri et al. 2009; Lanteri et al. 2013). Au vu du rôle de la transmission noradrénergique dans la vigilance et le contrôle du ratio signal/bruit dans les régions sensorielles (Sara 2009), il est possible d'imaginer que l'hyper-réactivité de ce système induirait une réponse exacerbée à des stimuli qui, en conditions normales, serait rapidement contrôlée. Ceci pourrait maintenir le toxicomane dans un état d'hyper-sensibilité permanente et favoriser la consommation de drogues.

Dans la majorité des cas, le passage de l'usage à l'abus par l'activation de la transmission dopaminergique est une étape importante pour atteindre le palier de la dépendance. Cependant dans certains cas, l'abus n'est pas indispensable. En effet, pour le crack, la forme fumée de la cocaïne, le mélange entre le potentiel toxicomanogène de la substance et la voie d'administration est si puissant que quelques prises suffisent, chez des individus vulnérables, pour induire une dépendance.

Une fois atteint le stade de dépendance et, bien que nous proposons un contrôle initialement noradrénergique et sérotoninergique, ces deux transmissions hyper-réactives vont stimuler le système dopaminergique et induire la libération de DA, avec tous les effets associés à cette libération.

3. Perspectives

Bien que ce travail ait permis d'obtenir un certain nombre de réponses aux questions que nous nous posions, il a aussi soulevé de nouvelles questions :

Etablir la différence entre autorécepteurs et hétérorécepteurs

Les quantifications dans les zones de projection des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques et les expériences locales (article n°4) constituent des arguments en faveur d'un effet spécifique de la désensibilisation des autorécepteurs ; néanmoins la majorité des injections étant systémiques, elles ne nous permettent pas de différencier parmi les auto ou les hétérorécepteurs.

Des injections intra-crâniennes d'agonistes et d'antagonistes des autorécepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} au niveau du LC et du RD avant chaque injection d'amphétamine permettraient de déterminer si les effets observés sur la sensibilisation à l'amphétamine (pour le système noradrénergique) ou à la morphine (pour le système sérotoninergique) sont spécifiques des autorécepteurs.

Pour les récepteurs 5-HT_{1A} et le système sérotoninergique, un outil particulièrement intéressant pourrait être utilisé. Il s'agit des souris KO conditionnel des autorécepteurs 5-HT_{1A}. En fonction de la souris générée, le niveau d'expression des autorécepteurs 5-HT_{1A} est élevé ou très faible (Richardson-Jones et al. 2010). Nous pourrions étudier la réponse à la sensibilisation induite par l'amphétamine chez les souris dont l'expression des autorécepteurs est très faible, tandis que le niveau des hétérorécepteurs ne serait pas modifié.

Définir des liens de causalité entre la désensibilisation des autorécepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} et l'hyper-réactivité noradrénergique et sérotoninergique.

Bien que le dysfonctionnement des rétrocontrôles inhibiteurs chez les animaux sensibilisés à l'amphétamine et au MDMA ait été démontré, le lien entre la désensibilisation de ces récepteurs et l'hyper-réactivité reste corrélatif.

Afin d'identifier ou non un lien de causalité entre ces deux éléments, nous proposons de sensibiliser les animaux à l'amphétamine avec le même protocole utilisé pour ce travail,

puis de sur-exprimer les récepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} au niveau du LC et du RD, respectivement, à l'aide d'injections locales de virus. Lors d'un test locomoteur en réponse à l'amphétamine, les animaux dont l'altération des autorécepteurs a été compensée par leur surexpression devrait répondre comme des animaux naïfs à l'amphétamine.

Déterminer si l'exposition répétée à l'amphétamine induit une plasticité synaptique au niveau du LC et du RD.

Comme nous l'avons détaillé précédemment, il est probable qu'au dysfonctionnement des autorécepteurs observé chez les animaux sensibilisés s'ajoute une plasticité synaptique glutamatergique. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions mesurer la LTP au niveau des synapses glutamatergiques en mesurant le rapport des récepteurs AMPA/ NMDA, caractéristique de la plasticité synaptique, dans le LC et du RD chez des animaux sensibilisés à l'amphétamine après un mois de sevrage.

Déterminer l'état de réactivité des systèmes noradrénergique et sérotoninergique dans les modèles présentant un «stade dépendant ».

Afin d'argumenter notre hypothèse selon laquelle la transition vers la dépendance serait acquise par la modification des systèmes noradrénergique et sérotoninergique, il serait intéressant de tester l'état d'activation de ces systèmes neuronaux chez les animaux qui sont le plus proche possible de cette définition dans les modèles animaux. Il s'agirait des animaux qui maintiennent l'auto-administration de cocaïne malgré l'indication de la non-disponibilité de la drogue, présentant un point de rupture important et qui persisteraient dans l'auto-administration de drogue malgré l'association de celle-ci avec une punition, soit les animaux répondant aux trois critères définis par Deroche-Gamonet et collaborateurs (Deroche-Gamonet, Belin, et Piazza 2004). Il serait intéressant également d'étudier le faible pourcentage (moins de 10%) de souris qui s'auto-administrent de la cocaïne malgré la présence d'une récompense alternative, comme le sucre (Ahmed 2010).

Pour tester ces systèmes, il s'agirait de mesurer la libération de NA et de 5-HT après une injection d'amphétamine et de PCA dans le CPF de ces souris mais aussi d'évaluer l'état de sensibilité des autorécepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A} sérotoninergiques en mesurant la diminution de libération de NA et de 5-HT induite par les agonistes respectifs.

Dans ce travail, nous avons décrit les modifications à long terme des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques induites par l'amphétamine et par le MDMA, dans des modèles de comportement murin. Cette approche intégrée présente le bénéfice d'être proche de la complexité cellulaire et moléculaire du vivant et l'inconvénient d'être incapable parfois de déterminer précisément les types de récepteurs et la localisation où leur activation est responsable de l'effet mesuré. Il est cependant manifeste qu'au sein du réseau monoaminergique les interactions sont très fortes. Le maintien de l'intégrité du réseau permet d'étudier la répercussion des effets des drogues sur les transmissions monoaminergiques.

Bien que les résultats obtenus ne soient valables que pour l'amphétamine et pour le MDMA, l'étude de la littérature permet de supposer un rôle des autorécepteurs α_{2A} -AR et 5-HT_{1A} dans la sensibilisation comportementale et neurochimique de la majorité des drogues, malgré leur hétérogénéité de mécanismes.

Après avoir discuté les résultats et avoir proposé quelques pistes pour approfondir ce travail, les quelques pages suivantes rassemblent un rappel de la problématique avec les résultats principaux et permettent de conclure ce travail.

Conclusion

Conclusion

L'exposition répétée aux drogues induit une hyper-réactivité des transmissions noradrénergique et sérotoninergique observée jusqu'à un mois après la dernière injection. Cette sensibilisation neurochimique, commune à toutes les drogues, est fortement corrélée à la sensibilisation comportementale.

Les objectifs de ce travail étaient d'identifier les mécanismes qui maintiennent à long terme cette hyper-réactivité.

Pour cela, nous avons principalement travaillé sur des animaux sensibilisés à l'amphétamine et avons commencé par définir les limites du maintien de la sensibilisation chez la souris, à la base de notre modèle. Nous avons ainsi montré que la réponse locomotrice pleinement potentialisée induite par l'amphétamine est observée un mois après la dernière injection et chute de 60% entre 2 et 4 mois de sevrage. De manière intéressante, une nouvelle exposition à l'amphétamine consécutive au jour test permet de retrouver une réponse pleinement potentialisée et ce quel que soit le temps de sevrage. Ce résultat suggère que dans nos conditions la sensibilisation à l'amphétamine est un bon modèle pour étudier les modifications persistantes jusqu'à un mois de sevrage. Nous voyons aussi que malgré une apparente perte de potentialisation locomotrice après des sevrages d'entre 2 et 4 mois, les souris restent vulnérables aux injections ultérieures d'amphétamine, puisqu'elles se re-sensibilisent deux fois plus facilement qu'à l'état naïf.

Puisque le blocage des autorécepteurs α_{2A} -adrénergiques ou 5-HT_{1A} sérotoninergiques induit une libération corticale de NA ou de 5-HT potentialisée en réponse à une injection d'agents libérateurs (amphétamine ou PCA) chez des souris naïves, nous nous sommes intéressés au fonctionnement des récepteurs α_{2A} et 5-HT_{1A}, responsables du rétrocontrôle noradrénergique et sérotoninergique, respectivement.

Chez les animaux sensibilisés, ces autorécepteurs sont désensibilisés, induisant ainsi une altération du rétrocontrôle inhibiteur de ces systèmes. En effet, les agonistes de ces récepteurs n'induisent plus de diminution de la libération corticale de NA et de 5-HT chez les animaux sensibilisés. La désensibilisation des autorécepteurs se maintient à long terme par une diminution d'expression des protéines G_{qi} au niveau du LC et du RD, ce qui induit,

pour le système sérotoninergique, la diminution du couplage fonctionnel entre le récepteur 5-HT_{1A} et les protéines G_{αi}.

L'altération persistante des rétrocontrôles noradrénergique et sérotoninergique par une désensibilisation des autorécepteurs α_{2A}-adrénergiques et 5-HT_{1A} a également été observée chez les animaux sensibilisés au MDMA.

La transmission noradrénergique a un rôle particulier dans la sensibilisation comportementale à l'amphétamine puisque, chez les animaux sensibilisés, l'activité basale des neurones noradrénergiques du LC est augmentée par rapport aux contrôles. De plus, la stimulation du rétrocontrôle inhibiteur par l'agoniste des récepteurs α_{2A}-adrénergiques avant les injections d'amphétamine bloque complètement la sensibilisation comportementale.

Ces résultats montrent que l'exposition répétée à l'amphétamine ou au MDMA induit des modifications à long terme des rétrocontrôles inhibiteurs des systèmes noradrénergique et sérotoninergique. En ce qui concerne l'amphétamine, modifier ce rétrocontrôle pendant les injections d'amphétamine peut significativement modifier le développement et l'expression de la sensibilisation comportementale, ce qui suggère que les récepteurs α_{2A}-adrénergiques pourraient être une cible indirecte de l'amphétamine.

Références

Références

Addolorato, Leggio, Ferrulli, Cardone, Bedogni, Caputo, Gasbarrini, et al. 2011. « Dose-Response Effect of Baclofen in Reducing Daily Alcohol Intake in Alcohol Dependence: Secondary Analysis of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *Alcohol and Alcoholism* 46 (3): 312–317.

Addolorato, Leggio, Ferrulli, Cardone, Vonghia, Mirijello, Abenavoli, et al. 2007. « Effectiveness and safety of baclofen for maintenance of alcohol abstinence in alcohol-dependent patients with liver cirrhosis: randomised, double-blind controlled study ». *The Lancet* 370 (9603): 1915–1922.

Adell, Carceller, et Artigas. 1993. « In Vivo Brain Dialysis Study of the Somatodendritic Release of Serotonin in the Raphe Nuclei of the Rat: Effects of 8-Hydroxy-2-(di-N-Propylamino)tetralin ». *Journal of Neurochemistry* 60 (5): 1673–1681.

Adell, Celada, Abellán, et Artigas. 2002. « Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei ». *Brain Research Reviews* 39 (2–3): 154–180.

Aghajanian, Foote, et Sheard. 1968. « Lysergic Acid Diethylamide: Sensitive Neuronal Units in the Midbrain Raphe ». *Science (New York, N.Y.)* 161 (3842): 706–708.

Aghajanian, et VanderMaelen. 1982. « Alpha 2-Adrenoceptor-Mediated Hyperpolarization of Locus Coeruleus Neurons: Intracellular Studies in Vivo ». *Science (New York, N.Y.)* 215 (4538): 1394–1396.

Aghajanian, 1980. « Mescaline and LSD facilitate the activation of locus coeruleus neurons by peripheral stimuli ». *Brain Research* 186 (2): 492–498.

Aghajanian et Wang. 1977. « Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique ». *Brain Research* 122 (2): 229–242.

Ago, Nakamura, Uda, Kajii, Abe, Baba, et Matsuda. 2006. « Attenuation by the 5-HT_{1A} receptor agonist osetozotan of the behavioral effects of single and repeated methamphetamine in mice. » *Neuropharmacology* 51: 914–22.

Ahmed, et Koob. 1998. « Transition from Moderate to Excessive Drug Intake: Change in Hedonic Set Point ». *Science* 282 (5387): 298–300.

Ahmed, 2010. « Validation crisis in animal models of drug addiction: Beyond non-disordered drug use toward drug addiction ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35 (2): 172–184.

Akagi, et Powell, 1968. « Differential Projections of Habenular Nuclei ». *The Journal of Comparative Neurology* 132 (2): 263–274.

Albarrán-Juárez, Gilsbach, Piekorz, Pexa, Beetz, Schneider, Nürnberg, Birnbaumer, et Hein. 2009. « Modulation of alpha2-adrenoceptor functions by heterotrimeric Galphai protein isoforms. » *J Pharmacol Exp Ther* 331: 35–44.

Amaral, et Routtenberg. 1975. « Locus Coeruleus and Intracranial Self-Stimulation: A Cautionary Note ». *Behavioral Biology* 13 (3): 331–338.

Amargós-Bosch, Bortolozzi, Puig, Serrats, Adell, Celada, Toth, Mengod, et Artigas. 2004. « Co-Expression and In Vivo Interaction of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex ». *Cerebral Cortex* 14 (3): 281–299.

Ameisen, 2008. *Le dernier verre*. Impacts. Denoël.

American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and Statistical Manual of mental Disorders, 5th Edition (DSM-5).

Anderson, Pasquier, Forbes, et Morgane. 1977. « Locus Coeruleus-to-Dorsal Raphe Input Examined by Electrophysiological and Morphological Methods ». *Brain Research Bulletin* 2 (3): 209–221.

Andrade, Rodrigo, et George K. Aghajanian. 1984. « Intrinsic regulation of locus coeruleus neurons: electrophysiological evidence indicating a predominant role for autoinhibition ». *Brain Research* 310 (2): 401–406. doi:10.1016/0006-8993(84)90170-7.

ANSM. 2014. « Une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) est accordée pour le baclofène - Point d'information - ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». mars 2014.

Antelman, Eichler, Black, et Kocan. 1980. « Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization ». *Science (New York, N.Y.)* 207 (4428): 329–331.

Anthony, Warner, et Kessler. 1994. « Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Basic findings from the National Comorbidity Survey ». *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 2 (3): 244–268.

Arborelius, Chergui, Murase, Nomikos, Höök, Chouvet, Hacksell, et Svensson. 1993. « The 5-HT1A Receptor Selective Ligands, (R)-8-OH-DPAT and (S)-UH-301, Differentially Affect the Activity of Midbrain Dopamine Neurons ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 347 (4): 353–362.

Ase, Reader, Hen, Riad, et Descarries. 2001. « Regional Changes in Density of Serotonin Transporter in the Brain of 5-HT1A and 5-HT1B Knockout Mice, and of Serotonin Innervation in the 5-HT1B Knockout ». *Journal of Neurochemistry* 78 (3): 619–630.

Aso, Renoir, Mengod, Ledent, Hamon, Maldonado, Lanfumey, et Valverde. 2009. « Lack of CB1 Receptor Activity Impairs Serotonergic Negative Feedback ». *Journal of Neurochemistry* 109 (3): 935–944.

Aston-Jones, Ennis, Pieribone, Nickell, et Shipley. 1986a. « The Brain Nucleus Locus Coeruleus: Restricted Afferent Control of a Broad Efferent Network ». *Science (New York, N.Y.)* 234 (4777): 734–737.

Aston-Jones, Foote, et Bloom. 1982. « Low Doses of Ethanol Disrupt Sensory Responses of Brain Noradrenergic Neurons ». *Nature* 296 (5860): 857–860.

Aston-Jones, Akaoka, Charley, et Chouvet. 1991. « Serotonin Selectively Attenuates Glutamate-Evoked Activation of Noradrenergic Locus Coeruleus Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 11 (3): 760–769.

Aston-Jones, Ennis, Pieribone, Nickell, et Shipley. 1986b. « The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. » *Science* 234: 734-7.

Auclair, Cotecchia, Glowinski, et Tassin. 2002. « D-amphetamine fails to increase extracellular dopamine levels in mice lacking alpha 1b-adrenergic receptors: relationship between functional and nonfunctional dopamine release. » *J Neurosci* 22: 9150-4.

Auclair, Blanc, Glowinski, et Tassin. 2004. « Role of Serotonin 2A Receptors in the D-Amphetamine-Induced Release of Dopamine: Comparison with Previous Data on alpha1b-Adrenergic Receptors ». *Journal of Neurochemistry* 91 (2): 318-326.

Auclair, Cathala, Sarrazin, Depoortère, Piazza, Newman-Tancredi, et Spampinato. 2010. « The Central serotonin2B Receptor: A New Pharmacological Target to Modulate the Mesoaccumbens Dopaminergic Pathway Activity ». *Journal of Neurochemistry* 114 (5): 1323-1332.

Auclair, Cotecchia, Glowinski, et Tassin. 2002. « D-Amphetamine Fails to Increase Extracellular Dopamine Levels in Mice Lacking α 1b-Adrenergic Receptors: Relationship between Functional and Nonfunctional Dopamine Release ». *The Journal of Neuroscience* 22 (21): 9150-9154.

Auclair, Drouin, Cotecchia, Glowinski, et Tassin. 2004. « 5-HT_{2A} and α 1b-Adrenergic Receptors Entirely Mediate Dopamine Release, Locomotor Response and Behavioural Sensitization to Opiates and Psychostimulants ». *European Journal of Neuroscience* 20 (11): 3073-84.

Azmitia, Segal. 1978. « An Autoradiographic Analysis of the Differential Ascending Projections of the Dorsal and Median Raphe Nuclei in the Rat ». *The Journal of Comparative Neurology* 179 (3): 641-667.

Balland, Lüscher. 2009. « L'addiction: lorsque l'emballlement des mécanismes d'apprentissage conduit à la perte du libre arbitre ». *PSN* 7 (1): 35–42.

Balster, Schuster. 1973. « A Comparison of D-Amphetamine, L-Amphetamine, and Methamphetamine Self-Administration in Rhesus Monkeys ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 1 (1): 67–71.

Baraban, Wang, et Aghajanian. 1978. « Reserpine Suppression of Dorsal Raphe Neuronal Firing: Mediation by Adrenergic System ». *European Journal of Pharmacology* 52 (1): 27–36.

Baraban, et Aghajanian. 1981. « Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: Demonstration by electron microscopic autoradiography ». *Brain Research* 204 (1): 1–11.

Baraban, et Aghajanian. 1980a. « Suppression of serotonergic neuronal firing by alpha-adrenoceptor antagonists: evidence against GABA mediation. » *Eur J Pharmacol* 66: 287–94.

- Baraban et Aghajanian. 1980b. « Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. » *Neuropharmacology* 19: 355–63.
- Bardo, et Bevins. 2000. « Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? » *Psychopharmacology (Berl)* 153: 31–43.
- Baudry, Mouillet-Richard, Schneider, Launay, et Kellermann. 2010. « miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. » *Science* 329: 1537–41.
- Baumann, Clark, et Rothman. 2008. « Locomotor stimulation produced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is correlated with dialysate levels of serotonin and dopamine in rat brain ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90 (2): 208–217.
- Beart, et McDonald. 1982. « 5-Hydroxytryptamine and 5-Hydroxytryptaminergic-Dopaminergic Interactions in the Ventral Tegmental Area of Rat Brain ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 34 (9): 591–593.
- Berendse, Galis-De Graaf, et Groenewegen. 1992. « Topographical Organization and Relationship with Ventral Striatal Compartments of Prefrontal Corticostriatal Projections in the Rat ». *The Journal of Comparative Neurology* 316 (3): 314–47.
- Berlin, Grange, Jacob, et Tanguy. 2014. « Nicotine Patches in Pregnant Smokers: Randomised, Placebo Controlled, Multicentre Trial of Efficacy ». *BMJ* 348 (mar11 2): g1622–g1622.
- Berridge, Stratford, Foote, et Kelley. 1997. « Distribution of Dopamine Beta-Hydroxylase-like Immunoreactive Fibers within the Shell Subregion of the Nucleus Accumbens ». *Synapse (New York, N.Y.)* 27 (3): 230–241.
- Berridge, Waterhouse. 2003. « The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. » *Brain Res Brain Res Rev* 42: 33–84.
- Bertin, Freissmuth, Breyer, Schütz, Strosberg, et Marullo. 1992. « Functional Expression of the Human Serotonin 5-HT_{1A} Receptor in Escherichia Coli. Ligand Binding Properties and Interaction with Recombinant G Protein Alpha-Subunits. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (12): 8200–8206.
- Bertler, Rosengren. 1959. « Occurrence and Distribution of Catechol Amines in Brain ». *Acta Physiologica Scandinavica* 47 (décembre): 350–361.
- Bevilacqua, Doly, Kaprio, Yuan, Tikkanen, Paunio, Zhou, et al. 2010. « A Population-Specific HTR2B Stop Codon Predisposes to Severe Impulsivity ». *Nature* 468 (7327): 1061–1066.
- Bishop, Cullinan, Curran, et Gutstein. 2002. « Abused Drugs Modulate RGS4 mRNA Levels in Rat Brain: Comparison Between Acute Drug Treatment and a Drug Challenge after Chronic Treatment ». *Neurobiology of Disease* 10 (3): 334–343.
- Bjorvatn, Fornal, Martín, Metzler, et Jacobs. 1998. « The 5-HT_{1A} receptor antagonist p-MPPI blocks 5-HT_{1A} autoreceptors and increases dorsal raphe unit activity in awake cats ».

European Journal of Pharmacology 356 (2–3): 167–178.

Blanc, Trovero, Vezina, Hervé, Godeheu, Glowinski, et Tassin. 1994. « Blockade of prefronto-cortical alpha 1-adrenergic receptors prevents locomotor hyperactivity induced by subcortical D-amphetamine injection ». *The European Journal of Neuroscience* 6 (3): 293–298.

Blier, P. 2003. « The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. » *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 57–66.

Bobker, Williams. 1989. « Serotonin Agonists Inhibit Synaptic Potentials in the Rat Locus Coeruleus in Vitro via 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} Receptors. » *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 250 (1): 37–43.

Bockaert, Claeysen, Compan, et Dumuis. 2011. « 5-HT₄ receptors, a place in the sun: act two ». *Current Opinion in Pharmacology* 11 (1): 87–93.

Boileau, Dagher, Leyton, et al. 2006. « Modeling sensitization to stimulants in humans: An [¹¹C]raclopride/positron emission tomography study in healthy men ». *Archives of General Psychiatry* 63 (12): 1386–1395.

Bonate, Swann, et Silverman. 1997. « Context-Dependent Cross-Sensitization between Cocaine and Amphetamine ». *Life Sciences* 60 (1): PL1–7.

Bonhomme, De Deurwaèrdere, Le Moal, et Spampinato. 1995. « Evidence for 5-HT₄ receptor subtype involvement in the enhancement of striatal dopamine release induced by serotonin: a microdialysis study in the halothane-anesthetized rat ». *Neuropharmacology* 34 (3): 269–279.

Bönisch, et Brüsch. 2006. « The Norepinephrine Transporter in Physiology and Disease ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 175: 485–524.

Bonvento, Scatton, Claustre, et L Rouquier. 1992. « Effect of Local Injection of 8-OH-DPAT into the Dorsal or Median Raphe Nuclei on Extracellular Levels of Serotonin in Serotonergic Projection Areas in the Rat Brain ». *Neuroscience Letters* 137 (1): 101–104.

Bortolozzi, Amargós-Bosch, Toth, Artigas, et Adell. 2004. « In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT_{1A} receptor knockout mice. » *J Neurochem* 88: 1373–9.

Bosker, Klomp makers, et Westenberg. 1994. « Extracellular 5-Hydroxytryptamine in Median Raphe Nucleus of the Conscious Rat Is Decreased by Nanomolar Concentrations of 8-Hydroxy-2-(Di-N-Propylamino)tetralin and Is Sensitive to Tetrodotoxin ». *Journal of Neurochemistry* 63 (6): 2165–71.

Brandon, Irvin Vidrine, et Litvin. 2007. « Relapse and Relapse Prevention ». *Annual Review of Clinical Psychology* 3 (1): 257–284.

Brodie et Bunney. 1996. « Serotonin Potentiates Dopamine Inhibition of Ventral Tegmental Area Neurons in Vitro ». *Journal of Neurophysiology* 76 (3): 2077–2082.

Brog, Salyapongse, Deutch, et Zahm. 1993. « The Patterns of Afferent Innervation of the Core and Shell in the “Accumbens” Part of the Rat Ventral Striatum: Immunohistochemical

Detection of Retrogradely Transported Fluoro-Gold ». *The Journal of Comparative Neurology* 338 (2): 255–278.

Brown, Amit, Levitan, Ogren, et Sutherland. 1977. « Noradrenergic Mediation of the Positive Reinforcing Properties of Ethanol: II. Extinction of Ethanol-Drinking Behavior in Laboratory Rats by Inhibition of Dopamine-Beta-Hydroxylase. Implications for Treatment Procedures in Human Alcoholics ». *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 230 (1): 76-82.

Brown, Amit, Sinyor, Rockman, et Ogren. 1978. « Suppression of Voluntary Ingestion of Morphine by Inhibition of Dopamine-Beta-Hydroxylase ». *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 232 (1): 102-110.

Bücheler, Hadamek, et Hein. 2002. « Two α 2-adrenergic receptor subtypes, α 2A and α 2C, inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice ». *Neuroscience* 109 (4): 819–826.

Bylund, 1992. « Subtypes of Alpha 1- and Alpha 2-Adrenergic Receptors. » *The FASEB Journal* 6 (3): 832–839.

Bylund, Eikenberg, Hieble, Langer, Lefkowitz, Minneman, Molinoff, Ruffolo, et Trendelenburg. 1994. « International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. » *Pharmacological Reviews* 46 (2): 121–136.

Carlsson, Arvid. 1959. « The Occurrence, Distribution and Physiological Role of Catecholamines in the Nervous System ». *Pharmacological Reviews* 11 (2): 490–493.

Cedarbaum, et Aghajanian. 1978. « Afferent Projections to the Rat Locus Coeruleus as Determined by a Retrograde Tracing Technique ». *The Journal of Comparative Neurology* 178 (1): 1–16.

Cedillo, Miranda. 2013. « Effects of Co-Administration of the GABAB Receptor Agonist Baclofen and a Positive Allosteric Modulator of the GABAB Receptor, CGP7930, on the Development and Expression of Amphetamine-Induced Locomotor Sensitization in Rats ». *Pharmacological Reports: PR* 65 (5): 1132-1143.

Celada, Puig, et Artigas. 2013. « Serotonin modulation of cortical neurons and networks ». *Frontiers in Integrative Neuroscience* 7: 25.

Celada, Puig, Casanovas, Guillazo, et Artigas. 2001. « Control of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons by the Medial Prefrontal Cortex: Involvement of Serotonin-1A, GABAA, and Glutamate Receptors ». *The Journal of Neuroscience* 21 (24): 9917–9929.

Charara, Smith, et Parent. 1996. « Glutamatergic Inputs from the Pedunculo-pontine Nucleus to Midbrain Dopaminergic Neurons in Primates: Phaseolus Vulgaris-Leucoagglutinin Anterograde Labeling Combined with Postembedding Glutamate and GABA Immunohistochemistry ». *The Journal of Comparative Neurology* 364 (2): 254–266.

Charléty, Aston-Jones, Akaoka, Buda, et Chouvet. 1991. « [Participation of 5-HT 1A receptors in the decrease by serotonin of activation of locus coeruleus neurons by glutamate] ». *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 312

(8): 421-426.

Charléty, Chergui, Akaoka, Saunier, Buda, Aston-Jones, et Chouvet. 1993. « Serotonin Differentially Modulates Responses Mediated by Specific Excitatory Amino Acid Receptors in the Rat Locus Coeruleus ». *The European Journal of Neuroscience* 5 (8): 1024–1028.

Chen, et Sara. 2007. « Locus coeruleus activation by foot shock or electrical stimulation inhibits amygdala neurons ». *Neuroscience* 144 (2): 472–481.

Chen, 2006. « Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (24): 9333–9338.

Chen, et Penington. 1996. « Differential effects of protein kinase C activation on 5-HT_{1A} receptor coupling to Ca²⁺ and K⁺ currents in rat serotonergic neurones. » *J Physiol* 496 (Pt 1): 129–37.

Chiang, et Aston-Jones. 1993. « A 5-hydroxytryptamine₂ agonist augments γ -aminobutyric acid and excitatory amino acid inputs to noradrenergic locus coeruleus neurons ». *Neuroscience* 54 (2): 409–420.

Clark, Weissbach, et Udenfriend. 1954. « 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase: Preparation and Properties ». *Journal of Biological Chemistry* 210 (1): 139–148.

Colby, Whisler, Steffen, Nestler, et Self. 2003. « Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine ». *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (6): 2488–2493.

Corvol, Valjent, Pascoli, Robin, Stipanovich, Luedtke, Belluscio, Girault, et Hervé. 2006. « Quantitative Changes in G α olf Protein Levels, but Not D1 Receptor, Alter Specifically Acute Responses to Psychostimulants ». *Neuropsychopharmacology* 32 (5): 1109–1121.

Crespi, Mennini, et Gobbi. 1997. « Carrier-Dependent and Ca²⁺-Dependent 5-HT and Dopamine Release Induced by (+)-Amphetamine, 3,4-Methylenedioxy-Methamphetamine, P-Chloroamphetamine and (+)-Fenfluramine ». *British Journal of Pharmacology* 121 (8): 1735–43.

Crow, Spear, et Arbuthnott. 1972. « Intracranial self-stimulation with electrodes in the region of the locus coeruleus ». *Brain Research* 36 (2): 275–287.

Cruz, Ivanova, Lunn, Stoffel, Slesinger, et Lüscher. 2004. « Bi-Directional Effects of GABAB Receptor Agonists on the Mesolimbic Dopamine System ». *Nature Neuroscience* 7 (2): 153-159.

Cunningham, Paris, et Goeders. 1992. « Chronic cocaine enhances serotonin autoregulation and serotonin uptake binding. » *Synapse* 11: 112–23.

Dahlström et Fuxe. 1964. « Localization of Monoamines in the Lower Brain Stem ». *Experientia* 20 (7): 398-399.

Darracq, Blanc, Glowinski, et Tassin. 1998. « Importance of the noradrenaline-dopamine coupling in the locomotor activating effects of D-amphetamine. » *J Neurosci* 18: 2729–39.

Day, Greenwood, Hammack, Watkins, Fleshner, Maier, et Campeau. 2004. « Differential Expression of 5HT-1A, α 1b Adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 Receptor mRNA in Serotonergic, Γ -Aminobutyric Acidergic, and Catecholaminergic Cells of the Rat Dorsal Raphe Nucleus ». *The Journal of Comparative Neurology* 474 (3): 364-78.

De Deurwaerdère, Bonhomme, Lucas, Le Moal, et Spampinato. 1996. « Serotonin Enhances Striatal Dopamine Outflow In Vivo Through Dopamine Uptake Sites ». *Journal of Neurochemistry* 66 (1): 210-15.

De Deurwaerdère, Spampinato. 1999. « Role of Serotonin2A and Serotonin2B/2C Receptor Subtypes in the Control of Accumbal and Striatal Dopamine Release Elicited In Vivo by Dorsal Raphe Nucleus Electrical Stimulation ». *Journal of Neurochemistry* 73 (3): 1033-42.

Delfs, Zhu, Druhan, et Aston-Jones. 1998. « Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat ». *Brain Research* 806 (2): 127-140.

Deroche, Marinelli, Maccari, Le Moal, Simon, et Piazza. 1995. « Stress-Induced Sensitization and Glucocorticoids. I. Sensitization of Dopamine-Dependent Locomotor Effects of Amphetamine and Morphine Depends on Stress-Induced Corticosterone Secretion ». *The Journal of Neuroscience* 15 (11): 7181-7188.

Deroche-Gamonet, Belin, et Piazza. 2004. « Evidence for addiction-like behavior in the rat. » *Science* 305: 1014-7.

De Deurwaerdère, Stinus, et Spampinato. 1998. « Opposite Change of In Vivo Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens and Striatum That Follows Electrical Stimulation of Dorsal Raphe Nucleus: Role of 5-HT3 Receptors ». *The Journal of Neuroscience* 18 (16): 6528-6538.

Di Chiara, et Imperato. 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: 5274-8.

Di Ciano, P Blaha, et Phillips. 2001. « Changes in dopamine efflux associated with extinction, CS-induced and d-amphetamine-induced reinstatement of drug-seeking behavior by rats ». *Behavioural Brain Research* 120 (2): 147-158.

Di Giovanni, De Deurwaerdère, Di Mascio, Di Matteo, Esposito, et Spampinato. 1999. « Selective blockade of serotonin-2C/2B receptors enhances mesolimbic and mesostriatal dopaminergic function: a combined in vivo electrophysiological and microdialysis study ». *Neuroscience* 91 (2): 587-597.

Di Marzo, Vial, Sokoloff, Schwartz, et Piomelli. 1993. « Selection of Alternative G-Mediated Signaling Pathways at the Dopamine D2 Receptor by Protein Kinase C ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (11): 4846-4853.

Diaz, Doly, Narboux-Nême, Fernández, Mazot, Banas, Boutourlinsky, et al. 2012. « 5-HT2B Receptors Are Required for Serotonin-Selective Antidepressant Actions ». *Molecular Psychiatry* 17 (2): 154-163.

Dickinson, Gadie, et Tulloch. 1988. « α 1- and α 2-Adrenoreceptor Antagonists Differentially

Influence Locomotor and Stereotyped Behaviour Induced Byd-Amphetamine and Apomorphine in the Rat ». *Psychopharmacology* 96 (4): 521–527.

Dixon, Halbout, King, et Stephens. 2014. « Deletion of the GABAA α 2-Subunit Does Not Alter Self Administration of Cocaine or Reinstatement of Cocaine Seeking ». *Psychopharmacology*, 1–9.

Dixon, Morris, Breen, Desrivieres, Jugurnauth, Steiner, Vallada, et al. 2010. « Cocaine Effects on Mouse Incentive-Learning and Human Addiction Are Linked to α 2 Subunit-Containing GABAA Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (5): 2289–2294.

Docherty, 1998. « Subtypes of functional α 1- and α 2-adrenoceptors ». *European Journal of Pharmacology* 361 (1): 1–15.

Doherty, et Pickel. 2000. « Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area ». *Brain Research* 864 (2): 176–185.

Doly, Bertran-Gonzalez, Callebert, Bruneau, Banas, Belmer, Boutourlinsky, Hervé, Launay, et Maroteaux. 2009. « Role of Serotonin via 5-HT2B Receptors in the Reinforcing Effects of MDMA in Mice ». *PLoS ONE* 4 (11): e7952.

Doly, Valjent, Setola, Callebert, Hervé, Launay, et Maroteaux. 2008. « Serotonin 5-HT2B Receptors Are Required for 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Hyperlocomotion and 5-HT Release In Vivo and In Vitro ». *The Journal of Neuroscience* 28 (11): 2933–2940.

Dong, Green, Saal, Marie, Neve, Nestler, et Malenka. 2006. « CREB Modulates Excitability of Nucleus Accumbens Neurons ». *Nature Neuroscience* 9 (4): 475–477.

Dostert, Strolin Benedetti, et Tipton. 1989. « Interactions of Monoamine Oxidase with Substrates and Inhibitors ». *Medicinal Research Reviews* 9 (1): 45–89.

Doucet, Bobadilla, Houades, Lanteri, Godeheu, Lanfumey, Sara, et Tassin. 2013. « Sustained Impairment of α 2A-Adrenergic Autoreceptor Signaling Mediates Neurochemical and Behavioral Sensitization to Amphetamine ». *Biological Psychiatry* 74 (2): 90–98.

Douglas, Chan, Gelernter, Arias, Anton, Weiss, Brady, Poling, Farrer, et Kranzler. 2010. « Adverse childhood events as risk factors for substance dependence: Partial mediation by mood and anxiety disorders ». *Addictive Behaviors* 35 (1): 7–13.

Dresse, 1966. « Importance du système mesencephalo-telencephalique noradrenergique comme substratum anatomique du comportement d'autostimulation ». *Life Sciences* 5 (11): 1003–1014.

Drolet, Van Bockstaele, et Aston-Jones. 1992. « Robust Enkephalin Innervation of the Locus Coeruleus from the Rostral Medulla ». *The Journal of Neuroscience* 12 (8): 3162–3174.

Drouin, Blanc, Trovero, Glowinski, et Tassin. 2001. « Cortical [alpha]1-adrenergic regulation of acute and sensitized morphine locomotor effects. [Miscellaneous Article] ». *Neuroreport November 16, 2001* 12 (16): 3483–3486.

Drouin, Blanc, Villégier, Glowinski, et Tassin. 2002. « Critical Role of α 1-Adrenergic Receptors in Acute and Sensitized Locomotor Effects of D-Amphetamine, Cocaine, and GBR 12783: Influence of Preexposure Conditions and Pharmacological Characteristics ». *Synapse* 43 (1): 51–61.

Drouin, Darracq, Trovero, Blanc, Glowinski, Cotecchia, et Tassin. 2002. « Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. » *J Neurosci* 22: 2873–84.

Elsworth, Morrow, Nguyen, Mitra, Picciotto, et Roth. 2007. « Prenatal cocaine exposure enhances responsivity of locus coeruleus norepinephrine neurons: role of autoreceptors. » *Neuroscience* 147: 419–27.

Ennis, et Aston-Jones. 1988. « Activation of Locus Coeruleus from Nucleus Paragigantocellularis: A New Excitatory Amino Acid Pathway in Brain ». *The Journal of Neuroscience* 8 (10): 3644–3657.

Ennis et Aston-Jones. 1989. « Potent inhibitory input to locus coeruleus from the nucleus prepositus hypoglossi ». *Brain Research Bulletin* 22 (5): 793–803.

Erb, Hitchcott, Rajabi, Mueller, Shaham, et Stewart. 2000. « Alpha-2 adrenergic receptor agonists block stress-induced reinstatement of cocaine seeking. » *Neuropsychopharmacology* 23: 138–50.

Ettenberg, Pettit, Bloom, et Koob. 1982. « Heroin and Cocaine Intravenous Self-Administration in Rats: Mediation by Separate Neural Systems ». *Psychopharmacology* 78 (3): 204–209.

Eustache, Viader, et Lechevalier. 2008. *Traité de neuropsychologie clinique*. Neurosciences et cognition. De Boeck Supérieur.

Everitt, et Wolf. 2002. « Psychomotor Stimulant Addiction: A Neural Systems Perspective ». *The Journal of Neuroscience* 22 (9): 3312–3320.

Evrard, Laporte, Chastanet, Hen, Hamon, et Adrien. 1999. « 5-HT1A and 5-HT1B receptors control the firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the mouse: studies in 5-HT1B knock-out mice. » *Eur J Neurosci* 11: 3823–31.

Expertise collective de l'Inserm. 2008. « Jeux de hasard et d'argent, contextes et addictions ». Les éditions Inserm. Inserm.

Faleiro, Jones, et Kauer. 2004. « Rapid Synaptic Plasticity of Glutamatergic Synapses on Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area in Response to Acute Amphetamine Injection ». *Neuropsychopharmacology* 29 (12): 2115–2125.

Fallon, et Moore. 1978. « Catecholamine Innervation of the Basal Forebrain. IV. Topography of the Dopamine Projection to the Basal Forebrain and Neostriatum ». *The Journal of Comparative Neurology* 180 (3): 545–580.

Fattore, Spano, Cossu, Scherma, Fratta, et Fadda. 2009. « Baclofen prevents drug-induced

- reinstatement of extinguished nicotine-seeking behaviour and nicotine place preference in rodents ». *European Neuropsychopharmacology* 19 (7): 487-498.
- Fibiger, et Phillips. 1974. « Role of dopamine and norepinephrine in the chemistry of reward ». *Journal of Psychiatric Research* 11: 135-143.
- Filip, Frankowska, et Przegaliński. 2007. « Effects of GABAB receptor antagonist, agonists and allosteric positive modulator on the cocaine-induced self-administration and drug discrimination ». *European Journal of Pharmacology* 574 (2-3): 148-157.
- Fiorino, et Phillips. 1999. « Facilitation of Sexual Behavior in Male Rats Following D-Amphetamine-Induced Behavioral Sensitization ». *Psychopharmacology* 142 (2): 200-208.
- Foote, Bloom, et Aston-Jones. 1983. « Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. » *Physiol Rev* 63: 844-914.
- Fox, et Lowry. 2013. « Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior ». *Neuroendocrine Science* 7: 169.
- Frankowska, Nowak, et Filip. 2009. « Effects of GABAB Receptor Agonists on Cocaine Hyperlocomotor and Sensitizing Effects in Rats ». *Pharmacological Reports: PR* 61 (6): 1042-1049.
- Froger, Palazzo, Boni, Hanoun, Saurini, Joubert, Dutriez-Casteloot, et al. 2004. « Neurochemical and Behavioral Alterations in Glucocorticoid Receptor-Impaired Transgenic Mice after Chronic Mild Stress ». *The Journal of Neuroscience* 24 (11): 2787-2796.
- Gariano, et Groves. 1988. « Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices ». *Brain Research* 462 (1): 194-198.
- Garratt, Crespi, Mason, et Marsden. 1991. « Effects of Idazoxan on Dorsal Raphe 5-Hydroxytryptamine Neuronal Function ». *European Journal of Pharmacology* 193 (1): 87-93.
- Geyer, et Lee. 1984. « Effects of Clonidine, Piperoxane and Locus Coeruleus Lesion on the Serotonergic and Dopaminergic Systems in Raphe and Caudate Nucleus ». *Biochemical Pharmacology* 33 (21): 3399-3404.
- Giguère, Laroche, Oestreich, Duncan, et Siderovski. 2012. « Regulation of the Subcellular Localization of the G-Protein Subunit Regulator GPM3 through Direct Association with 14-3-3 Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (37): 31270-31279.
- Gipson, Kupchik, et Kalivas. 2013. « Rapid, transient synaptic plasticity in addiction ». *Neuropharmacology*.
- Gipson, Kupchik, Shen, Reissner, Thomas, et Kalivas. 2013. « Relapse Induced by Cues Predicting Cocaine Depends on Rapid, Transient Synaptic Potentiation ». *Neuron* 77 (5): 867-872.
- Glowinski, Baldessarini. 1966. « Metabolism of Norepinephrine in the Central Nervous

System ». *Pharmacological Reviews* 18 (4): 1201–1238.

Gobert, illiras, Cistarelli, et Millan. 2004. « Quantification and pharmacological characterization of dialysate levels of noradrenaline in the striatum of freely-moving rats: release from adrenergic terminals and modulation by α 2-autoreceptors ». *Journal of Neuroscience Methods* 140 (1–2): 141–152.

Gold, Koob. 1989. « MDMA Produces Stimulant-like Conditioned Locomotor Activity ». *Psychopharmacology* 99 (3): 352–356.

Gold, Redmond, et Kleber. 1978. « Clonidine blocks acute opiate-withdrawal symptoms. » *Lancet* 2: 599–602.

Goldman, Oroszi, et Ducci. 2005. « The Genetics of Addictions: Uncovering the Genes ». *Nature Reviews Genetics* 6 (7): 521–532.

Gorea, Davenne, Lanfumey, Chastanet, et Adrien. 1991. « Regulation of Noradrenergic Coerulean Neuronal Firing Mediated by 5-HT₂ Receptors: Involvement of the Prepositus Hypoglossal Nucleus ». *Neuropharmacology* 30 (12A): 1309–1318.

Grana, Popova et Ling. 2014. « A longitudinal analysis of electronic cigarette use and smoking cessation ». *JAMA Internal Medicine*, mars.

Granado, O’Shea, Bove, Vila, Colado, et Moratalla. 2008. « Persistent MDMA-Induced Dopaminergic Neurotoxicity in the Striatum and Substantia Nigra of Mice ». *Journal of Neurochemistry* 107 (4): 1102–1112.

Granneman, 2001. « The Putative β 4-Adrenergic Receptor Is a Novel State of the β 1-Adrenergic Receptor ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 280 (2): E199–E202.

Graybiel, Moratalla, et Robertson. 1990. « Amphetamine and Cocaine Induce Drug-Specific Activation of the c-Fos Gene in Striosome-Matrix Compartments and Limbic Subdivisions of the Striatum ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (17): 6912–6916.

Greenwell, Walker, Cottone, Zorrilla, et Koob. 2009. « The α 1 adrenergic receptor antagonist prazosin reduces heroin self-administration in rats with extended access to heroin administration ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 91 (3): 295–302.

Grenhoff, Nisell, Ferré, Aston-Jones, et Svensson. 1993. « Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. » *J Neural Transm Gen Sect* 93: 11–25.

Grenhoff, et Svensson. 1993. « Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. » *Eur J Pharmacol* 233: 79–84.

Griffiths, Littleton, Oritz, et Brownlee. 1973. « Evidence of a Role for Brain Monoamines in Ethanol Dependence. » *British Journal of Pharmacology* 48 (2): 354P.

Haddjeri, Blier, et de Montigny. 1996. « Effect of the Alpha-2 Adrenoceptor Antagonist Mirtazapine on the 5-Hydroxytryptamine System in the Rat Brain. » *Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics 277 (2): 861–871.

Hajek, Stead, West, Jarvis, Hartmann-Boyce, et Lancaster. 2013. « Relapse Prevention Interventions for Smoking Cessation ». In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, édité par The Cochrane Collaboration. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Hajós, Richards, Székely, et Sharp. 1998. « An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat ». *Neuroscience* 87 (1): 95–108.

Hajós, Richards, Székely, et Sharp. 1998. « An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. » *Neuroscience* 87: 95–108.

Hajós, Hajós-Korcsok, et Sharp. 1999. « Role of the Medial Prefrontal Cortex in 5-HT_{1A} Receptor-Induced Inhibition of 5-HT Neuronal Activity in the Rat ». *British Journal of Pharmacology* 126 (8): 1741–50.

Hamon, Lanfumey, el Mestikawy, Boni, Miquel, Bolaños, Schechter, et Gozlan. 1990. « The Main Features of Central 5-HT₁ Receptors ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 3 (5-6): 349-360.

Han, Renthal, Ring, Rahman, Psifogeorgou, Howland, Birnbaum, et al. 2010. « Brain Region Specific Actions of Regulator of G Protein Signaling 4 Oppose Morphine Reward and Dependence but Promote Analgesia ». *Biological Psychiatry* 67 (8): 761–769.

Harris, Wimmer, Byrne, et Aston-Jones. 2004. « Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine ». *Neuroscience* 129 (3): 841–847.

Heidenreich, Basse-Tomusk, et Rebec. 1987. « Serotonergic Dorsal Raphe Neurons: Subsensitivity to Amphetamine with Long-Term Treatment ». *Neuropharmacology* 26 (7A): 719–724.

Heimer, Zahm, Churchill, Kalivas, et Wohltmann. 1991. « Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat ». *Neuroscience* 41 (1): 89–125.

Hervé, Pickel, Joh, et Beaudet. 1987. « Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. » *Brain Res* 435: 71–83.

Herve, Blanc, Glowinski, et Tassin. 1982. « Reduction of dopamine utilization in the prefrontal cortex but not in the nucleus accumbens after selective destruction of noradrenergic fibers innervating the ventral tegmental area in the rat ». *Brain Research* 237 (2): 510–516.

Hervé-Minvielle, et Sara. 1995. « Rapid Habituation of Auditory Responses of Locus Coeruleus Cells in Anaesthetized and Awake Rats ». *Neuroreport* 6 (10): 1363–1368.

Heusner, et Palmiter. 2005. « Expression of mutant NMDA receptors in dopamine D1 receptor-containing cells prevents cocaine sensitization and decreases cocaine

preference. » *J Neurosci* 25: 6651–7.

Heyman, 2013. « Addiction and Choice: Theory and New Data ». *Frontiers in Psychiatry* 4.

Hiroi, Brown, Haile, Ye, Greenberg, et Nestler. 1997. « FosB mutant mice: Loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (19): 10397.

Hjorth, et Tao. 1991. « The Putative 5-HT_{1B} Receptor Agonist CP-93,129 Suppresses Rat Hippocampal 5-HT Release in Vivo: Comparison with RU 24969 ». *European Journal of Pharmacology* 209 (3): 249–252.

Hoyer, Hannon, et Martin. 2002. « Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71 (4): 533–554.

Huang, Lin, et Hsu. 2007. « Repeated Cocaine Administration Promotes Long-Term Potentiation Induction in Rat Medial Prefrontal Cortex ». *Cerebral Cortex* 17 (8): 1877–1888.

Huang, et Kandel. 2007. « 5-Hydroxytryptamine Induces a Protein Kinase A/Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated and Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase of Long-Term Potentiation in the Amygdala ». *The Journal of Neuroscience* 27 (12): 3111–3119.

Huotari, Gogos, Karayiorgou, Koponen, Forsberg, Raasmaja, Hyttinen, et Männistö. 2002. « Brain Catecholamine Metabolism in Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Deficient Mice ». *European Journal of Neuroscience* 15 (2): 246–56. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01856.x.

Hutson, Sarna, O'Connell, et Curzon. 1989. « Hippocampal 5-HT Synthesis and Release in Vivo Is Decreased by Infusion of 8-OHDPAT into the Nucleus Raphe Dorsalis ». *Neuroscience Letters* 100 (1-3): 276–280.

Jakab, et Goldman-Rakic. 2000. « Segregation of Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₃ Receptors in Inhibitory Circuits of the Primate Cerebral Cortex ». *The Journal of Comparative Neurology* 417 (3): 337–348.

Jalabert, Aston-Jones, Herzog, Manzoni, et Georges. 2009. « Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the control of ventral tegmental area dopamine neurons ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33 (8): 1336–1346.

Jedema, Gold, Gonzalez-Burgos, Sved, Tobe, Wensel, et Grace. 2008. « Chronic cold exposure increases RGS7 expression and decreases alpha(2)-autoreceptor-mediated inhibition of noradrenergic locus coeruleus neurons. » *Eur J Neurosci* 27: 2433–43.

Jedema, et Grace. 2003. « Chronic exposure to cold stress alters electrophysiological properties of locus coeruleus neurons recorded in vitro. » *Neuropsychopharmacology* 28: 63–72.

Jentsch, David, Ashenurst, Cervantes, Groman, James, et Pennington. 2014. « Dissecting

Impulsivity and Its Relationships to Drug Addictions ». *Annals of the New York Academy of Sciences*, mars

Jodo, Chiang, et Aston-Jones. 1998. « Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. » *Neuroscience* 83: 63-79.

Johnson, Gartside, et Ingram. 2002. « 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition does not function at physiological firing rates: evidence from in vitro electrophysiological studies in the rat dorsal raphe nucleus ». *Neuropharmacology* 43 (6): 959-965.

Johnson, et North. 1992. « Two Types of Neurone in the Rat Ventral Tegmental Area and Their Synaptic Inputs. » *The Journal of Physiology* 450 (1): 455-468.

Jolas, et Aghajanian. 1997. « Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro ». *Brain Research* 755 (2): 229-245.

Jones, Halaris, McIlhany, et Moore. 1977. « Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. axonal transport in central noradrenaline neurons ». *Brain Research* 127 (1): 1-21.

Joyce, et Iversen. 1984. « Dissociable Effects of 6-OHDA-Induced Lesions of Neostriatum on Anorexia, Locomotor Activity and Stereotypy: The Role of Behavioural Competition ». *Psychopharmacology* 83 (4): 363-366.

Juhila, Honkanen, Sallinen, Haapalinna, Korpi, et Scheinin. 2005. « alpha(2A)-Adrenoceptors regulate d-amphetamine-induced hyperactivity and behavioural sensitization in mice. » *Eur J Pharmacol* 517: 74-83.

Juhila, Haapalinna, Sirviö, Sallinen, Honkanen, Korpi, et Scheinin. 2003. « The alpha₂-adrenoceptor antagonist atipamezole reduces the development and expression of d-amphetamine-induced behavioural sensitization. » *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367: 274-80.

Kalén, Skagerberg, et Lindvall. 1988. « Projections from the Ventral Tegmental Area and Mesencephalic Raphe to the Dorsal Raphe Nucleus in the Rat. Evidence for a Minor Dopaminergic Component ». *Experimental Brain Research* 73 (1): 69-77.

Kalivas, et Stewart. 1991. « Dopamine Transmission in the Initiation and Expression of Drug- and Stress-Induced Sensitization of Motor Activity ». *Brain Research. Brain Research Reviews* 16 (3): 223-244.

Kalivas, P. W., et J. E. Alesdatter. 1993. « Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor stimulation in the ventral tegmental area and amygdala in behavioral sensitization to cocaine. » *J Pharmacol Exp Ther* 267: 486-95.

Kalivas, 1993. « Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area ». *Brain Research Reviews* 18 (1): 75-113.

Kankaanpää, Meririnne, Pällsunde, et Seppälä. 1998. « The Acute Effects of Amphetamine Derivatives on Extracellular Serotonin and Dopamine Levels in Rat Nucleus Accumbens ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59 (4): 1003-1009.

Karler, Calder, Chaudhry, et Turkanis. 1989. « Blockade of “Reverse Tolerance” to Cocaine and Amphetamine by MK-801 ». *Life Sciences* 45 (7): 599–606.

Katoh. 1982. « [Fine structure of the locus coeruleus in the mouse (author’s transl)] ». *No To Shinkei* 34: 217–27.

Kawahara, Kawahara, et Westerink. 1999. « Tonic regulation of the activity of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of the conscious rat studied by dual-probe microdialysis ». *Brain Research* 823 (1–2): 42–48.

Keläi, Renoir, Chouchana, Saurini, Hanoun, Hamon, et Lanfumey. 2008. « Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. » *J Neurochem* 107: 1660–70.

Kelly, et Iversen. 1976. « Selective 6OHDA-Induced Destruction of Mesolimbic Dopamine Neurons: Abolition of Psychostimulant-Induced Locomotor Activity in Rats ». *European Journal of Pharmacology* 40 (1): 45–56.

Kelly, Seviour, et Iversen. 1975. « Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum ». *Brain Research* 94 (3): 507–522.

Kelz, Chen, Carlezon, Whisler, Gilden, Beckmann, Steffen, et al. 1999. « Expression of the Transcription Factor Δ FosB in the Brain Controls Sensitivity to Cocaine ». *Nature* 401 (6750): 272–276.

Khachaturian, et Watson. 1982. « Some perspectives on monoamine-opioid peptide interaction in rat central nervous system ». *Brain Research Bulletin* 9 (1–6): 441–462.

Kia, Brisorgueil, Hamon, Calas, et Vergé. 1996. « Ultrastructural Localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} Receptors in the Rat Brain ». *Journal of Neuroscience Research* 46 (6): 697–708.

Kiianmaa, Andersson, et Fuxe. 1979. « On the Role of Ascending Dopamine Systems in the Control of Voluntary Ethanol Intake and Ethanol Intoxication ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 10 (4): 603–608.

Kilty, Lorang, et Amara. 1991. « Cloning and Expression of a Cocaine-Sensitive Rat Dopamine Transporter ». *Science (New York, N.Y.)* 254 (5031): 578–579.

Kim, Lee, Lee, et Waterhouse. 2004. « Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. » *Brain Res* 1026: 56–67.

Kirby, Freeman-Daniels, Lemos, Nunan, Lamy, Akanwa, et Beck. 2008. « Corticotropin-Releasing Factor Increases GABA Synaptic Activity and Induces Inward Current in 5-Hydroxytryptamine Dorsal Raphe Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 28 (48): 12927–12937.

Kirby, Rice, et Valentino. 2000. « Effects of Corticotropin-Releasing Factor on Neuronal

Activity in the Serotonergic Dorsal Raphe Nucleus ». *Neuropsychopharmacology* 22 (2): 148–162.

Kita, Nakashima, Shirase, Asahina, et Kuroguchi. 1988. « Effects of Nicotine on Ambulatory Activity in Mice ». *The Japanese Journal of Pharmacology* 46 (2): 141–146.

Koob, et Bloom. 1988. « Cellular and Molecular Mechanisms of Drug Dependence ». *Science (New York, N.Y.)* 242 (4879): 715–723.

Koob, Le Moal. 2001. « Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. » *Neuropsychopharmacology* 24: 97–129.

Koyama, et Kayama. 1993. « Mutual interactions among cholinergic, noradrenergic and serotonergic neurons studied by ionophoresis of these transmitters in rat brainstem nuclei ». *Neuroscience* 55 (4): 1117–1126.

Kuroki, Meltzer, et Ichikawa. 2003. « 5-HT_{2A} receptor stimulation by DOI, a 5-HT_{2A/2C} receptor agonist, potentiates amphetamine-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens ». *Brain Research* 972 (1–2): 216–221.

Lanfumeey, Pardon, Laaris, Joubert, Hanoun, Hamon, et Cohen-Salmon. 1999. « 5-HT_{1A} Autoreceptor Desensitization by Chronic Ultramild Stress in Mice ». *Neuroreport* 10 (16): 3369–3374.

Lanteri, Hernández Vallejo, Salomon, Doucet, Godeheu, Torrens, Houades, et Tassin. 2009. « Inhibition of monoamine oxidases desensitizes 5-HT_{1A} autoreceptors and allows nicotine to induce a neurochemical and behavioral sensitization. » *J Neurosci* 29: 987–97.

Lanteri, Salomon, Torrens, Glowinski, et Tassin. 2008. « Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. » *Neuropsychopharmacology* 33: 1724–34.

Lanteri, Doucet, Hernández Vallejo, Godeheu, Bobadilla, Salomon, Lanfumeey, et Tassin. 2013. « Repeated Exposure to MDMA Triggers Long-Term Plasticity of Noradrenergic and Serotonergic Neurons ». *Molecular Psychiatry*, août.

Lategan, Marien, et Colpaert. 1992. « Suppression of Nigrostriatal and Mesolimbic Dopamine Release in Vivo Following Noradrenaline Depletion by DSP-4: A Microdialysis Study ». *Life Sciences* 50 (14): 995–999.

Launay, Schneider, Loric, Da Prada, et Kellermann. 2006. « Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT_{2B} receptor signaling in serotonergic neuronal cells. » *FASEB J* 20: 1843–54.

Le Moal, Stinus, Simon, Tassin, Thierry, Blanc, Glowinski, et Cardo. 1977. « Behavioral Effects of a Lesion in the Ventral Mesencephalic Tegmentum: Evidence for Involvement of A10 Dopaminergic Neurons ». *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 16: 237–245.

Leger, et Descarries. 1978. « Serotonin nerve terminals in the locus coeruleus of adult rat: A radioautographic study ». *Brain Research* 145 (1): 1–13.

- Lenoir, Serre, Cantin, et Ahmed. 2007. « Intense Sweetness Surpasses Cocaine Reward ». Édité par Bernhard Baune. *PLoS ONE* 2 (8): e698.
- Liang, Eason, Jewell-Motz, Williams, Theiss, Dorn, et Liggett. 1998. « Phosphorylation and functional desensitization of the alpha2A-adrenergic receptor by protein kinase C. » *Mol Pharmacol* 54: 44–9.
- Lindvall, Björklund. 1978. « Anatomy of the Dopaminergic Neuron Systems in the Rat Brain ». *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 19: 1–23.
- Liprando, Miner, Blakely, Lewis, et Sesack. 2004. « Ultrastructural Interactions between Terminals Expressing the Norepinephrine Transporter and Dopamine Neurons in the Rat and Monkey Ventral Tegmental Area ». *Synapse* 52 (4): 233–44.
- Liu, Pu, et Poo. 2005. « Repeated Cocaine Exposure in Vivo Facilitates LTP Induction in Midbrain Dopamine Neurons ». *Nature* 437 (7061): 1027–1031.
- Logan, Laverty, Sanderson, et Yee. 1988. « Differences between Rats and Mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) Neurotoxicity ». *European Journal of Pharmacology* 152 (3): 227–234.
- Loizou, 1969. « Projections of the nucleus locus coeruleus in the albino rat ». *Brain Research* 15 (2): 563–566.
- Loughlin, Foote, et Grzanna. 1986. « Efferent Projections of Nucleus Locus Coeruleus: Morphologic Subpopulations Have Different Efferent Targets ». *Neuroscience* 18 (2): 307–319.
- Loughlin, et Fallon. 1982. « Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: Cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally ». *Neuroscience Letters* 32 (1): 11–16.
- Lovenberg, Jequier, et Sjoerdsma. 1967. « Tryptophan Hydroxylation: Measurement in Pineal Gland, Brainstem, and Carcinoid Tumor ». *Science (New York, N.Y.)* 155 (3759): 217–219.
- Lu, Cheng, Kook Lim, Khoshnevisrad, et Poo. 2010. « Elevated BDNF after Cocaine Withdrawal Facilitates LTP in Medial Prefrontal Cortex by Suppressing GABA Inhibition ». *Neuron* 67 (5): 821–833.
- Lu, Simpson, Weaver, et Lin. 2012. « Differential Distribution Patterns From Medial Prefrontal Cortex and Dorsal Raphe to the Locus Coeruleus in Rats ». *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 295 (7): 1192–1201.
- Lüscher, Malenka. 2011. « Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling ». *Neuron* 69 (4): 650–663.
- Lutz, Pradhan, Goeldner, et Kieffer. 2011. « Sequential and opposing alterations of 5-HT(1A) receptor function during withdrawal from chronic morphine. » *Eur Neuropsychopharmacol* 21: 835–40.

- Lyness, Friedle, et Moore. 1979. « Destruction of Dopaminergic Nerve Terminals in Nucleus Accumbens: Effect on D-Amphetamine Self-Administration ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 11 (5): 553–556.
- Maeda, Mogenson. 1980. « An electrophysiological study of inputs to neurons of the ventral tegmental area from the nucleus accumbens and medial preoptic-anterior hypothalamic areas ». *Brain Research* 197 (2): 365–377.
- Magos, 1969. « Persistence of the effect of amphetamine on stereotyped activity in rats ». *European Journal of Pharmacology* 6 (2): 200–201.
- Malinow, Madison, et Tsien. 1988. « Persistent Protein Kinase Activity Underlying Long-Term Potentiation ». *Nature* 335 (6193): 820–824.
- Mameli, Bellone, Brown, et Lüscher. 2011. « Cocaine Inverts Rules for Synaptic Plasticity of Glutamate Transmission in the Ventral Tegmental Area ». *Nature Neuroscience* 14 (4): 414–416.
- Mamounas, Mullen, Hearn, et Molliver. 1991. « Dual Serotonergic Projections to Forebrain in the Rat: Morphologically Distinct 5-HT Axon Terminals Exhibit Differential Vulnerability to Neurotoxic Amphetamine Derivatives ». *The Journal of Comparative Neurology* 314 (3): 558–586.
- Mannoury la Cour, El Mestikawy, Hanoun, Hamon, et Lanfumey. 2006. « Regional Differences in the Coupling of 5-Hydroxytryptamine-1A Receptors to G Proteins in the Rat Brain ». *Molecular Pharmacology* 70 (3): 1013–1021.
- Marek, et Aghajanian. 1999. « 5-HT_{2A} receptor or α 1-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. » *Eur J Pharmacol* 367: 197–206.
- Marek, et Aghajanian. 1999. « 5-HT_{2A} receptor or α 1-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex ». *European Journal of Pharmacology* 367 (2–3): 197–206.
- Marks, Burch, et Collins. 1983. « Genetics of Nicotine Response in Four Inbred Strains of Mice. » *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 226 (1): 291–302.
- Mason, et Fibiger. 1979. « Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. » *J Comp Neurol* 187: 703–24.
- Maurel, De Vry, et Schreiber. 1999. « 5-HT receptor ligands differentially affect operant oral self-administration of ethanol in the rat ». *European Journal of Pharmacology* 370 (3): 217–223.
- Maze, Covington, Dietz, LaPlant, Renthall, Russo, Mechanic, et al. 2010. « Essential Role of the Histone Methyltransferase G9a in Cocaine-Induced Plasticity ». *Science* 327 (5962): 213–216.
- McGaugh, et Roozendaal. 2009. « Drug Enhancement of Memory Consolidation: Historical Perspective and Neurobiological Implications ». *Psychopharmacology* 202 (1-3): 3–14.

- McIsaac, et Page. 1959. « The Metabolism of Serotonin (5-Hydroxytryptamine) ». *Journal of Biological Chemistry* 234 (4): 858–864.
- McLeman, Warsh, Ang, Li, Kalasinsky, Ross, Tong, Schmunk, Adams, et SKish. 2000. « The human nucleus accumbens is highly susceptible to G protein down-regulation by methamphetamine and heroin. » *J Neurochem* 74: 2120–6.
- McMahon, Filip, et Cunningham. 2001. « Differential Regulation of the Mesoaccumbens Circuit by Serotonin 5-Hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors ». *The Journal of Neuroscience* 21 (19): 7781–7787.
- McRae-Degueurce, Léger, Wiklund, et Pujol. 1981. « Functional Recuperation of the Serotonergic Innervation in the Rat Locus Coeruleus ». *Journal de Physiologie* 77 (2-3): 389–392.
- McRae-Degueurce, Berod, Mermet, Keller, Chouvet, Joh, et Pujol. 1982. « Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat locus coeruleus: evidence for the involvement of serotonin afferents ». *Brain Research* 235 (2): 285–301.
- Meffert, Chang, Wiltgen, Fanselow, et Baltimore. 2003. « NF- κ B Functions in Synaptic Signaling and Behavior ». *Nature Neuroscience* 6 (10): 1072–1078.
- Michelsen, Schmitz, et Steinbusch. 2007. « The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression ». *Brain Research Reviews* 55 (2): 329–342.
- Millan, Dekeyne, et Gobert. 1998. « Serotonin (5-HT)_{2C} receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo. » *Neuropharmacology* 37: 953–5.
- Missale, Nash, Robinson, Jaber, et Caron. 1998. « Dopamine Receptors: From Structure to Function ». *Physiological Reviews* 78 (1): 189–225.
- Mohammed, Danysz, Ögren, et Archer. 1986. « Central noradrenaline depletion attenuates amphetamine-induced locomotor behavior ». *Neuroscience Letters* 64 (2): 139–144.
- Molliver, 1987. « Serotonergic Neuronal Systems: What Their Anatomic Organization Tells Us about Function ». *Journal of Clinical Psychopharmacology* 7 (6 Suppl): 3S–23S.
- Mongeau, Blier, et de Montigny. 1997. « The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments ». *Brain Research Reviews* 23 (3): 145–195.
- Morilak, Garlow, et Ciaranello. 1993. « Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin₂ receptors in the rat brain ». *Neuroscience* 54 (3): 701–717.
- Mosko, et Jacobs. 1974. « Midbrain raphe neurons: Spontaneous activity and response to light ». *Physiology & Behavior* 13 (4): 589–593.
- Moussawi, Pacchioni, Moran, Olive, Gass, Lavin, et PKalivas. 2009. « N-Acetylcysteine Reverses Cocaine-Induced Metaplasticity ». *Nature Neuroscience* 12 (2): 182–189.

- Murase, Grenhoff, Chouvet, Gonon, et Svensson. 1993. « Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo ». *Neuroscience Letters* 157 (1): 53–56.
- Murchison, Zhang, Zhang, Ouyang, Lee, et Thomas. 2004. « A Distinct Role for Norepinephrine in Memory Retrieval ». *Cell* 117 (1): 131–143.
- Murthy, Grider, et Makhlof. 2000. « Heterologous Desensitization of Response Mediated by Selective PKC-Dependent Phosphorylation of Gi-1 and Gi-2 ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 279 (4): C925–C934.
- Murugaiah, et O'Donnell. 1995. « Beta Adrenergic Receptors Facilitate Norepinephrine Release from Rat Hypothalamic and Hippocampal Slices ». *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 90 (2): 179–190.
- Nanopoulos, Belin, Maitre, Vincendon, et Pujol. 1982. « Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. possible existence of neurons containing serotonin and GABA ». *Brain Research* 232 (2): 375–389.
- Nestler, Terwilliger, Walker, Sevarino, et Duman. 1990. « Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain. » *J Neurochem* 55: 1079–82.
- Nestler, Alreja, et Aghajanian. 1994. « Molecular and cellular mechanisms of opiate action: studies in the rat locus coeruleus. » *Brain Res Bull* 35: 521–8.
- Nicholas, Pieribone, et Hökfelt. 1993. « Distributions of mRNAs for Alpha-2 Adrenergic Receptor Subtypes in Rat Brain: An in Situ Hybridization Study ». *The Journal of Comparative Neurology* 328 (4): 575–594.
- NIDA National Institute on Drugs Abuse. 2013. « Methamphetamine Abuse and Addiction - Research Report Series ».
- Nocjar, Christine, et Jaak Panksepp. 2007. « Prior morphine experience induces long-term increases in social interest and in appetitive behavior for natural reward ». *Behavioural Brain Research* 181 (2): 191–199.
- Nörenberg, Schöffel, Szabo, et Starke. 1997. « Subtype Determination of Soma-Dendritic alpha2-Autoreceptors in Slices of Rat Locus Coeruleus ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 356 (2): 159–165.
- Nurse, Russell, et Taljaard. 1988. « Characterization of the Effects of Serotonin on the Release of [3H]dopamine from Rat Nucleus Accumbens and Striatal Slices ». *Neurochemical Research* 13 (5): 403–407.
- O'Brien, Gardner. 2005. « Critical assessment of how to study addiction and its treatment: Human and non-human animal models ». *Pharmacology & Therapeutics* 108 (1): 18–58.
- O'Brien, 2008. « Review. Evidence-based treatments of addiction. » *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3277–86.

- O'Callaghan, et Miller. 1994. « Neurotoxicity Profiles of Substituted Amphetamines in the C57BL/6J Mouse. » *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270 (2): 741–751.
- O'Connor, Chapman, Butler, et Mead. 2011. « The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35 (3): 912–938.
- O'Hearn, et Molliver. 1984. « Organization of Raphe-Cortical Projections in Rat: A Quantitative Retrograde Study ». *Brain Research Bulletin* 13 (6): 709–726.
- Observatoire européen des drogues et des toxicomanies. 2013. « Rapport européen sur les drogues ».
- Olds, et Milner. 1954. « Positive Reinforcement Produced by Electrical Stimulation of Septal Area and Other Regions of Rat Brain ». *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 47 (6): 419–427.
- Ornstein, Milon, McRae-Degueurce, Alvarez, Berger, et Würzner. 1987. « Biochemical and Radioautographic Evidence for Dopaminergic Afferents of the Locus Coeruleus Originating in the Ventral Tegmental Area ». *Journal of Neural Transmission* 70 (3-4): 183–191.
- Overton, et Clark. 1997. « Burst firing in midbrain dopaminergic neurons ». *Brain Research Reviews* 25 (3): 312–334.
- Palchadhuri, et Flügge. 2005. « 5-HT_{1A} Receptor Expression in Pyramidal Neurons of Cortical and Limbic Brain Regions ». *Cell and Tissue Research* 321 (2): 159–172.
- Papay, Gaivin, Jha, Mccune, Mcgrath, Rodrigo, Simpson, Doze, et Perez. 2006. « Localization of the Mouse α 1A-Adrenergic Receptor (AR) in the Brain: α 1AAR Is Expressed in Neurons, GABAergic Interneurons, and NG2 Oligodendrocyte Progenitors ». *The Journal of Comparative Neurology* 497 (2): 209–22.
- Papay, Gaivin, McCune, Rorabaugh, Macklin, McGrath, et Perez. 2004. « Mouse α 1B-Adrenergic Receptor Is Expressed in Neurons and NG2 Oligodendrocytes ». *The Journal of Comparative Neurology* 478 (1): 1–10.
- Parks, Robinson, Sibille, Shenk, et M Toth. 1998. « Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10734–9.
- Paulson, Camp, et Robinson. 1991. « Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. » *Psychopharmacology (Berl)* 103: 480–92.
- Pazos, Cortés, et Palacios. 1985. « Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors ». *Brain Research* 346 (2): 231–249.
- Pehek, Nocjar, Roth, Byrd, et Mabrouk. 2005. « Evidence for the Preferential Involvement of 5-HT_{2A} Serotonin Receptors in Stress- and Drug-Induced Dopamine Release in the Rat Medial Prefrontal Cortex ». *Neuropsychopharmacology* 31 (2): 265–277.

- Perrotti, Weaver, Robison, Renthal, Maze, Yazdani, Elmore, et al. 2008. « Distinct patterns of Δ FosB induction in brain by drugs of abuse ». *Synapse* 62 (5): 358-369.
- Perry, et Carroll. 2008. « The Role of Impulsive Behavior in Drug Abuse ». *Psychopharmacology* 200 (1): 1-26.
- Pert, Kuhar, et Snyder. 1976. « Opiate Receptor: Autoradiographic Localization in Rat Brain. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (10): 3729.
- Petry, Stinson, et Grant. 2005. « Comorbidity of DSM-IV Pathological Gambling and Other Psychiatric Disorders: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions ». *The Journal of Clinical Psychiatry* 66 (5): 564-574.
- Peyron, Luppi, Fort, Rampon, et Jouvet. 1996. « Lower Brainstem Catecholamine Afferents to the Rat Dorsal Raphe Nucleus ». *The Journal of Comparative Neurology* 364 (3): 402-413.
- Peyron, Tighe, Van den Pol, L Lecea, Heller, Sutcliffe, et Kilduff. 1998. « Neurons Containing Hypocretin (Orexin) Project to Multiple Neuronal Systems ». *The Journal of Neuroscience* 18 (23): 9996-10015.
- Piazza, et Deroche-Gamonet. 2013. « A Multistep General Theory of Transition to Addiction ». *Psychopharmacology* 229 (3): 387-413.
- Piazza, et Le Moal. 1996. « Pathophysiological Basis of Vulnerability to Drug Abuse: Role of an Interaction Between Stress, Glucocorticoids, and Dopaminergic Neurons ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36 (1): 359-378.
- Pickel, Joh, Reis, Leeman, et Miller. 1979. « Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons ». *Brain Research* 160 (3): 387-400.
- Pickel, Tong et. 1977. « A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: Demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase ». *Brain Research* 131 (2): 197-214.
- Pierce, et Kalivas. 1995. « Amphetamine Produces Sensitized Increases in Locomotion and Extracellular Dopamine Preferentially in the Nucleus Accumbens Shell of Rats Administered Repeated Cocaine. » *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275 (2): 1019-1029.
- Pijnenburg, Honig, et Van Rossum. 1975. « Inhibition of D-Amphetamine-Induced Locomotor Activity by Injection of Haloperidol into the Nucleus Accumbens of the Rat ». *Psychopharmacologia* 41 (2): 87-95.
- Pompeiano, Palacios, et Mengod. 1994. « Distribution of the Serotonin 5-HT₂ Receptor Family mRNAs: Comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 23 (1-2): 163-178.
- Porras, Di Matteo, Fracasso, Lucas, De Deurwaerdère, Caccia, Esposito, et Spampinato. 2001. « 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C/2B} Receptor Subtypes Modulate Dopamine Release Induced in

Vivo by Amphetamine and Morphine in Both the Rat Nucleus Accumbens and Striatum ». ,
Published Online: 18 July 2001;

Price, Lucki. 2001. « Regulation of Serotonin Release in the Lateral Septum and Striatum by Corticotropin-Releasing Factor ». *The Journal of Neuroscience* 21 (8): 2833–2841.

Prisco, et Esposito. 1995. « Differential Effects of Acute and Chronic Fluoxetine Administration on the Spontaneous Activity of Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area. » *British Journal of Pharmacology* 116 (2): 1923.

Przegaliński, Siwanowicz, Baran, et Filip. 2000. « Activation of serotonin (5-HT)1A receptors inhibits amphetamine sensitization in mice. » *Life Sci* 66: 1011–9.

Przegalinski, Siwanowicz, Nowak, Papla, et Filip. 2001. « Role of 5-HT1B receptors in the sensitization to amphetamine in mice ». *European Journal of Pharmacology* 422 (1–3): 91–99.

Pudovkina, Cremers, et Westerink. 2003. « Regulation of the Release of Serotonin in the Dorsal Raphe Nucleus by α 1 and α 2 Adrenoceptors ». *Synapse* 50 (1): 77–82.

Puig, Artigas, et Celada. 2005. « Modulation of the Activity of Pyramidal Neurons in Rat Prefrontal Cortex by Raphe Stimulation In Vivo: Involvement of Serotonin and GABA ». *Cerebral Cortex* 15 (1): 1–14.

Rahman, Schwarz, Gold, Zachariou, Wein, Choi, Koo, et al. 2003. « RGS9 Modulates Dopamine Signaling in the Basal Ganglia ». *Neuron* 38 (6): 941–952.

Ramirez, et Wang. 1986a. « Locus coeruleus norepinephrine-containing neurons: effects produced by acute and subchronic treatment with antipsychotic drugs and amphetamine ». *Brain research* 362 (1): 165–170.

Ramirez, et Wang. 1986b. « Electrophysiological evidence for locus coeruleus norepinephrine autoreceptor subsensitivity following subchronic administration of D-amphetamine. » *Brain Res* 385: 415–9.

Ramos, et Arnsten. 2007. « Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. » *Pharmacol Ther* 113: 523–36.

Ramos, Goni-Allo, et Aguirre. 2005. « Administration of SCH 23390 into the Medial Prefrontal Cortex Blocks the Expression of MDMA-Induced Behavioral Sensitization in Rats: An Effect Mediated by 5-HT_{2C} Receptor Stimulation and not by D1 Receptor Blockade ». *Neuropsychopharmacology* 30 (12): 2180–2191.

Ramsey, Laakso, Cyr, Sotnikova, Salahpour, Medvedev, Dykstra, Gainetdinov, et Caron. 2008. « Genetic NMDA receptor deficiency disrupts acute and chronic effects of cocaine but not amphetamine. » *Neuropsychopharmacology* 33: 2701–14.

Rassnick, Stinus, et Koob. 1993. « The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat ». *Brain Research* 623 (1): 16–24.

- Reynaud, Parquet, et Lagrue. 1999. « Les Pratiques addictives: usage, usage nocif et dépendance aux substances psycho-actives: rapport remis au secrétaire d'Etat à la santé ». Rapport public. Direction générale de la santé.
- Ricaurte, DeLanney, Irwin, et Langston. 1988. « Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration ». *Brain Research* 446 (1): 165–168.
- Ricaurte, Yuan, Hatzidimitriou, Cord, et McCann. 2002. « Severe Dopaminergic Neurotoxicity in Primates After a Common Recreational Dose Regimen of MDMA (“Ecstasy”) ». *Science* 297 (5590): 2260–2263.
- Richardson-Jones, Craige, Guiard, Stephen, Metzger, Kung, Gardier, et al. 2010. « 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. » *Neuron* 65: 40–52.
- Ritter, et Stein. 1974. « Self-stimulation in the mesencephalic trajectory of the ventral noradrenergic bundle ». *Brain Research* 81 (1): 145–157.
- Ritz, et Kuhar. 1989. « Relationship between self-administration of amphetamine and monoamine receptors in brain: comparison with cocaine. » *J Pharmacol Exp Ther* 248: 1010–7.
- Robbins, et Everitt. 1999. « Drug Addiction: Bad Habits Add up ». *Nature* 398 (6728): 567–570.
- Roberts, Koob, Klonoff, et Fibiger. 1980. « Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 12 (5): 781–787.
- Robinson, et Berridge. 1993. « The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. » *Brain Res Brain Res Rev* 18: 247–91.
- Robinson, et Berridge. 2008. « Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. » *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3137–46.
- Robinson, Becker, et Presty. 1982. « Long-term facilitation of amphetamine-induced rotational behavior and striatal dopamine release produced by a single exposure to amphetamine: Sex differences ». *Brain Research* 253 (1–2): 231–241.
- Robinson, et Berridge. 2003. « Addiction ». *Annual Review of Psychology* 54 (1): 25–53.
- Robison, et Nestler. 2011. « Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction ». *Nature reviews. Neuroscience* 12 (11): 623–637.
- Rocha, Fumagalli, Gainetdinov, Jones, Ator, Giros, Miller, et Caron. 1998. « Cocaine Self-Administration in Dopamine-Transporter Knockout Mice ». *Nature Neuroscience* 1 (2): 132–137.
- Romanò, Yip, Hodson, Guillou, Parnaudeau, Kirk, Tronche, et al. 2013. « Plasticity of Hypothalamic Dopamine Neurons during Lactation Results in Dissociation of Electrical

Activity and Release ». *The Journal of Neuroscience* 33 (10): 4424–4433.

Rook, Huitema, Brink, Ree, et Beijnen. 2006. « Pharmacokinetics and Pharmacokinetic Variability of Heroin and Its Metabolites: Review of the Literature ». *Current Clinical Pharmacology* 1 (1): 109–118.

Rosin, Talley, Lee, Stornetta, Gaylinn, Guyenet, et Lynch. 1996. « Distribution of Alpha 2C-Adrenergic Receptor-like Immunoreactivity in the Rat Central Nervous System ». *The Journal of Comparative Neurology* 372 (1): 135–165.

Rouge-Pont, Marinelli, Le Moal, Simon, et Piazza. 1995. « Stress-Induced Sensitization and Glucocorticoids. II. Sensitization of the Increase in Extracellular Dopamine Induced by Cocaine Depends on Stress-Induced Corticosterone Secretion ». *The Journal of Neuroscience* 15 (11): 7189–7195.

Russo, Dietz, Dumitriu, Morrison, Malenka, et Nestler. 2010. « The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens ». *Trends in Neurosciences* 33 (6): 267–276.

Saal, Dong, Bonci, et Malenka. 2003. « Drugs of Abuse and Stress Trigger a Common Synaptic Adaptation in Dopamine Neurons ». *Neuron* 37 (4): 577–582.

Sadkowski, Clayden, ElSheikh, Rangarajan, DeJesus, et Samaan. 2013. « The role of the serotonergic system in suicidal behavior ». *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, novembre, 1699.

Sakai, Salvat, Touret, et Jouvot. 1977. « Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique ». *Brain Research* 137 (1): 11–35.

Salamone, 1994. « The Involvement of Nucleus Accumbens Dopamine in Appetitive and Aversive Motivation ». *Behavioural Brain Research* 61 (2): 117–133.

Salomon, Lanteri, Glowinski, et Tassin. 2006. « Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7476–81.

Salomon, Lanteri, Godeheu, Blanc, Gingrich, et Tassin. 2007. « Paradoxical Constitutive Behavioral Sensitization to Amphetamine in Mice Lacking 5-HT_{2A} Receptors ». *Psychopharmacology* 194 (1): 11–20.

Sanders-Bush, et Sulser. 1987. « Serotonin/Norepinephrine Receptor Interactions: Sensitivity Changes after Antidepressants and Lesions ». In *Receptor-Receptor Interactions*, édité par Kjell Fuxe et Luigi F. Agnati, 387–397. Wenner-Gren Center International Symposium Series. Springer US.

Sara, et Hervé-Minvielle. 1995. « Inhibitory Influence of Frontal Cortex on Locus Coeruleus Neurons ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (13): 6032–6036.

Sara, 2009. « The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. » *Nat Rev Neurosci* 10: 211–23.

- Sara, 2009. « The Locus Coeruleus and Noradrenergic Modulation of Cognition ». *Nature Reviews Neuroscience* 10 (3): 211–223.
- Sasaki, Kawasaki, Kimura, Fujita, Takashima, Matsumoto, et Sato. 1997. « Functional Uncoupling between the Receptor and G-Protein as the Result of PKC Activation, Observed in *Aplysia* Neurons ». *The Japanese Journal of Physiology* 47 (3): 241–249.
- Sastre-Coll, Esteban, et García-Sevilla. 2002. « Supersensitivity of 5-HT_{1A}-Autoreceptors and α 2-Adrenoceptors Regulating Monoamine Synthesis in the Brain of Morphine-Dependent Rats ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 365 (3): 210–219.
- Schank, Ventura, Puglisi-Allegra, Alcaro, Cole, Liles, Seeman, et Weinshenker. 2006. « Dopamine beta-hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine signaling and are hypersensitive to cocaine. » *Neuropsychopharmacology* 31: 2221–30.
- Scheinin, Lomasney, Hayden-Hixson, Schambra, Caron, Lefkowitz, et Fremeau Jr. 1994. « Distribution of Alpha 2-Adrenergic Receptor Subtype Gene Expression in Rat Brain ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 21 (1-2): 133–149.
- Schenk, Valadez, McNamara, House, Higley, Bankson, Gibbs, et Horger. 1993. « Development and Expression of Sensitization to Cocaine's Reinforcing Properties: Role of NMDA Receptors ». *Psychopharmacology* 111 (3): 332–338.
- Schenk, Valadez, Worley, et McNamara. 1993. « Blockade of the Acquisition of Cocaine Self-Administration by the NMDA Antagonist MK-801 (dizocilpine) ». *Behavioural Pharmacology* 4 (6): 652–659.
- Schoenbaum, et Roesch. 2005. « Orbitofrontal Cortex, Associative Learning, and Expectancies ». *Neuron* 47 (5): 633–636.
- Schultz, 1998. « Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons ». *Journal of Neurophysiology* 80 (1): 1–27.
- Segal, et Kuczenski. 1992. « In vivo microdialysis reveals a diminished amphetamine-induced DA response corresponding to behavioral sensitization produced by repeated amphetamine pretreatment ». *Brain Research* 571 (2): 330–337.
- Segal, et Mandell. 1974. « Long-term administration of d-amphetamine: Progressive augmentation of motor activity and stereotypy ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2 (2): 249–255.
- Segal, 1979. « Serotonergic Innervation of the Locus Coeruleus from the Dorsal Raphe and Its Action on Responses to Noxious Stimuli. » *The Journal of Physiology* 286 (1): 401–415.
- Shaham, Highfield, Delfs, Leung, et Stewart. 2000. « Clonidine blocks stress-induced reinstatement of heroin seeking in rats: an effect independent of locus coeruleus noradrenergic neurons. » *Eur J Neurosci* 12: 292–302.
- Shanahan, Holick Pierz, Masten, Waeber, Ansorge, Gingrich, Geyer, Hen, et Dulawa. 2009. « Chronic Reductions in Serotonin Transporter Function Prevent 5-HT_{1B}-Induced Behavioral Effects in Mice ». *Biological Psychiatry* 65 (5): 401–408.

- Sharp, Bramwell, et Grahame-Smith. 1989. « 5-HT₁ Agonists Reduce 5-Hydroxytryptamine Release in Rat Hippocampus in Vivo as Determined by Brain Microdialysis ». *British Journal of Pharmacology* 96 (2): 283–290.
- Shiple, Fu, Ennis, Liu, et Aston-Jones. 1996. « Dendrites of Locus Coeruleus Neurons Extend Preferentially into Two Pericoerulear Zones ». *The Journal of Comparative Neurology* 365 (1): 56–68.
- Simon, Le Moal, Stinus, et Calas. 1979. « Anatomical Relationships between the Ventral Mesencephalic Tegmentum--a 10 Region and the Locus Coeruleus as Demonstrated by Anterograde and Retrograde Tracing Techniques ». *Journal of Neural Transmission* 44 (1-2): 77–86.
- Sinton, et Fallon. 1988. « Electrophysiological Evidence for a Functional Differentiation between Subtypes of the 5-HT₁ Receptor ». *European Journal of Pharmacology* 157 (2-3): 173–181.
- Smiley, Levey, Ciliax, et Goldman-Rakic. 1994. « D₁ Dopamine Receptor Immunoreactivity in Human and Monkey Cerebral Cortex: Predominant and Extrasynaptic Localization in Dendritic Spines ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (12): 5720–5724.
- Snoddy, et Tessel. 1985. « Prazosin: Effect on Psychomotor-Stimulant Cues and Locomotor Activity in Mice ». *European Journal of Pharmacology* 116 (3): 221–228.
- Sofuoglu, et Sewell. 2009. « REVIEW: Norepinephrine and Stimulant Addiction ». *Addiction Biology* 14 (2): 119–29.
- Solinas, Chauvet, Thiriet, El Rawas, et Jaber. 2008. « Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17145–50.
- Solomon, et Corbit. 1974. « An Opponent-Process Theory of Motivation. I. Temporal Dynamics of Affect ». *Psychological Review* 81 (2): 119–145.
- Sommermeier, Frielingsdorf, et Knorr. 1995. « Effects of prazosin on the dopaminergic neurotransmission in rat brain ». *European Journal of Pharmacology* 276 (3): 267–270.
- Spano, Fattore, Fratta, et Fadda. 2007. « The GABAB receptor agonist baclofen prevents heroin-induced reinstatement of heroin-seeking behavior in rats ». *Neuropharmacology* 52 (7): 1555–1562.
- Sparks, Pauly. 1999. « Effects of Continuous Oral Nicotine Administration on Brain Nicotinic Receptors and Responsiveness to Nicotine in C57Bl/6 Mice ». *Psychopharmacology* 141 (2): 145–153.
- Starke, 2001. « Presynaptic Autoreceptors in the Third Decade: Focus on α_2 -Adrenoceptors ». *Journal of Neurochemistry* 78 (4): 685–93.
- Steketee, et Kalivas. 2011. « Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. » *Pharmacol Rev* 63: 348–65.
- Stone, Hanson, et Gibb. 1987. « Differences in the Central Serotonergic Effects of

Methylenedioxyamphetamine (MDMA) in Mice and Rats ». *Neuropharmacology* 26 (11): 1657–1661.

Strakowski, et Sax. 1998. « Progressive behavioral response to repeated d-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans ». *Biological Psychiatry* 44 (11): 1171–1177.

Strakowski, Sax, Setters, et Keck Jr. 1996. « Enhanced response to repeated d-amphetamine challenge: Evidence for behavioral sensitization in humans ». *Biological Psychiatry* 40 (9): 872–880.

Striplin, et Kalivas. 1993. « Robustness of G protein changes in cocaine sensitization shown with immunoblotting. » *Synapse* 14: 10–5.

Sulser, et Sanders-Bush. 1987. « The Serotonin-Norepinephrine Link Hypothesis of Affective Disorders: Receptor-Receptor Interactions in Brain ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 221: 489–502.

Svensson, et Ahlenius. 1982. « Functional Importance of Nucleus Accumbens Noradrenaline in the Rat ». *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 50 (1): 22–24.

Svensson, et Tung. 1989. « Local Cooling of Pre-Frontal Cortex Induces Pacemaker-like Firing of Dopamine Neurons in Rat Ventral Tegmental Area in Vivo ». *Acta Physiologica Scandinavica* 136 (1): 135–36.

Svensson, Bunney, et Aghajanian. 1975. « Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the α -adrenergic agonist clonidine ». *Brain Research* 92 (2): 291–306.

Swanson, 1982. « The Projections of the Ventral Tegmental Area and Adjacent Regions: A Combined Fluorescent Retrograde Tracer and Immunofluorescence Study in the Rat ». *Brain Research Bulletin* 9 (1-6): 321–353.

Swanson, et Hartman. 1975. « The Central Adrenergic System. An Immunofluorescence Study of the Location of Cell Bodies and Their Efferent Connections in the Rat Utilizing Dopamine-Beta-Hydroxylase as a Marker ». *The Journal of Comparative Neurology* 163 (4): 467–505.

Tabac-info-service. 2014. « Chiffres du tabac ».

Taghzouti, Simon, Hervé, Blanc, Studler, Glowinski, LeMoal, et Tassin. 1988. « Behavioural deficits induced by an electrolytic lesion of the rat ventral mesencephalic tegmentum are corrected by a superimposed lesion of the dorsal noradrenergic system ». *Brain Research* 440 (1): 172–176.

Talley, Rosin, Lee, Guyenet, et Lynch. 1996. « Distribution of Alpha 2A-Adrenergic Receptor-like Immunoreactivity in the Rat Central Nervous System ». *The Journal of Comparative Neurology* 372 (1): 111–134.

Tanoue, Koshimizu, Shibata, Nasa, Takeo, et Tsujimoto. 2003. « Insights into α 1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 14 (3): 107–113.

Tao, et Auerbach. 1995. « Involvement of the dorsal raphe but not median raphe nucleus in morphine-induced increases in serotonin release in the rat forebrain ». *Neuroscience* 68 (2): 553–561.

Tao, et Auerbach. 1994. « Increased Extracellular Serotonin in Rat Brain After Systemic or Intraraphe Administration of Morphine ». *Journal of Neurochemistry* 63 (2): 517–24.

Tao et Auerbach. 2005. « μ -Opioids disinhibit and κ -opioids inhibit serotonin efflux in the dorsal raphe nucleus ». *Brain Research* 1049 (1): 70–79.

Tassin, Lavielle, Hervé, Blanc, Thierry, Alvarez, Berger, et Glowinski. 1979. « Collateral Sprouting and Reduced Activity of the Rat Mesocortical Dopaminergic Neurons after Selective Destruction of the Ascending Noradrenergic Bundles ». *Neuroscience* 4 (11): 1569–1582.

Tassin, 2008. « Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. » *Biochem Pharmacol* 75: 85–97.

Thierry, Blanc, Sobel, Stinus, et Glowinski. 1973. « Dopaminergic Terminals in the Rat Cortex ». *Science (New York, N.Y.)* 182 (4111): 499–501.

Thomas, Kalivas, et Shaham. 2008. « Neuroplasticity in the Mesolimbic Dopamine System and Cocaine Addiction ». *British Journal of Pharmacology* 154 (2): 327–42.

Torres, Gainetdinov, et Caron. 2003. « Plasma Membrane Monoamine Transporters: Structure, Regulation and Function ». *Nature Reviews Neuroscience* 4 (1): 13–25.

Trigo, Renoir, Lanfumey, Hamon, Lesch, Robledo, et Maldonado. 2007. « 3,4-Methylenedioxymethamphetamine Self-Administration is Abolished in Serotonin Transporter Knockout Mice ». *Biological Psychiatry* 62 (6): 669–679.

Trulson, et Crisp. 1984. « Role of Norepinephrine in Regulating the Activity of Serotonin-Containing Dorsal Raphe Neurons ». *Life Sciences* 35 (5): 511–515.

Tully, Li, Tsvetkov, et Bolshakov. 2007. « Norepinephrine Enables the Induction of Associative Long-Term Potentiation at Thalamo-Amygdala Synapses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (35): 14146–14150.

Ungless, Whistler, Malenka, et Bonci. 2001. « Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. » *Nature* 411: 583–7.

Unnerstall, Fernandez, et Orensanz. 1985. « The Alpha-Adrenergic Receptor: Radiochemical Analysis of Functional Characteristics and Biochemical Differences ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 22 (5): 859–874.

Valjent, Bertran-Gonzalez, Aubier, Greengard, Hervé, et Girault. 2010. « Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. » *Neuropsychopharmacology* 35: 401–15.

Valjent, Corvol, Trzaskos, Girault, et Hervé. 2006. « Role of the ERK Pathway in

Psychostimulant-Induced Locomotor Sensitization ». *BMC Neuroscience* 7: 20.

Van Bockstaele, Chan, et Pickel. 1996. « Input from Central Nucleus of the Amygdala Efferents to Pericoerulear Dendrites, Some of Which Contain Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity ». *Journal of Neuroscience Research* 45 (3): 289–302.

VanderMaelen, Matheson, Wilderman, et Patterson. 1986. « Inhibition of Serotonergic Dorsal Raphe Neurons by Systemic and Iontophoretic Administration of Buspirone, a Non-Benzodiazepine Anxiolytic Drug ». *European Journal of Pharmacology* 129 (1-2): 123–130.

Vandermaelen, Aghajanian. 1983. « Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices ». *Brain Research* 289 (1–2): 109–119.

Vanderschuren, et Kalivas. 2000. « Alterations in Dopaminergic and Glutamatergic Transmission in the Induction and Expression of Behavioral Sensitization: A Critical Review of Preclinical Studies ». *Psychopharmacology* 151 (2-3): 99–120.

Vanderschuren, Schoffelmeer, Mulder, et De Vries. 1999a. « Dopaminergic Mechanisms Mediating the Long-Term Expression of Locomotor Sensitization Following Pre-Exposure to Morphine or Amphetamine ». *Psychopharmacology* 143 (3): 244–253.

Vanderschuren, Schoffelmeer, Mulder et De Vries. 1999b. « Lack of Cross-Sensitization of the Locomotor Effects of Morphine in Amphetamine-Treated Rats ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21 (4): 550–559.

Vanderschuren, Tjon, Nestby, Mulder, Schoffelmeer, et De Vries. 1997. « Morphine-Induced Long-Term Sensitization to the Locomotor Effects of Morphine and Amphetamine Depends on the Temporal Pattern of the Pretreatment Regimen ». *Psychopharmacology* 131 (2): 115–122.

Vanderschuren et Pierce. 2010. « Sensitization Processes in Drug Addiction ». *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 3: 179–195.

Vanderschuren, et Ahmed. 2013. « Animal Studies of Addictive Behavior ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (4): a011932.

Ventura, Cabib, Alcaro, Orsini, et Puglisi-Allegra. 2003. « Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. » *J Neurosci* 23: 1879–85.

Ventura, Alcaro, et Puglisi-Allegra. 2005. « Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. » *Cereb Cortex* 15: 1877–86.

Vergé, Daval, Patey, Gozlan, el Mestikawy, et Hamon. 1985. « Presynaptic 5-HT Autoreceptors on Serotonergic Cell Bodies And/or Dendrites but Not Terminals Are of the 5-HT1A Subtype ». *European Journal of Pharmacology* 113 (3): 463-464.

Vergé, Daval, Marcinkiewicz, Patey, el Mestikawy, Gozlan, et Hamon. 1986. « Quantitative

- Autoradiography of Multiple 5-HT₁ Receptor Subtypes in the Brain of Control or 5,7-Dihydroxytryptamine-Treated Rats ». *The Journal of Neuroscience* 6 (12): 3474–3482.
- Vertes, 1991. « A PHA-L Analysis of Ascending Projections of the Dorsal Raphe Nucleus in the Rat ». *The Journal of Comparative Neurology* 313 (4): 643–668.
- Vertes, Fortin, et Crane. 1999. « Projections of the Median Raphe Nucleus in the Rat ». *The Journal of Comparative Neurology* 407 (4): 555–82.
- Vezina, 1996. « D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. » *J Neurosci* 16: 2411–20.
- Vezina, P, et J Stewart. 1990. « Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. » *Brain Res* 516: 99–106.
- Vialou, Vincent, Rosemary C. Bagot, Michael E. Cahill, Deveroux Ferguson, Alfred J. Robison, David M. Dietz, Barbara Fallon, et al. 2014. « Prefrontal Cortical Circuit for Depression- and Anxiety-Related Behaviors Mediated by Cholecystokinin: Role of Δ FosB ». *The Journal of Neuroscience* 34 (11): 3878–3887.
- Villégier, Salomon, Blanc, Godeheu, Glowinski, et Tassin. 2006. « Irreversible blockade of monoamine oxidases reveals the critical role of 5-HT transmission in locomotor response induced by nicotine in mice. » *Eur J Neurosci* 24: 1359–65.
- Villégier, Salomon, Granon, Changeux, Belluzzi, Leslie, et Tassin. 2006. « Monoamine oxidase inhibitors allow locomotor and rewarding responses to nicotine. » *Neuropsychopharmacology* 31: 1704–13.
- Walaas, et Fonnum. 1980. « Biochemical evidence for γ -aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat ». *Neuroscience* 5 (1): 63–72.
- Wallace, Vialou, Rios, Carle-Florence, Chakravarty, Kumar, Graham, et al. 2008. « The Influence of Δ FosB in the Nucleus Accumbens on Natural Reward-Related Behavior ». *The Journal of Neuroscience* 28 (41): 10272–10277.
- Wang, et Aghajanian. 1977. « Physiological Evidence for Habenula as Major Link between Forebrain and Midbrain Raphe ». *Science (New York, N.Y.)* 197 (4298): 89–91.
- Wang et Aghajanian. 1978. « Collateral Inhibition of Serotonergic Neurones in the Rat Dorsal Raphe Nucleus: Pharmacological Evidence ». *Neuropharmacology* 17 (10): 819–825.
- Wang, Gallager, et Aghajanian. 1976. « Stimulation of Pontine Reticular Formation Suppresses Firing of Serotonergic Neurones in the Dorsal Raphe ». *Nature* 264 (5584): 365–368.
- Weinshenker, et Schroeder. 2007. « There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. » *Neuropsychopharmacology* 32: 1433–51.
- Weinshenker, 2002. « Mice with chronic norepinephrine deficiency resemble

amphetamine-sensitized animals ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (21): 13873–13877.

Wellman, Ho, Cepeda-Benito, Bellinger, et Nation. 2002. « Cocaine-induced hypophagia and hyperlocomotion in rats are attenuated by prazosin ». *European Journal of Pharmacology* 455 (2–3): 117–126.

Williams, North, Shefner, Nishi, et Egan. 1984. « Membrane Properties of Rat Locus Coeruleus Neurons ». *Neuroscience* 13 (1): 137–156.

Wise, et M A Bozarth. 1987. « A psychomotor stimulant theory of addiction ». *Psychological review* 94 (4): 469–492.

Wise, 1978. « Catecholamine theories of reward: a critical review. » *Brain Res* 152: 215–247.

Wolf, Sun, Mangiavacchi, et Chao. 2004. « Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. » *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 61–79.

Wolf, et Khansa. 1991. « Repeated administration of MK-801 produces sensitization to its own locomotor stimulant effects but blocks sensitization to amphetamine ». *Brain Research* 562 (1): 164–168.

Yokel, et Wise. 1975. « Increased Lever Pressing for Amphetamine after Pimozide in Rats: Implications for a Dopamine Theory of Reward ». *Science (New York, N.Y.)* 187 (4176): 547–549.

Young, Porrino, et Iadarola. 1991. « Cocaine Induces Striatal c-Fos-Immunoreactive Proteins via Dopaminergic D1 Receptors. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (4): 1291–1295.

Zachariou, Bolanos, Selley, Theobald, Cassidy, Kelz, Shaw-Lutchman, et al. 2006. « An Essential Role for Δ FosB in the Nucleus Accumbens in Morphine Action ». *Nature Neuroscience* 9 (2): 205–211.

Zahm, et Brog. 1992. « On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum ». *Neuroscience* 50 (4): 751–767.

Zhang, et Kosten. 2005. « Prazosin, an alpha-1 adrenergic antagonist, reduces cocaine-induced reinstatement of drug-seeking. » *Biol Psychiatry* 57: 1202–4.

Résumé

Le modèle de sensibilisation comportementale permet d'étudier les changements neuronaux induits par les drogues. Chez les rongeurs, l'activité locomotrice augmente au fur et à mesure des injections et se maintient à long terme. En parallèle à cette sensibilisation, on observe une sensibilisation neurochimique des transmissions noradrénergique (NA) et sérotoninergique (5-HT) jusqu'à un mois après la dernière injection. Cette sensibilisation neurochimique, qui se traduit par des libérations de NA et de 5-HT potentialisées mesurées au niveau du cortex préfrontal, est commune à toutes les drogues et fortement corrélée à la sensibilisation comportementale.

Le but de ce travail était d'identifier les mécanismes qui maintiennent à long terme cette hyper-réactivité.

Nous avons tout d'abord montré que la réponse locomotrice potentialisée à l'amphétamine se maintient durant le premier mois de sevrage, et décroît de 60% entre 2 et 4 mois. Toutefois les souris restent plus vulnérables à la drogue et ce, même après de longs sevrages.

Nous avons également démontré que l'hyper-réactivité des systèmes se maintient à long terme notamment grâce à une désensibilisation fonctionnelle persistante des récepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A}, responsables du rétrocontrôle inhibiteur des transmissions NA et 5-HT. On observe une diminution de l'expression des protéines G_{qi} couplées à ces récepteurs, dans le locus coeruleus et dans le raphé dorsal, respectivement.

La même altération des rétrocontrôles ayant été mesurée chez les animaux sensibilisés au MDMA, les résultats suggèrent que les récepteurs α_{2A} -adrénergiques et 5-HT_{1A} pourraient être des cibles indirectes des psychostimulants.

Abstract

The behavioral sensitization model allows the study of the neuronal changes induced by drugs of abuse. In rodents, the locomotor activity increases progressively with the injections of drug, and stays long-lastingly potentiated. Concurrent with this sensitization, a neurochemical sensitization of noradrenergic and serotonergic transmissions is developed until one month after the last injection. This sensitization, quantified through potentiated noradrenergic and serotonergic releases in the prefrontal cortex, was shown to be common to almost all drugs of abuse and highly correlated to behavioral sensitization.

The aim of this study was to identify the mechanisms sustaining this hyper-reactivity.

We first showed that the potentiated response persists after the first month of withdrawal, and decreases to 40% of the response after 2 to 4 months of withdrawal. However, all mice remain more vulnerable to the drug, even after long (4 months) withdrawals.

We also showed that the systems' hyper-reactivity is sustained in the long term by a functional and persistent desensitization of the α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors, responsible for the inhibitory feed-back of noradrenergic and serotonergic transmissions. We observed a decreased expression of G_{qi} proteins coupled receptors in the locus coeruleus and the dorsal raphe.

The same feed-back dysfunctions were found in animals sensitized to MDMA, which suggests that α_{2A} -adrenergic and 5-HT_{1A} receptors are indirect targets of psychostimulant drugs.