

Université de Montréal

Plasticité synaptique dans l'aire tegmentaire ventrale
Implication des endocannabinoïdes

par

Christian Kortleven

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Sciences Neurologiques

Décembre 2011

© Christian Kortleven, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Plasticité synaptique dans l'aire tegmentaire ventrale
Implication des endocannabinoïdes

Présentée par :
Christian Kortleven

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Réjean Dubuc, président-rapporteur
Louis-Eric Trudeau, directeur de recherche
Pierre-Paul Rompré, membre du jury
Carl R. Lupica, examinateur externe
Nicole Leclerc, représentante du doyen de la FES

Résumé

Le système dopaminergique (DA) méso-corticolimbique du cerveau, qui prend son origine dans l'aire tegmentaire ventrale (ATV), est fortement impliqué dans les comportements motivés et la toxicomanie. Les drogues d'abus activent ce système et y induisent une plasticité synaptique de longue durée. Les neurones DA de l'ATV reçoivent sur leur arborisation dendritique une grande densité de terminaisons glutamatergiques. Les drogues d'abus induisent une potentialisation à long terme (PLT) de ces contacts glutamatergiques. La PLT est une augmentation prolongée de la transmission synaptique, qui semble sous-tendre la mémoire et l'apprentissage.

Les endocannabinoïdes (ECs) sont des neurotransmetteurs qui agissent de façon rétrograde sur des récepteurs présynaptiques (CB1) pour diminuer la libération des neurotransmetteurs comme le glutamate. Les neurones libèrent les ECs à partir de leur compartiment somatodendritique suite à une stimulation des afférences et la dépolarisation membranaire qui s'ensuit. La neurotensine (NT) est un neuropeptide retrouvé de façon abondante dans le système DA du cerveau. Il a été découvert que la NT peut induire la libération des ECs dans le striatum.

En faisant appel à une combinaison d'approches immunohistochimique, électrophysiologique et pharmacologique chez la souris, nous avons confirmé dans la première étude de cette thèse la présence des récepteurs CB1 sur les terminaisons glutamatergiques des neurones DA de l'ATV, et avons montré que leur activation induit une diminution de la libération de glutamate. Par ailleurs, nous avons montré que des trains de stimulation peuvent induire la libération des ECs. Nous avons découvert qu'en présence d'un antagoniste des récepteurs CB1, il y a facilitation de l'induction de la PLT. Cette observation suggère que les ECs ont un effet inhibiteur sur l'induction de la PLT, plutôt que sur son expression. Nous avons déterminé que le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) est l'EC qui est principalement responsable de cette action inhibitrice. Finalement, la PLT

induite en présence d'un antagoniste CB1 est aussi dépendante d'une activation des récepteurs NMDA du glutamate.

Les travaux réalisés dans la deuxième étude de cette thèse ont montré que la NT est présente dans une sous-population de terminaisons axonales glutamatergiques dans l'ATV. Une application exogène de NT induit une diminution prolongée de l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs (CPSEs). Cette diminution est bloquée en présence d'un antagoniste non-sélectif des récepteurs à la NT, ainsi qu'en présence d'un antagoniste sélectif pour le récepteur de NT de type 1 (NTS1). Confirmant l'implication d'une production d'ECs, la baisse des CPSEs par la NT a été bloquée en présence d'un antagoniste des récepteurs CB1 ou d'un bloqueur de la synthèse de 2-AG. La chélation du calcium intracellulaire n'empêchait pas l'effet inhibiteur de la NT sur les CPSEs, cependant, l'inhibition des protéines G ou de la phospholipase C a complètement bloqué la dépression synaptique induite par la NT. Par ailleurs, nos travaux ont montré que la nature prolongée de la dépression synaptique induite par la NT exogène s'explique par une libération soutenue des ECs, et non pas à une activation prolongée des NTR. Finalement, notre observation qu'un antagoniste des récepteurs de la NT ne facilite pas l'induction de la PLT, comme le fait un antagoniste du récepteur CB1, suggère que la stimulation répétitive des afférences glutamatergiques nécessaire à l'induction de la PLT n'induit pas de libération des ECs via la libération de NT, nous permettant ainsi de conclure que la sécrétion de NT n'agit pas dans ces conditions comme un facteur de régulation négative de la PLT.

Mots-clés: dopamine, ATV, plasticité, glutamate, endocannabinoïde, neurotensine, 2-arachidonoylglycerol, patch-clamp, PLT, CB1

Abstract

The meso-corticolimbic dopamine (DA) system of the brain, originating in the ventral tegmental area (VTA), is strongly implicated in reward, motivation and drug addiction. Drugs of abuse activate this system and cause significant long term plasticity. DA neurons in the VTA receive are densely innervated by glutamatergic inputs. All major classes of drugs of abuse have been found to cause a long term potentiation (LTP) of glutamate transmission onto DA neurons of the VTA. LTP is an enduring increase of synaptic transmission, hypothesized to underlie memory and learning.

Endocannabinoids (ECs) are transmitters that act in a retrograde fashion on pre-synaptic receptors leading to a decrease in neurotransmitter release. DA neurons can release ECs from their somatodendritic compartment in response to afferent stimulation or depolarization. Neurotensin (NT) is a neuropeptide that presents an extensive interaction with the DA system. It was discovered that NT can induce production of ECs in the striatum.

In the first study of this thesis, we used a combination of immunohistochemical, pharmacological and electrophysiological techniques in mouse brain slices to demonstrate that CB1 EC receptors are present on glutamatergic afferents to DA neurons. Their activation induces a depression of glutamate release. We further showed that trains of afferent stimulation induce EC release from DA neurons and that in the presence of the CB1 antagonist AM251, there is a marked facilitation of the induction of LTP, suggesting that ECs produced in response to activation of glutamate synapses normally negatively regulate the induction, but not the expression of LTP. Finally, we found that 2-arachidonoylglycerol (2-AG) is the main EC implicated in this negative regulation of LTP and that LTP induced in the presence of a CB1 receptor antagonist is otherwise also dependent on NMDA glutamate receptors.

In the second study, we report that NT is present in a subset of glutamatergic axon terminals in the VTA and that activation of NT receptors by exogenous NT induces a long-

lasting decrease of the amplitude of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) in VTA DA neurons. This decrease was blocked by a broad-spectrum NTR antagonist, as well as by a specific antagonist of the type 1 NT receptor NTS1. The decrease was also blocked when CB1 receptors or 2-AG synthesis were blocked. Chelating intracellular calcium had no effect, but inhibiting G-proteins or phospholipase C blocked NT-mediated synaptic depression. The long-lasting nature of the synaptic depression induced by NT was due to protracted EC release and not to prolonged NT receptor activation. Finally, our observation that a NT receptor antagonist did not facilitate LTP induction, as did a CB1 receptor antagonist, suggests that repetitive stimulation of glutamatergic afferents required to induce LTP does not cause EC production through the release of NT, thus allowing us to conclude that secretion of NT does not act under such conditions as a negative regulator of LTP.

Keywords: dopamine, VTA, plasticity, glutamate, endocannabinoid, neurotensin, 2-arachidonoylglycerol, patch-clamp, LTP, CB1

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Partie 1 : Voies dopaminergiques et drogues d'abus.....	2
1.1 La dopamine.....	2
1.2 Les voies dopaminergiques.....	4
1.3 La toxicomanie, les drogues d'abus et le système dopaminergique.....	7
1.3.1 La toxicomanie.....	7
1.3.2 Les drogues d'abus.....	9
Partie 2: La transmission glutamatergique et la potentialisation à long terme.....	13
2.1 Le glutamate.....	13
2.2 Les récepteurs du glutamate.....	16
2.2.1 Les récepteurs AMPA.....	17
2.2.2 Les récepteurs NMDA.....	18
2.2.3 Les récepteurs de type kaïnate.....	19
2.2.4 Les récepteurs métabotropes.....	19
2.3 La PLT: découverte d'un mécanisme neurobiologique de l'apprentissage.....	20
2.3.1 La première caractérisation de la PLT.....	21
2.3.2 Les conditions générales pour l'induction de la PLT: implication du récepteur NMDA.....	23
2.4 Drogues d'abus et plasticité synaptique.....	25
2.4.1 Plasticité synaptique dans le noyau accumbens.....	26

2.4.2 Plasticité synaptique dans l'ATV	27
Partie 3: Les endocannabinoïdes et la neurotensine.....	31
3.1 Les endocannabinoïdes.....	31
3.1.1 Le système des endocannabinoïdes	31
3.1.2 Les endocannabinoïdes et la transmission synaptique.....	35
3.1.3 Les endocannabinoïdes dans l'ATV.....	37
3.2 La neurotensine.....	38
3.2.1 Le système de la neurotensine	38
3.2.2 Les effets de la NT sur la transmission dopaminergique et glutamatergique.....	40
3.2.3 Un rôle de la NT dans la toxicomanie?.....	41
Partie 4: Problématique et hypothèses	43
Résultats	46
Contribution des co-auteurs	47
Article 1.....	48
Article 2.....	91
Discussion	126
1: Considérations méthodologiques.....	127
2: Régulation de la potentialisation à long terme dans l'aire tegmentaire ventrale par les endocannabinoïdes.....	128
2.1 Présence de récepteurs CB1 sur des terminaisons glutamatergiques de l'ATV.....	128
2.2 L'activation du récepteur CB1 diminue la libération de glutamate.....	130
2.3 L'induction de la PLT est régulée négativement par le 2-AG.....	131
2.4 Existence d'une régulation tonique des synapses glutamatergiques via le récepteur GABA _A ?	137
3: la neurotensine: une source de production de 2-AG dans l'ATV.....	139
3.1 La neurotensine est présente dans certaines terminaisons glutamatergiques	139
3.2 Effet inhibiteur de la NT sur les synapses glutamatergiques de l'ATV	140
3.3 Augmentation de la variance du courant membranaire par la NT dans les neurones dopaminergiques.....	143

3.4 La NT endogène n'affecte pas l'induction de la PLT dans les neurones dopaminergiques suite au protocole de stimulation appariée	144
4: Conclusions et perspectives	146
Bibliographie.....	148

Liste des tableaux

Tableau 1	Distribution des récepteurs CB1 dans le cerveau du rat, identifiée par autoradiographie	33
-----------	---	----

Liste des figures

Figure 1	La synthèse et dégradation de la dopamine	4
Figure 2	Les régions et voies dopaminergiques dans le cerveau du rat	7
Figure 3	Un schéma simplifié du mode d'action des drogues d'abus	12
Figure 4	Schéma des différentes voies de synthèse du glutamate	14
Figure 5	Distribution de l'ARNm de VGLUT1 et VGLUT2 dans le cerveau	15
Figure 6	Un schéma de la préparation utilisée par Bliss et Lomo	22
Figure 7	Modèles de synthèse de l'anandamide et du 2-AG	35
Figure 8	Induction de la libération de 2-AG par la dépolarisation membranaire ou l'activation présynaptique répétée dans les deux types de synapses les plus abondants dans le cerveau	36
Figure 9	Le système neurotensinergique	40
Figure 10	Hypothèses	45
A1 Figure 1	Identification and localization of DA neurons in TH-eGFP/21-31 mice	82
A1 Figure 2	Localization of CB1 receptors on VGLUT1 and VGLUT2 positive axonal varicosities in the VTA	83
A1 Figure 3	CB1 receptors are functional and activated by a pairing train of pre- and post-synaptic stimulation	84
A1 Figure 4	GABA _A receptor-mediated transmission, but not CB1 receptor-mediated transmission, tonically inhibits glutamatergic transmission onto VTA DA neurons	86
A1 Figure 5	GABA _A receptor blockade, CB1 receptor blockade and inhibition of 2-AG synthesis allow for NMDA-dependent	87

	LTP induction	
A1 Supp Figure 1	Validation of the CB1 antibody using transfection of a Flag-tagged CB1 receptor in Human Embryonic Kidney (HEK) cells	89
A2 Figure 1	A subset of glutamatergic terminals in the VTA expressing VGLUT1 and VGLUT2 contain neurotensin	119
A2 Figure 2	Neurotensin induces a prolonged decrease in the amplitude of evoked excitatory post-synaptic currents in dopamine neurons of the VTA	120
A2 Figure 3	Neurotensin decreases EPSC amplitude through CB1 activation by 2-arachidonoylglycerol, through a calcium-independent G-protein/Phospholipase C/diacylglycerol-lipase interaction	121
A2 Figure 4	Neurotensin induced decrease of EPSCs is mediated by a prolonged release of endocannabinoids	122
A2 Figure 5	Neurotensin-induced endocannabinoid release does not seem to play a role in the induction of long term potentiation in VTA dopamine neurons	123
A2 Supp Figure 1	Neurotensin induced a significant increase in membrane current variance, presumably due to NT2 receptor activation	124

Liste des abréviations

2-AG:	2-Arachidonoylglycérol
AMP:	Adénosine monophosphate
AMPA:	α -Amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
AP5:	D-2-amino-5-phosphonopentanoate
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adénosine triphosphate
ATV:	Aire tegmentaire ventrale
BAPTA:	Acide 1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacétique
BNST:	Noyau du lit de la strie terminale
CaMKII:	Protéine kinase dépendante de la calcium/calmoduline II
CB:	Récepteur des endocannabinoïdes
CNQX:	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
COMT:	Catéchol-O-méthyle transférase
CPP:	Acide 3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonique
CPSE:	Courants postsynaptiques excitateurs
DAG:	Diacylglycérol
DAG-L:	Diacylglycérol-lipase
DARPP-32:	Phosphoprotéine régulé par la dopamine et l'AMP cyclique
DAT:	Transporteur de la dopamine
DLT:	Dépression à long terme
DNQX:	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione
ECs:	Endocannabinoïdes
ERK:	Kinase régulée par les signaux extracellulaires
FAAH:	Hydrolase des amides d'acides gras
GABA:	Acide gamma-aminobutyrique

GFP:	Protéine verte fluorescente
HVA:	Acide homovanillique
IP3:	Inositol trisphosphate
KO:	Knock-out
L-DOPA:	L-dihydroxyphenylalanine
LSD:	Diéthylamide de l'acide lysergique
MAO:	Mono-amine oxydase
MAPK:	La protéine kinase activée par les mitogènes
mGluRs:	Récepteurs métabotropes du glutamate
MSN:	Neurones épineux moyens
Nacc:	Noyau accumbens
NArPE:	N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine
NET:	Transporteur de la norépinéphrine
NMDA:	N-méthyl-D-aspartate
NT:	Neurotensine
NTS:	Récepteur de la neurotensine
PCP:	Phencyclidine
PKA:	Protéine kinase dépendant de l'AMP cyclique
PKC:	Protéine kinase C
PLC:	Phospholipase C
PLT:	Potentialisation à long terme
PPSEs:	Potentiels postsynaptiques excitateurs
SERT:	Transporteur de la sérotonine
TH:	Tyrosine hydroxylase
THL:	Tétrahydrolipstatine
VGLUT:	Transporteur vésiculaire du glutamate
VMAT2:	Transporteur vésiculaire des monoamines type 2

*Opgedragen aan mijn ouders, vanwege hun
onvoorwaardelijke steun en liefde*

*A mes parents, pour leur support et leur amour
inconditionnel*

Remerciements

La réalisation d'un programme de doctorat et l'écriture d'une thèse n'est pas une tâche qui est habituellement accomplie seul. Derrière chaque étudiant espérant réussir, il y a tout un groupe de personnes importantes qui le pousse et le motive pour faire de son mieux. J'aimerais tout d'abord remercier mon superviseur, le Dr Louis-Eric Trudeau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, malgré mon manque d'expérience, pour avoir patienté pendant les périodes plus difficiles, pour m'avoir poussé à faire plus et à réaliser un travail de qualité. Il possède une passion inspirante pour la science et il est toujours disponible pour ses étudiants.

Je remercie les membres du jury pour avoir lu et révisé ce manuscrit. Je tiens à remercier les membres de mon comité de parrainage, les Dr Jean-Claude Lacaille et Vincent Castellucci, qui m'ont toujours dirigé dans la bonne direction et qui ont été une source d'inspiration pendant toutes mes études à l'Université de Montréal.

J'aimerais remercier tous les membres de labo que j'ai eu le plaisir de côtoyer et qui ont fait en sorte que mon lieu de travail a toujours été agréable et motivant. Une mention spéciale pour Marie-Josée Bourque, la 'maman du labo', ainsi que mes collègues-amis: Caroline Fasano, Dominic Thibault, Guillaume Fortin, Damiana Leo et Chiara Zullian. J'ai toujours apprécié votre amitié et soutien. Un merci personnel à Minas Al-Baghdadi, dont le passage au labo a été bien trop court.

Finalement, un énorme merci à mes parents Ike Kortleven et Annet Kortleven-Kamphuis, mes frères Nathan et Matthias et tous mes amis hors du laboratoire. Il est difficile à exprimer à quelle point vous avez été importants dans la réalisation de cette phase importante de ma vie adulte. Sans vous et votre soutien inconditionnel, je n'aurais jamais eu le courage de persister tout au long de ce programme de doctorat.

Introduction

Cette thèse de doctorat s'intéresse au système dopaminergique central, particulièrement la région A10, également appelée aire tegmentaire ventrale (ATV), ainsi qu'à la plasticité des synapses glutamatergiques excitatrices qui innervent les neurones dopaminergiques.

La découverte et la caractérisation de la dopamine comme neurotransmetteur résulte en grande partie de travaux de recherche effectués en Suède. En particulier, Arvid Carlsson est souvent considéré 'le père de la dopamine' car ses expériences ont mené à l'identification de la dopamine comme neurotransmetteur. Il a reçu le prix Nobel de médecine pour ces travaux en 2000. D'autres chercheurs Suédois, incluant entre autres Ungerstedt, Dahlström, Fuxe, Falck, Björklund, Lindvall, Hökfelt et Hillarp ont continué ces travaux et ont développé des techniques spécialisées permettant de cartographier le système dopaminergique central.

Suite à un petit survol de la dopamine et des voies dopaminergiques, j'aborderai les drogues d'abus, qui agissent sur le système dopaminergique, la transmission synaptique glutamatergique, la potentialisation à long terme des synapses glutamatergiques et aussi les effets des drogues d'abus sur les synapses glutamatergiques établies sur les neurones dopaminergiques de l'ATV. Je discuterai ensuite des endocannabinoïdes et de la neurotensine comme modulateurs potentiels de la transmission glutamatergique et sa plasticité dans l'ATV.

Partie 1 : Voies dopaminergiques et drogues d'abus

1.1 La dopamine

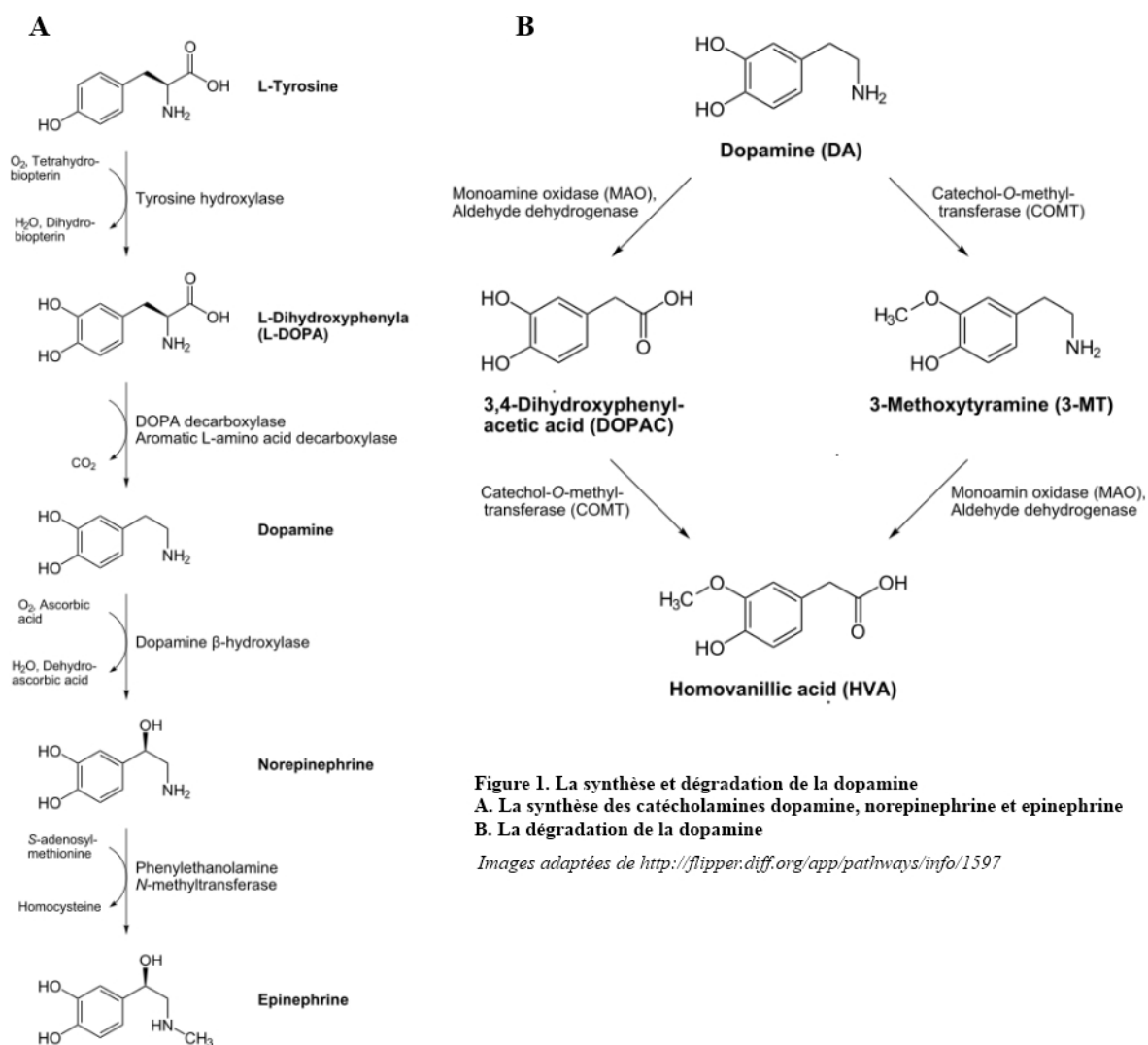
Depuis les expériences clés qui ont mené à la découverte de la dopamine comme neurotransmetteur, plutôt que simplement comme un intermédiaire dans la synthèse de la norépinephrine et l'épinephrine (Carlsson *et al*, 1957; Carlsson *et al*, 1958), et à la cartographie de sa distribution dans le cerveau suite au développement de la technique d'histofluorescence (Falck *et al*, 1962), nous avons énormément appris sur cette catécholamine. De nombreux travaux ont ensuite décrit sa synthèse, les régions du cerveau où elle est produite, les zones de projection des axones des neurones dopaminergiques et les types de récepteurs que la dopamine active. Finalement, le rôle important de la dopamine dans la motivation, la récompense et la locomotion a été décrit, ainsi que les rôles physiopathologiques de ce système de neurotransmission. Dû à leur implication dans certaines maladies importantes comme la schizophrénie, la maladie de Parkinson et la toxicomanie, les systèmes dopaminergiques centraux du cerveau ont été la cible de beaucoup d'attention depuis une cinquantaine d'années.

La dopamine est un neurotransmetteur membre de la famille des catécholamines. Elle est synthétisée à partir de la L-tyrosine, tout comme la norépinephrine et l'épinephrine. La L-tyrosine est convertie en L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH). Cette enzyme est l'enzyme limitante dans la synthèse de la dopamine. L'activité enzymatique de la TH requiert la présence d'un cofacteur, la tétrahydrobioptérine. La L-DOPA est ensuite convertie en dopamine par l'enzyme DOPA décarboxylase. Dans les cellules qui produisent la norépinephrine, la dopamine est ensuite convertie en norépinephrine par la dopamine beta-hydroxylase. L'épinéphrine, la troisième et dernière catécholamine, est produite par la conversion de la norépinephrine via la phényléthanolamine-N-méthyl transférase (Fig.1a). La dopamine peut être métabolisée par deux types de monoamine oxydase, MAO-A et MAO-B, ainsi que par la catéchol-O-

méthyle transférase (COMT). La combinaison de ces deux enzymes réduit la dopamine en l'acide homovanillique (HVA) (Fig. 1b).

La dopamine, une fois synthétisée dans un neurone, est stockée dans des vésicules à l'aide du transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2). En réponse à un potentiel d'action, la dopamine est libérée dans le milieu extracellulaire, où elle peut activer des récepteurs synaptiques ou extra-synaptiques. La dopamine agit sur des récepteurs couplés aux protéines G. Il existe deux familles de récepteurs à la dopamine : les récepteurs de type D1, incluant les récepteurs D1 et D5, ainsi que les récepteur de type D2, incluant les récepteurs D2, D3 et D4. Les récepteurs de type D1 sont couplés aux protéines G de type Gs, qui stimulent l'adénylate cyclase, menant à la production d'adénosine monophosphate (AMP) cyclique. Les récepteurs de type D2 sont couplés aux protéines Gi/o, qui inhibent l'adénylate cyclase, diminuant ainsi la production de l'AMP cyclique. Les deux familles de récepteurs à la dopamine ont donc typiquement des effets opposés sur la voie de signalisation de la protéine kinase A, une voie de signalisation classique.

La signalisation dopaminergique dans le cerveau est terminée principalement par la recapture de la dopamine dans les neurones dopaminergiques via le transporteur membranaire de la dopamine (DAT). La dopamine non-capturée et/ou non-stockée est métabolisée tel que décrit précédemment.



1.2 Les voies dopaminergiques

Comme mentionné précédemment, la technique de l'histofluorescence a permis de visualiser la dopamine dans les neurones et leurs prolongements dendritiques et axonaux, permettant ainsi la cartographie des voies dopaminergiques dans le cerveau. Cette technique, nommée la méthode 'Falck-Hillarp', se base sur la conversion de la dopamine et de la norépinephrine en iso-quinolines suite à l'exposition de tissus cérébraux à des vapeurs de formaldéhyde. Ces iso-quinolines émettent de la fluorescence d'une couleur vert/jaune,

ce qui permet de la détecter à l'aide d'un microscope à fluorescence. Des modifications de cette technique, développées par Lindvall et Björklund, ont augmenté la précision et la sensibilité (Lindvall & Björklund, 1974a, b). Cette méthode de révélation est restée la technique de choix pour la visualisation anatomique des catécholamines jusqu'au développement de la technique d'immunohistochimie dans les années 80.

Les régions du cerveau qui contiennent les neurones catécholaminergiques ont été identifiées A1 à A17, les premières 12 initialement par Dahlström et Fuxe (Dahlstrom & Fuxe, 1964), les 5 dernières par Hökfelt et collaborateurs (Hökfelt *et al*, 1984b). Les distinctions entre ces groupes sont basées sur leur localisation dans le cerveau, la morphologie des cellules, ainsi que leurs voies de projection distinctes. Les premiers sept noyaux sont noradrénergiques (A1-A7) et les dix suivants dopaminergiques (A8 à A17). Les noyaux A8, A9 et A10 contiennent environ 90% des neurones dopaminergiques du cerveau et sont localisées dans le mésencéphale ventral. Il s'agit du noyau rétro-rubral, de la substance noire et de l'aire tegmentaire ventrale (ATV), respectivement.

Cinq noyaux dopaminergiques sont localisés dans le diencephale: le noyau diencephalique caudal (A11), le noyau arqué (A12), la zona incerta (A13), le noyau paraventriculaire hypothalamique (A14) et le noyau de la strie terminale (A15). Finalement, on peut retrouver des neurones dopaminergiques dans le bulbe olfactif (les cellules périglomérulaires; A16) et la rétine (cellules dans la couche nucléaire intérieure; A17) (Albanese *et al*, 1986; Hökfelt *et al*, 1984b; Lindvall *et al*, 1984) (Fig. 2).

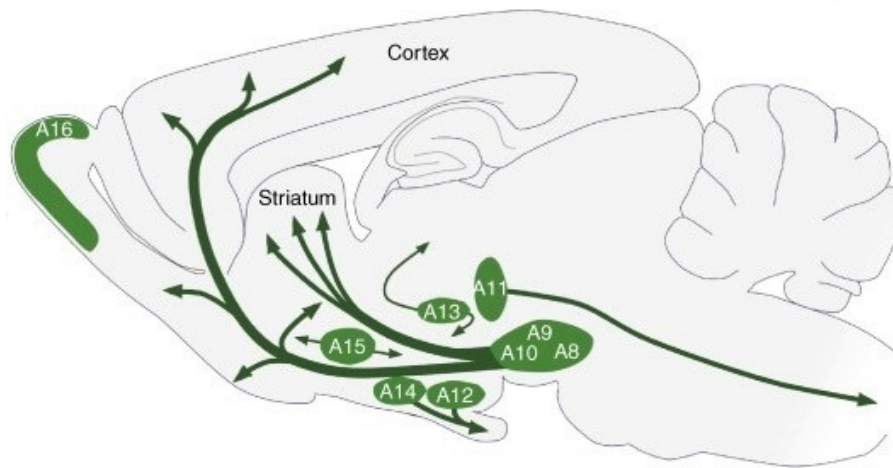
En 1971, Ungerstedt a identifié trois voies de projection principales du système dopaminergique central, utilisant la méthode Falck-Hillarp (Ungerstedt, 1971). Ces trois voies sont la voie nigro-striée, la voie méso-limbique et la voie tubéro-infundibulaire. Plus tard on a décrit la voie méso-corticale (Lindvall & Björklund, 1974; Lindvall *et al*, 1977) (Fig. 2).

La voie nigro-striée projette de la substance noire (et minoritairement de l'ATV et du noyau rétro-rubral) au striatum et elle est impliquée dans la régulation du mouvement. Ce sont surtout les neurones dopaminergiques de cette voie qui dégèrent dans la maladie de Parkinson, entraînant ainsi les troubles moteurs sévères associés à cette pathologie.

Les neurones dopaminergiques des voies méso-limbiques et méso-corticales sont localisés dans l'ATV. Environ 55% des neurones de cette région sont dopaminergiques (Margolis *et al*, 2010; Margolis *et al*, 2006), les autres étant surtout des neurones qui utilisent l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur. Les axones de ces neurones dopaminergiques projettent principalement vers le striatum ventral ou noyau accumbens (Nacc), ainsi que vers le septum, l'hippocampe et l'amygdale, ce qui constitue la voie méso-limbique. Les neurones de l'ATV projettent aussi vers le cortex préfrontal, ce qui forme la voie méso-corticale. Ces voies sont quelque fois regroupées sous le vocable « voie méso-corticolimbique ». Bien plus qu'un simple système de récompense, cette voie est un système complexe impliqué dans la motivation, la mémoire, la cognition et l'apprentissage, le conditionnement et la prédiction de la récompense (Salamone *et al*, 2005). Il n'est donc pas surprenant que les drogues d'abus, tant associées à la récompense, agissent fortement sur ce système.

Finalement, la voie tubéro-infundibulaire a ses origines dans le noyau arqué de l'hypothalamus et se termine dans l'éminence médiane de l'hypothalamus. Cette voie, lorsqu'activée, stimule la libération de l'hormone prolactine par l'hypophyse antérieure.

Les travaux de cette thèse d'intéresseront surtout aux neurones dopaminergiques de l'ATV, ainsi qu'aux facteurs qui régulent la force des synapses glutamatergiques établies sur l'arborisation somatodendritique des neurones dopaminergiques de cette région.



*Figure 2. Les régions et voies dopaminergiques dans le cerveau du rat
Image adaptée de Björklund & Dunnett (2007)*

1.3 La toxicomanie, les drogues d'abus et le système dopaminergique

Dans cette section nous ferons un bref survol des caractéristiques de la toxicomanie, une pathologie qui implique le système dopaminergique méso-corticolimbique et des théories qui tentent de l'expliquer. Ensuite, les différentes classes de drogues d'abus et leur mécanisme d'action seront abordés, pour terminer avec une revue sur les effets de ces drogues à long terme sur le système dopaminergique.

1.3.1 La toxicomanie

La toxicomanie est caractérisée par une prise de drogues d'abus persistante et compulsive, malgré des effets néfastes sur le fonctionnement social de la personne. L'individu se trouve souvent emprisonné dans un cercle vicieux de prise de drogues chronique, suivi par des périodes d'abstinence, puis de rechute. Il y a plusieurs théories qui tentent d'expliquer le phénomène de la toxicomanie. A titre d'exemple, la théorie du renforcement négatif (par exemple Dackis & Gold, 1985) stipule que ce sont les effets

négatifs qui suivent l'arrêt de la prise de drogue qui sont responsables du désir de consommer à nouveau la drogue. Le concept de tolérance, phénomène par lequel la prise répétée d'une drogue est associée à une diminution de l'intensité des effets de celle-ci, ainsi que les symptômes de sevrage sont centraux à cette théorie. Une théorie importante, développée par Koob et Le Moal est celle de l'allostase hédonique. Cette théorie propose que la prise de drogue induit des changements homéostatiques graduels dans le système motivationnel ce qui détériore graduellement l'état affectif du sujet pendant les périodes d'abstinence, poussant ainsi la personne à rechercher de plus en plus activement la drogue via le processus du renforcement négatif (Koob & Le Moal, 2001, 2005, 2008a, b). La théorie du renforcement positif est centrée sur les effets directs et forts désirables des drogues d'abus (par exemple Wise, 1988; Wise & Bozarth, 1987). Elle propose que ce soient les effets positifs des drogues qui maintiennent la dépendance.

Malgré la simplicité et l'apparente logique de ces deux théories, il existe des problèmes avec chacune. La rechute peut arriver des années après l'arrêt de la prise de drogue, ce qui est incompatible avec la théorie du renforcement négatif. Aussi, il y a des drogues qui ne causent pas d'effet euphorique important, tel que la nicotine, ce qui n'est pas particulièrement compatible avec la théorie de renforcement positif.

La théorie dominante actuellement est la théorie de la sensibilisation et de la motivation ("incentive-sensitization theory") (Robinson & Berridge, 1993, 2000, 2008). Elle propose que la prise répétée de drogues d'abus puisse causer chez certains individus prédisposés des changements neurobiologiques très importants et persistants dans le système de motivation. Cette hypothèse est centrée sur la sensibilisation, la contrepartie de la tolérance, c'est à dire le phénomène par lequel certains effets des drogues augmentent en intensité suite à l'administration répétée de ces drogues. Bien qu'une tolérance pour les effets positifs des drogues se produise suite à la prise répétée, ce que devrait être associé à une diminution de l'effet hédonique, ce serait la volonté d'obtenir la drogue qui est sensibilisée. Ainsi, le système de motivation devient dirigé vers l'obtention de la drogue. La voie méso-corticolimbique serait une composante clé de ce système de motivation affecté par les drogues d'abus (Robinson & Berridge, 1993, 2000, 2008). Cette théorie est appuyée

par de nombreuses données expérimentales, pour la plupart obtenues chez les rongeurs. Par exemple, Grimm *et al* (2001) ont montré que des souris qui ont appris à obtenir de la cocaïne en réponse à une lumière en appuyant sur un levier appuient plus fréquemment sur ce levier après une période d'abstinence, suite à une présentation de la lumière. Par ailleurs, plus longue est la période d'abstinence, plus élevé est le nombre de réponses suite à la présentation de la lumière. Il semble donc y avoir une sensibilisation de la volonté à obtenir la drogue. De plus, il est bien établi que l'administration répétée de drogues d'abus chez les animaux de laboratoire produit une sensibilisation de l'activation locomotrice (e.a. Anagnostaras & Robinson, 1996; Badiani *et al*, 1997; Vezina & Queen, 2000), prouvant qu'une sensibilisation de certains effets des drogues d'abus peut se produire suite à la prise répétée de ces drogues.

En terminant, il est important de noter que chacune de ces théories est basée sur une grande quantité de données scientifiques et qu'elles ne sont pas mutuellement exclusives. En fait, il est fort probable que la théorie de Koob et Le Moal et la théorie de Robinson et Berridge représentent les deux côtés de la médaille qu'est la toxicomanie.

De nombreux travaux suggèrent que la sensibilisation à l'effet comportemental et l'effet de récompense des drogues d'abus résulte de la plasticité synaptique dans le système dopaminergique. Cette plasticité semble faire appel à des mécanismes cellulaires et moléculaires communs à ceux impliqués dans l'apprentissage et de la mémoire.

1.3.2 Les drogues d'abus

Les drogues d'abus sont souvent classées en sous-groupes, selon leur mécanisme d'action. Les principaux sous-groupes sont les opiacés (incluant la morphine et l'héroïne), les psychostimulants (tels que la cocaïne et les amphétamines), les cannabinoïdes (par exemple le Δ^9 -tetrahydrocannabinol), la nicotine, les sédatifs et anxiolytiques (par exemple l'alcool et les barbituriques), les hallucinogènes (comme le LSD) et finalement les drogues à action dissociatives (incluant entre autre la kétamine et le PCP) (Wolf, 2006). Dans cette section, nous discuterons brièvement des classes de drogues les plus importantes et les plus étudiées, ainsi que leurs effets sur le système dopaminergique méso-corticolimbique, ce qui

est essentiel pour mettre en contexte les travaux réalisés dans cette thèse. Pour une revue de la classification des drogues d'abus et de leurs actions sur le système dopaminergique méso-corticolimbique, voir Luscher & Ungless (2006).

Les opiacés sont des drogues dérivées de l'opium. Ils agissent sur les récepteurs de type μ , δ et κ qui sont normalement activés par les opioïdes endogènes, des peptides incluant l'endorphine, les enképhalines, les dynorphines et les endomorphines. Leurs récepteurs sont des récepteurs couplés aux protéines Gi/o, comme les récepteurs à la dopamine de type D2, et ils ont un effet inhibiteur sur les neurones via l'inhibition des canaux calciques et de l'adénylate cyclase et via l'activation de certains canaux potassiques. Les effets renforçants de la morphine et de l'héroïne passent surtout par les récepteurs de type μ , identifiés pour la première fois en 1973 (Pert & Snyder, 1973). Ces récepteurs sont entre autre présents sur les neurones GABAergiques qui inhibent les neurones dopaminergiques de l'ATV. Ainsi, en inhibant les neurones GABAergiques, les opiacés désinhibent les neurones dopaminergiques (Johnson & North, 1992a), augmentant leur taux de décharge et la libération de dopamine dans le cerveau (Fig. 3).

Les psychostimulants agissent principalement sur les transporteurs de la dopamine (DAT), de la sérotonine (SERT) et de la norépinephrine (NET), induisant une augmentation de la concentration extracellulaire de ces neurotransmetteurs (Fig. 3). La cocaïne agit comme inhibiteur de DAT, SERT et NET. Bien que son action renforçante soit souvent attribuée à son action sur le DAT et l'augmentation de la libération de la dopamine, il semble son action sur le NET peut prendre cette place dans certaines circonstances: dans des souris '*knockout*' (KO) qui ne possèdent pas de DAT, caractérisées pour la première fois par Giros *et al* (1996), la cocaïne possède toujours un effet renforçant, ce qui est démontré par le fait qu'elles s'auto-administrent toujours de la cocaïne (Rocha *et al*, 1998) et qu'elles montrent une préférence pour des environnements qui ont été associés à la prise de la drogue ('*conditioned place preference*', ou CPP) (Sora *et al*, 1998). Il semble que dans ces souris KO le transporteur NET augmente la dopamine dans le Nacc (Carboni *et al*, 2001), suggérant que le NET prend la place du DAT dans ces souris KO. Les amphétamines

agissent aussi sur le DAT, le SERT et le NET. Par contre, les amphétamines ne fonctionnent pas toutes uniquement via le blocage de ces transporteurs; elles engendrent additionnellement un reversement de ces transporteurs, permettant ainsi à la dopamine présente dans le cytosol d'être expulsée vers le milieu extracellulaire (Sulzer *et al*, 1995). Par ailleurs, les amphétamines sont aussi des bases faibles, capables d'entrer dans les vésicules synaptiques et de dissiper le gradient de pH nécessaire au fonctionnement de VMAT2. Ceci cause une 'fuite' des neurotransmetteurs de ces vésicules, ce qui fait qu'il y a plus de monoamines disponibles pour le transport inverse (Sulzer *et al*, 1995).

Les cannabinoïdes sont des substances qui activent les récepteurs des endocannabinoïdes (ECs), des lipides présents naturellement dans le système nerveux central. Ces récepteurs, le CB1 et le CB2, sont des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques de type $G_{i/o}$. Le récepteur CB1, qui est le plus abondant dans le cerveau, est localisé principalement sur les terminaisons axonales. Une fois activé par des ligands, le récepteur CB1 diminue la libération de neurotransmetteur de la terminaison. Dans l'ATV, où le CB1 est présent sur les afférences excitatrices et inhibitrices (Matyas *et al*, 2008), l'action prédominante globale des cannabinoïdes est de désinhiber les neurones dopaminergiques en réduisant la libération de GABA (French *et al*, 1997) (Fig. 3). Le système des ECs sera décrit en plus de détail dans la partie 3 de l'introduction de cette thèse.

La nicotine est considérée être la substance la plus importante dans l'établissement d'une dépendance au tabac. Elle agit sur des récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique. Une forte densité de fibres cholinergiques se retrouve dans l'ATV (Cornwall *et al*, 1990; Satoh & Fibiger, 1986), en position privilégiée pour réguler l'activité des neurones dopaminergiques. En stimulant les récepteurs nicotiniques dans l'ATV, la nicotine augmente le taux de décharge des neurones de l'ATV (Grenhoff *et al*, 1986) (Fig. 3).

L'éthanol (alcool) est une substance qui interagit avec un très grand nombre de récepteurs. Elle influence entre autre l'activation des récepteurs GABAergiques de type A (Fig. 3) et les récepteurs glutamatergiques de type NMDA. L'éthanol augmente la fonction des récepteurs GABAergiques de type A de façon allostérique. L'inverse est vrai en ce qui

concerne son action sur les récepteurs NMDA: l'éthanol, une fois lié au récepteur NMDA, diminue l'effet excitateur du glutamate. À faible dose, l'éthanol augmente le taux de décharge des neurones de l'ATV (Brodie *et al*, 1990; Gessa *et al*, 1985).

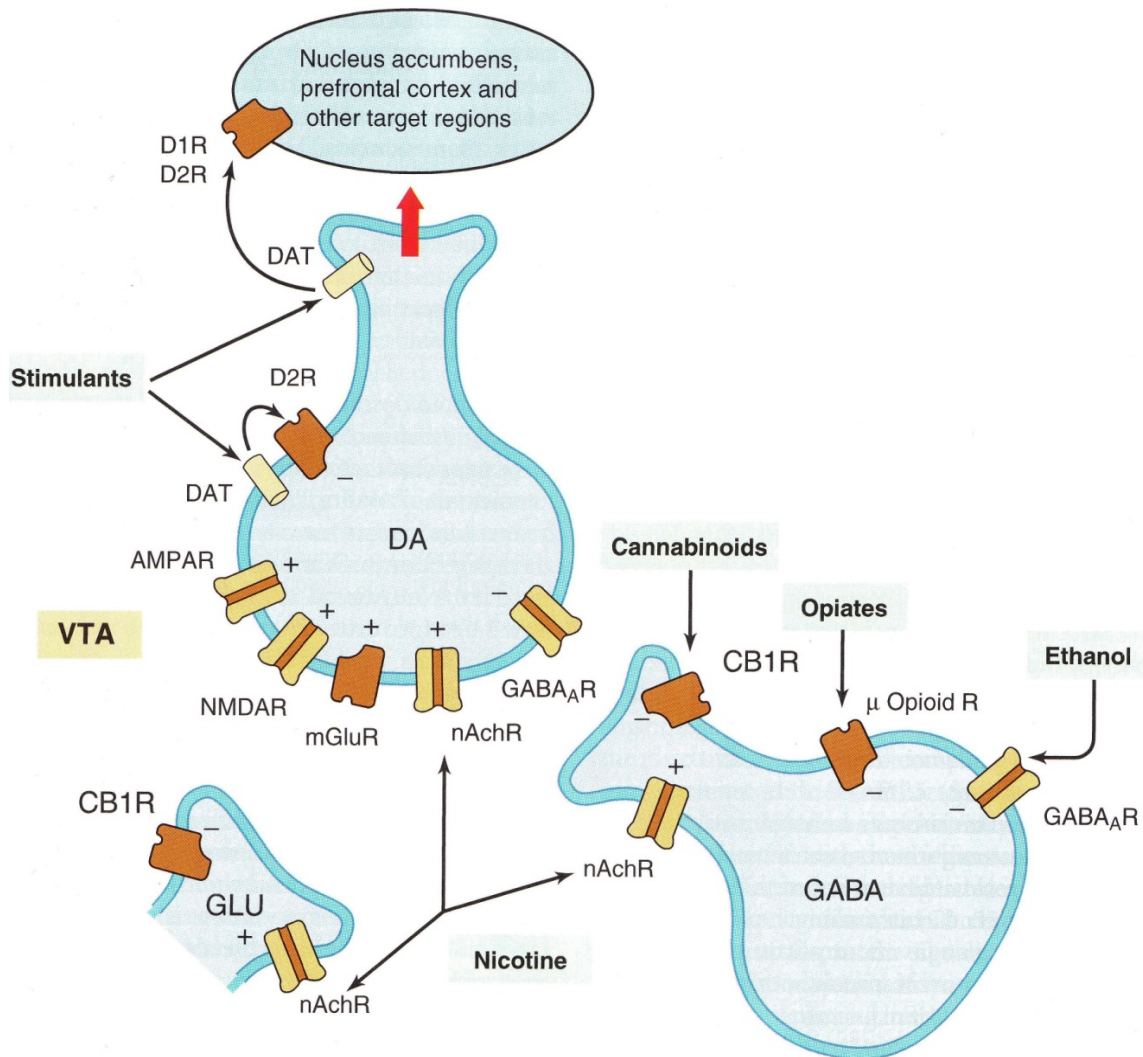


Figure 3. Un schéma simplifié du mode d'action des drogues d'abus. Toutes les grandes classes de drogues augmentent la libération de la dopamine dans le noyau accumbens

Image adaptée de Wolf (2006)

Partie 2: La transmission glutamatergique et la potentialisation à long terme.

Dans cette section nous discuterons du neurotransmetteur glutamate; son métabolisme, sa libération et sa distribution dans l'ATV. Ensuite, nous aborderons la potentialisation à long terme (PLT) des synapses glutamatergiques, son implication dans les premières théories neurobiologiques de la mémoire et de l'apprentissage, sa découverte et ses mécanismes et finalement son rôle dans les actions des drogues d'abus sur le système dopaminergique et plus particulièrement dans l'ATV.

2.1 Le glutamate

Le glutamate est un acide aminé et le neurotransmetteur excitateur principal du cerveau. Jusqu'à 80-90% des synapses du cerveau sont glutamatergiques (Braitenberg & Schüz, 1998). Il agit sur plusieurs classes de récepteurs, qui seront discutées en détail plus tard. Outre son rôle comme neurotransmetteur, le glutamate possède bien d'autres rôles, entre autre dans le métabolisme cellulaire, dans la synthèse des protéines et dans la synthèse du GABA, le neurotransmetteur inhibiteur principal du cerveau.

La production de glutamate dérive du glucose, de l'aspartate ou de la glutamine. La première voie implique le cycle de Krebs: le glucose est glycolysée en acétyl-CoA, un constituant de ce cycle. L'oxaloacétate, un autre constituant du cycle de Krebs, peut être produit à partir de l'aspartate, à l'aide de l'aspartate aminotransférase. Le glutamate est synthétisé à partir de l' α -cétoglutarate par le glutamate déshydrogénase (Fig. 4). L'autre voie de synthèse du glutamate est plus simple. La glutamine, elle-même un produit de la conversion du glutamate par la glutamine synthétase, peut être reconvertie en glutamate via la glutaminase, une enzyme mitochondriale présente en abondance dans les astrocytes et dans les terminaisons glutamatergiques (Fig. 4). Il est intéressant de noter que des souris KO qui n'expriment pas de glutaminase meurent une journée après la naissance. Il ne semble pas y avoir de réduction de la libération spontanée de glutamate, mais la libération

de glutamate évoquée est diminuée dans des cultures de neurones préparées à partir de ces souris (Masson *et al*, 2006). Il semble donc que le cycle glutamate-glutamine soit essentiel pour la libération soutenue de glutamate.

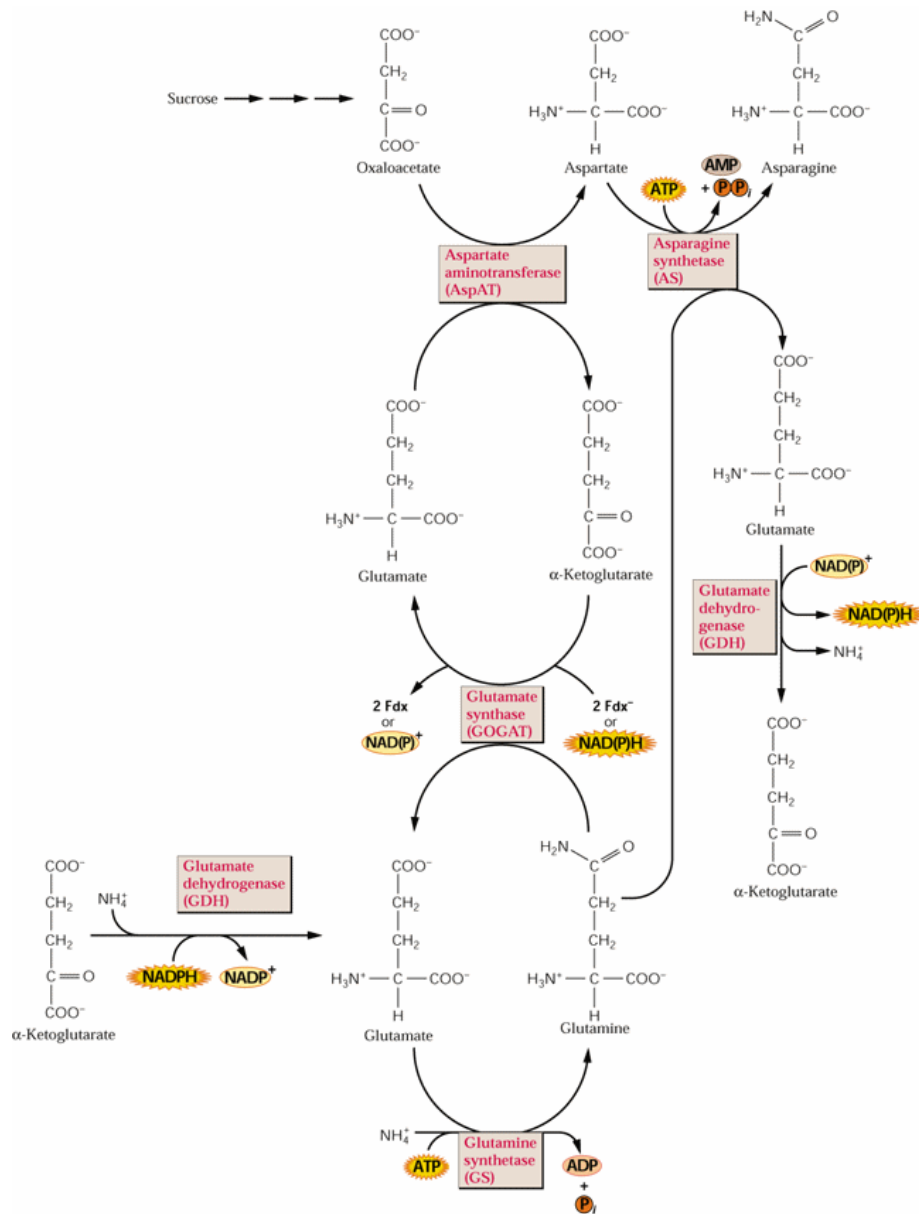


Figure 4. Schéma des différentes voies de synthèse du glutamate. Figure tirée de http://www.uky.edu/~dhild/biochem/24/fig8_04.png

Le glutamate, une fois synthétisé, est emmagasiné dans des vésicules synaptiques grâce aux transporteurs vésiculaires de glutamate (VGLUT). Trois types de VGLUT, ont été identifiés à ce jour (Gras *et al*, 2002; Hisano *et al*, 2000; Ni *et al*, 1994; Schafer *et al*, 2002). La distribution des VGLUT1 et VGLUT2 est plutôt ségréguée: l'ARN messager du VGLUT1 est surtout présent dans des structures corticales, tandis que l'ARN messager du VGLUT2 est exprimé surtout dans des régions sous-corticales (Herzog *et al*, 2001; Fig. 5).

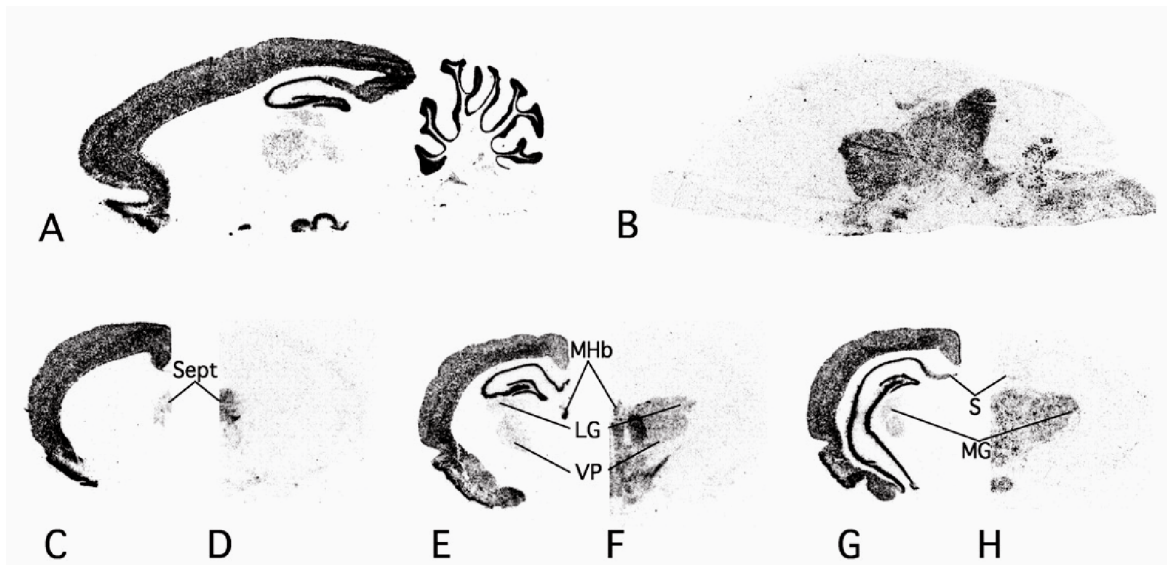


Figure 5. Distribution de l'ARNm de VGLUT1 et VGLUT2 dans le cerveau. VGLUT1 est surtout exprimé par les neurones corticaux (A,C,E,G), tandis que VGLUT2 est surtout exprimé dans les régions sous-corticales (B, D, F, H). Figure adaptée de Herzog *et al* (2001).

VGLUT3 possède une distribution très différente de celle de VGLUT1 et -2. L'ARN messager de VGLUT3 est retrouvé dans des populations éparées de neurones dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus. Mais plus intéressant, il se retrouve aussi dans des neurones de régions qui auparavant n'était pas considérées glutamatergiques, notamment le striatum, dans des interneurones cholinergiques, et le raphé dorsal, dans des neurones sérotoninergiques (Fremeau *et al*, 2002; Schafer *et al*, 2002). La découverte de

cette expression étonnante a mené à de nombreux travaux récents appuyant le concept intéressant de la co-transmission, phénomène par lequel les neurones peuvent libérer plus d'un type de neurotransmetteur, incluant le glutamate (El Mestikawy *et al*, 2011). Ceci n'est pas limité à VGLUT3; à titre d'exemple, l'expression de VGLUT2 dans une sous-population de neurones dopaminergiques et la libération du glutamate de ceux-ci est maintenant bien établi, en grande partie par des travaux entrepris à l'Université de Montréal (Dal Bo *et al*, 2004; Mendez *et al*, 2008).

Dans les neurones glutamatergiques, la libération de glutamate se produit à partir des terminaisons axonales suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, ce qui induit l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant, l'entrée de calcium, puis finalement la fusion avec la membrane présynaptique des vésicules remplies de glutamate. Le glutamate ainsi libéré diffuse dans la fente synaptique pour mener à l'activation des récepteurs du glutamate. Le glutamate peut aussi être recapturé par les astrocytes, un mécanisme important qui évite l'excitotoxicité causée par un excès de glutamate (e.a. Frandsen & Schousboe, 1990). Cette recapture se fait surtout via les transporteurs d'acides aminés excitateurs, via un gradient sodique et potassique. Une fois dans les astrocytes, le glutamate peut être transformé en glutamine, qui pourra ensuite être retournée dans les neurones, où la glutamine peut-être reconvertie en glutamate (Danbolt, 2001). Ce 'cycle glutamine-glutamate', bien que sur-simplifié, est considéré une des sources principales de glutamate neuronal et une des diverses destinations métaboliques du glutamate libéré par les neurones (McKenna, 2007).

2.2 Les récepteurs du glutamate

Le glutamate libéré dans la fente synaptique peut se lier à plusieurs récepteurs postsynaptiques, ainsi que présynaptiques. Il existe deux classes de récepteurs au glutamate, soit les récepteurs ionotropes et les récepteurs métabotropes. A l'intérieur de ces classes, il existe plusieurs sous-types de récepteurs. Dans la classe des récepteurs ionotropes, qui sont exprimés dans tout le cerveau (Monaghan *et al*, 1989), on inclut les récepteurs AMPA, NMDA et kaïnate. Dans la classe des récepteurs métabotropes, qui sont des récepteurs

couplés aux protéines G, on a identifié 8 sous-types (mGluR1-8). Dans cette section, nous effectuerons un survol de chaque type principal de récepteurs au glutamate, avec un aperçu de leur fonctionnement et de leur pharmacologie.

2.2.1 Les récepteurs AMPA

Les récepteurs au glutamate sensibles à l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazoleproprionate (AMPA) sont des récepteurs ionotropes, c'est-à-dire que structurellement, il s'agit de canaux possédant un site de liaison pour le glutamate. Le canal cationique s'ouvre quand le glutamate se lie au récepteur et se referme rapidement après, ce qui permet une brève entrée de cations. Les récepteurs AMPA sont ainsi responsables de la plus grande partie de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le cerveau.

Ces récepteurs sont très répandus dans le cerveau et sont surtout localisés dans les épines dendritiques, dans la densité postsynaptique, une zone de l'épine qui forme un contact synaptique avec une terminaison axonale. Ces récepteurs se retrouvent sous la forme d'hétéro-tétramères incluant quatre types de sous-unités différentes (GluR1-GluR4). Les différences entre les combinaisons de ces sous-unités peuvent avoir des conséquences fonctionnelles importantes: par exemple, un récepteur AMPA qui ne contient pas de sous-unité GluR2 forme un canal perméable au calcium (Burnashev *et al*, 1992; Hollmann *et al*, 1991), tandis que les récepteurs AMPA qui contiennent une sous-unité GluR2 ne sont pas perméables au calcium, étant surtout perméables sodium et au potassium. Les récepteurs AMPA peuvent être modulés par la phosphorylation, ce qui peut changer la dynamique de l'ouverture du canal du récepteur (Smart, 1997), ainsi que son insertion dans la membrane plasmique (Lee, 2006).

Les récepteurs AMPA sont bloqués entre autre par les antagonistes compétitifs 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) et 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) (Monaghan *et al*, 1989).

2.2.2 Les récepteurs NMDA

Les récepteurs du glutamate sensibles au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) sont aussi des récepteurs ionotropes, mais ils diffèrent des récepteurs AMPA de plusieurs façons importantes. L'activation de ces récepteurs par le glutamate n'entraîne pas nécessairement l'ouverture du canal cationique. Le récepteur possède aussi un site de liaison pour la glycine ou la D-sérine; ce site doit nécessairement être occupé afin de permettre l'ouverture du canal par le glutamate (Kleckner & Dingledine, 1988). Ce canal cationique est perméable au sodium, au potassium et au calcium. Les récepteurs NMDA sont des hétéro-tétramères qui incluent toujours la sous-unité NR1 et une combinaison des sous-unités NR2A-NR2D et/ou NR3A et NR3B (Furukawa *et al*, 2005). La cinétique d'ouverture des récepteurs NMDA est un peu plus lente que celle des récepteurs AMPA, ce qui fait que le courant cationique démarre plus lentement et se termine aussi plus lentement.

Il existe une autre différence très importante entre les récepteurs NMDA et AMPA. Le canal cationique du récepteur NMDA est bloqué par le magnésium extracellulaire lorsque le potentiel membranaire du neurone est hyperpolarisé (Nowak *et al*, 1984). À partir d'un potentiel membranaire plus négatif qu'environ -50 mV, ce blocage est quasi-complet. Ceci implique donc que la dépolarisation cellulaire soit nécessaire afin de permettre le flux ionique à travers ce récepteur. Cette dépendance indirecte du récepteur NMDA envers le potentiel membranaire, ainsi que la perméabilité calcique de ce canal sont des variables très importantes dans la plasticité aux synapses glutamatergiques, ce qui sera discuté en plus de détails dans la section sur la PLT.

Les récepteurs NMDA sont entre autre sélectivement bloqués par les antagonistes compétitifs D-2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5) et l'acide 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-l-phosphonique (CPP) (Monaghan *et al*, 1989; Watkins *et al*, 1981) et l'antagoniste allostérique (et drogue d'abus) kétamine.

2.2.3 Les récepteurs de type kaïnate

Les récepteurs sensibles au kaïnate ont des propriétés pharmacologiques semblables aux récepteurs AMPA, bien qu'ils montrent une faible affinité pour l'AMPA (Monaghan *et al*, 1989). Ils sont bloqués par le CNQX et le DNQX. Ces récepteurs sont constitués de quatre sous-unités, parmi les 5 suivants : GluR5-7 et KA1 et KA2. Le tétramère (Chittajallu *et al*, 1999), qui possède toujours une sous-unité GluR, forme un canal perméable au sodium et au potassium. Tout comme les récepteurs AMPA, les récepteurs au kaïnate participent à la transmission synaptique excitatrice rapide.

2.2.4 Les récepteurs métabotropes

Tout comme les récepteurs de la dopamine, les récepteurs glutamatergiques métabotropes (mGluRs) sont des récepteurs à sept passages transmembranaires qui sont couplés aux protéines G hétérotrimériques. À ce jour, huit types de ces récepteurs ont été identifiés: mGluR1-mGluR8. Ces 8 récepteurs ont été classés dans 3 groupes distincts, basé sur le type de protéine G auxquels ils sont couplés ainsi que sur leur homologie de séquence (Conn & Pin, 1997). Les récepteurs du groupe 1, incluant des récepteurs mGluR1 et mGluR5 sont couplés à la protéine G_q, ce qui active la phospholipase C (PLC) et stimule la libération de calcium des stocks intracellulaires via la production de l'inositol trisphosphate (IP3). L'activation de la PLC produit aussi le diacylglycerol, qui peut contribuer au recrutement membranaire de la protéine kinase C, mais aussi être converti en 2-arachidonoylglycérol, un endocannabinoïde, qui sera abordé plus tard. Les récepteurs du groupe 2 (mGluR2 et mGluR3) et du groupe 3 (mGluR4, mGluR6-8) sont couplés aux protéines G_i et G_o qui inhibent l'adénylate cyclase via un mécanisme sensible à la toxine pertussique (Conn & Pin, 1997).

Les mGluRs sont localisés au niveau pré- et postsynaptique. Sur les terminaisons axonales, leur activation peut mener à l'inhibition des canaux calciques de type P/Q et ainsi à l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs (Takahashi *et al*, 1996).

2.3 La PLT: découverte d'un mécanisme neurobiologique de l'apprentissage

Les synapses glutamatergiques et les différents récepteurs du glutamate décrits ci-haut jouent un rôle fondamental non seulement dans le fonctionnement basal du cerveau, mais la plasticité de ces contacts est reconnue comme un mécanisme fondamental qui soutient la formation des souvenirs, la mémoire sous toutes ses formes ainsi que l'apprentissage.

La première théorie neurobiologique de la mémoire et de l'apprentissage date du 19^e siècle et a été proposée par Ramón y Cajal. Il a émis l'hypothèse que la mémoire nécessite une amélioration de la communication entre les neurones : « *[In this way,] associations already established among certain groups of cells would be notably reinforced* ». Plus tard, en 1949, Donald Hebb à Montréal a développé cette théorie, en postulant une hypothèse générale de l'apprentissage : « *When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.* » (Hebb, 1949). Souvent, cette théorie est résumée ainsi: « *Cells that fire together, wire together.* » ("Les cellules qui déchargent ensemble, sont reliées").

En même temps, il est devenu de plus en plus évident que l'hippocampe était un structure fortement impliquée dans la mémoire. Cette conclusion provient principalement d'études de lésions cérébrales. Par exemple, des patients souffrants d'épilepsie sévère et qui ne répondaient pas aux médicaments ont subis des chirurgies aux lobes temporaux du cortex. Ceci impliquait une ablation d'une partie, ou de l'entière de l'hippocampe. Suite à ces opérations, ces patients présentaient souvent des troubles de mémoire. Un de ces patients le plus connu et le plus étudié, Henry Molaison ou tout simplement HM, ayant perdu tout l'hippocampe, a été décrit comme souffrant d'une amnésie antérograde quasi-complète. C'est à dire qu'il n'était plus capable de former des nouvelles mémoires durables, bien que sa mémoire de travail et sa mémoire procédurale n'étaient pas affectées (Scoville & Milner, 1957).

Malgré l'importance de l'hippocampe, il était cependant nécessaire de comprendre les bases cellulaires de la plasticité fonctionnelle de cette structure dans le contexte de la formation de mémoires. En 1966, Terje Lømo découvre les premiers indices électrophysiologiques d'un changement dans l'efficacité synaptique à long terme dans l'hippocampe après stimulation électrique à haute fréquence. Il en a fait une caractérisation détaillée qu'il a publiée quelques années plus tard (Bliss & Lomo, 1973). Grâce à l'implication bien établie de l'hippocampe dans la mémoire et les hypothèses neurobiologiques de la mémoire et de l'apprentissage proposées à cette époque, cette publication a causé une véritable explosion de recherche sur ce phénomène appelé alors potentialisation à long terme (PLT). Jusqu'à aujourd'hui, la PLT reste un des mécanismes les plus étudiés dans les neurosciences et on a trouvé que ce mécanisme et sa contrepartie, la dépression à long terme (DLT), sont des mécanismes omniprésents dans le cerveau. La richesse des connaissances sur cette forme de plasticité synaptique impose cependant ici de limiter la discussion à certains aspects clés de la PLT, surtout son induction.

2.3.1 La première caractérisation de la PLT

La première caractérisation de la PLT a donc été effectuée par Lømo et Bliss dans l'hippocampe du lapin anesthésié (Bliss & Lomo, 1973). Utilisant la technique d'enregistrement de champs, ils ont estimé l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) de l'ensemble des neurones autour de l'électrode. Ils ont montré que l'amplitude de ces PPSEs augmente suite à des stimulations à haute fréquence (15 Hz pour 10-15 secondes ou 100 Hz pour 3-4 secondes) et ce, d'une façon soutenue. Par contre, les PPSEs enregistrés dans une voie parallèle non-stimulée ne montraient aucune augmentation, démontrant ainsi la spécificité de cet effet aux neurones affectés par la stimulation à haute fréquence (Fig. 6).

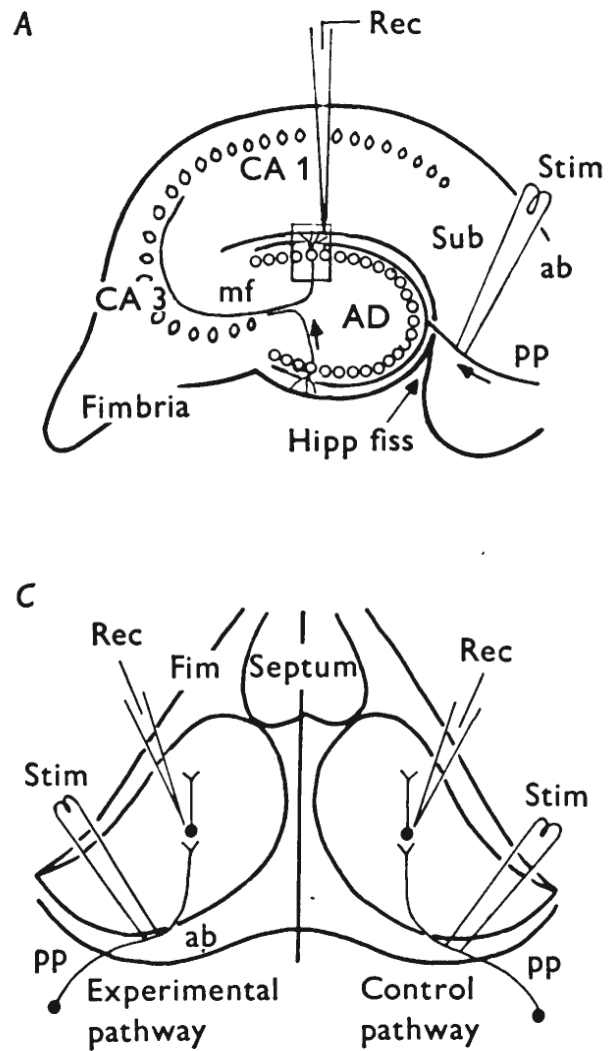


Figure 6. Un schéma de la préparation utilisée par Bliss et Lomo, montrant les voies stimulées, dont une est conditionnée avec la stimulation à haute fréquence (*experimental pathway*), l'autre n'étant pas conditionnée (*control pathway*). Image adaptée de Bliss &

Lomo (1973)

La durée de l'augmentation d'amplitude des PPSE est sans doute le résultat le plus frappant des expériences de Bliss et Lømo. Dans certaines expériences, l'amplitude demeurait potentialisée pendant 10 heures et la diminution vers les valeurs de pré-induction coïncidait souvent avec une diminution similaire de l'amplitude dans la voie contrôle non-stimulée, ce qui laisse soupçonner que la diminution était dû à une détérioration générale («rundown») de la préparation, plutôt qu'à un renversement de la PLT. Ces travaux suggèrent donc que la PLT pourrait durer au-delà de 10 heures.

Suite à cette première caractérisation de la PLT, de nombreuses questions majeures ont été soulevées: (1) quel est le mécanisme cellulaire de la PLT? (2) est-ce que le locus de l'effet se trouve au niveau pré- ou postsynaptique? (3) est-ce que la PLT est un mécanisme neurobiologique qui sous-tende réellement l'apprentissage et le stockage à long terme de l'information?

2.3.2 Les conditions générales pour l'induction de la PLT: implication du récepteur NMDA

Le modèle de choix pour l'étude de la PLT est toujours l'hippocampe. C'est dans cette région que les mécanismes d'induction et expression de la PLT ont été étudié le plus en détail, en particulier pour les mécanismes de la PLT associative, la forme de PLT la plus connue. Cette forme de PLT est dépendante d'une cooccurrence d'activité pré- et postsynaptique et dépend de l'activation des récepteurs au glutamate de type NMDA (Collingridge *et al*, 1983). Ces auteurs ont su montrer qu'il n'est pas possible d'induire la PLT dans la région CA1 de l'hippocampe dans des tranches de cerveau de rat en présence de l'AP5, un antagoniste des récepteurs NMDA. Lynch *et al* (1983) ont par ailleurs montré que le calcium intracellulaire joue un rôle clé dans l'induction de la PLT, tel que suggéré par le fait que le chélateur de calcium EGTA, inclus dans la pipette d'enregistrement électrophysiologique, prévient l'induction de la PLT.

Avec la découverte par Nowak *et al* (1984) que les récepteurs NMDA sont bloqués par le magnésium quand la cellule est hyperpolarisée et que ce blocage est levé une fois le

potentiel membranaire dépolarisé, il devenait possible d'établir un lien entre les découvertes de Collingridge et de Lynch : il a été possible de conclure que la PLT associative requiert l'activation des récepteurs NMDA en même temps que la cellule postsynaptique est dépolarisée (par exemple via l'activation des récepteurs AMPA), pour que l'influx calcique via les récepteurs NMDA puisse être déclenché et ainsi induire la PLT. Le récepteur NMDA agit alors comme détecteur de coïncidence d'une activité présynaptique et une dépolarisation postsynaptique.

Avec l'élucidation de ce mécanisme de base d'induction de la PLT, l'attention s'est tournée vers l'identification des mécanismes cellulaires qui sont déclenchés par l'influx calcique via les récepteurs NMDA. De fait, une grande quantité de kinases peuvent être activées par le calcium. Les kinases telles que la protéine kinase dépendante de la calcium/calmoduline II (CaMKII), la PKA, les différentes formes de PKC, la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) et la kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK) ont toutes été impliquées dans la PLT (Malenka & Bear, 2004). L'activité de ces kinases induirait finalement un recrutement de récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique, surtout via la CaMKII (Hayashi *et al*, 2000), ce qui augmenterait l'efficacité de la transmission synaptique (Song & Huganir, 2002). Cette conclusion a été appuyée par la découverte de 'synapses silencieuses'; des synapses qui n'expriment que des récepteurs NMDA et qui, suite à une induction de la PLT, commencent à exprimer des récepteurs AMPA (Isaac *et al*, 1995; Liao *et al*, 1995). Les récepteurs AMPA peuvent être insérés dans la membrane via l'exocytose de vésicules contenant des récepteurs (Lu *et al*, 2001). Le site précis d'insertion des récepteurs n'est pas encore tout à fait résolu; les récepteurs pourraient être insérés directement dans la densité postsynaptique, ou alors à l'extérieur de la zone synaptique, dans les dendrites ou proche de l'épine dendritique, approchant par la suite la synapse par diffusion latérale (Groc & Choquet, 2006; Hirling, 2009).

Il est important de noter que l'insertion de récepteurs AMPA, bien que représentant le mécanisme primaire de la PLT, n'est pas le seul mécanisme possible de PLT. En effet, la phosphorylation des différentes sous-unités des récepteurs AMPA et NMDA peut changer

la perméabilité de ces récepteurs et de ce fait augmenter la transmission synaptique (Lee, 2006). De plus, la PLT pourrait aussi être exprimée en partie présynaptiquement, suite à des changements dans la probabilité de libération des neurotransmetteurs (Lauri *et al*, 2007; Pare, 2004). Les mécanismes de la PLT peuvent différer selon le type de neurotransmetteur impliqué, et selon l'endroit dans le cerveau qui est examiné (Malenka & Bear, 2004).

Maintenant, est-ce que la PLT est un mécanisme de la mémoire et de l'apprentissage? Il s'agit d'une question à laquelle il est difficile de répondre. Bien qu'il soit accepté dans la communauté scientifique que les médiateurs de la PLT (et la DLT) sont fortement impliqués dans l'apprentissage et la mémoire, il s'avère très compliqué techniquement de montrer sans équivoque que la PLT et la DLT les sous-tendent (Lynch, 2004). De plus, il existe plusieurs autres mécanismes cellulaires qui peuvent changer l'activité des réseaux de neurones à long terme, comme des changements persistants dans le fonctionnement et l'expression de canaux ioniques voltage-dépendants (Kim & Linden, 2007; Zhang & Linden, 2003). Ainsi, selon l'état actuel des connaissances, il faudra pour l'instant se contenter de la pléthore de données corrélationnelles qui lient la PLT avec la mémoire et l'apprentissage (Lynch, 2004; Malenka & Bear, 2004; Martinez & Derrick, 1996; Sigurdsson *et al*, 2007).

2.4 Drogues d'abus et plasticité synaptique

Dans la section précédente, nous avons vu que les classes majeures de drogues d'abus ont toutes, de façon aigüe, une influence sur le système dopaminergique méso-corticolimbique. Cependant, il est bien connu que la toxicomanie n'est pas une affliction qui s'installe immédiatement après la première exposition à une drogue d'abus. Elle se développe plutôt graduellement, suite à une exposition répétée aux drogues. Ainsi quels sont donc les effets à long terme des drogues d'abus sur le cerveau? Dans cette section nous discuterons de la plasticité synaptique et structurale induite par les drogues d'abus dans le Nacc et dans l'ATV, ce qui s'avère être un phénomène complexe.

2.4.1 Plasticité synaptique dans le noyau accumbens

Les neurones du Nacc, pour la plupart des neurones GABAergiques épineux moyens («medium spiny neurons» ou MSNs en anglais), sont une des cibles les plus importantes du système méso-corticolimbique. Les drogues d'abus induisent une augmentation de la quantité de dopamine libérée sur ces neurones. Cette augmentation induit des changements synaptiques et structuraux importants dans cette structure. Il semble que la plasticité induite dans le Nacc par les drogues soit induite par la prise répétée de drogues. Un traitement répété avec l'amphétamine induit par exemple une augmentation significative de la densité et de la taille des épines dendritiques, ainsi qu'une augmentation de l'arborisation des MSNs 38 jours plus tard (Robinson & Kolb, 1997). La cocaïne produit le même effet (Robinson *et al*, 2001). Cependant, les opiacés semblent avoir l'effet opposé (Robinson & Kolb, 1999). L'administration chronique de la cocaïne augmente la production d'AMP cyclique et l'activité de la PKA (Terwilliger *et al*, 1991). Une telle augmentation de la production d'AMP cyclique et l'activité accrue de la PKA régule entre autre l'activité de DARPP-32 (pour 'dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein'). Cette phosphoprotéine, une fois phosphorylée par le PKA, diminue l'activité de la phosphatase-1, ce qui entraîne un état de phosphorylation élevée de plusieurs protéines (Hemmings *et al*, 1984). Des souris dont le site de phosphorylation pour la PKA de la DARPP-32 est muté démontrent une diminution de la préférence conditionnée pour un endroit auparavant associé à une prise de drogue, ainsi qu'une diminution de la sensibilisation à la cocaïne (Zachariou *et al*, 2006). Il existe de nombreuses données qui suggèrent une altération de l'expression de nombreux gènes suite à l'exposition répétée aux drogues d'abus, incluant un changement dans l'expression des facteurs de transcription tels que CREB (pour «cyclic AMP-response-element-binding protein» en anglais) et deltaFosB (Carlezon *et al*, 1998; Hyman & Malenka, 2001; Nestler, 2004). L'expression de deltaFosB est induite par plusieurs drogues d'abus, y inclus les opiacés et les psychostimulants et semble augmenter l'effet de récompense de la morphine et de la cocaïne. De plus, elle est nécessaire et suffisante pour l'augmentation de la densité des épines dendritiques induite par la cocaïne (Russo *et al*, 2010).

Les synapses glutamatergiques cortico-striées dans le Nacc semblent aussi jouer un rôle clé dans l'action des drogues d'abus et dans les comportements associés à une prise prolongée de celles-ci (Kalivas *et al*, 2009; Pierce *et al*, 1996). La rechute de la prise de drogue suite à une période d'abstinence requiert la transmission glutamatergique dans le Nacc (Kalivas *et al*, 2009). Une administration unique de cocaïne ne semble pas affecter les connections glutamatergiques AMPA sur les neurones du Nacc (Thomas *et al*, 2001). Par contre, l'administration répétée induit initialement une PLT de ces synapses, suivi d'une dépression à long terme (DLT) pendant la phase précoce du sevrage (Kourrich *et al*, 2007). La direction de la plasticité des synapses glutamatergiques semble dépendre étroitement de l'état de l'animal, selon que celui-ci se retrouve dans un état non-sevré, en abstinence précoce ou en abstinence prolongée. Le mode d'administration de la cocaïne (injections passives ou auto-administration semble aussi être une variable importante (Chen *et al*, 2010). L'expression des récepteurs AMPA est augmentée suite à un traitement répété avec la cocaïne (Chen *et al*, 2010; Pierce *et al*, 1996), ce qui serait indicatif d'une induction de la PLT. En concordance avec les données sur les épines dendritiques, les opiacés semblent avoir un effet opposé à celui de la cocaïne sur l'expression des récepteurs AMPA (Glass *et al*, 2008). Ils semblent aussi inhiber l'expression d'une forme de DLT (Robbe *et al*, 2002). Ainsi, bien que les opiacés et les psychostimulants produisent des effets semblables chez les rongeurs, les changements structuraux et synaptiques qu'ils induisent sont en partie différents. Pour élucider ce paradoxe, il sera nécessaire de mieux comprendre le décours temporel de l'évolution des différents stades de la toxicomanie, ainsi que le rôle de la transmission synaptique glutamatergique à chacun de ces stades, afin de pouvoir les corréler avec les changements observés (Chen *et al*, 2010; Russo *et al*, 2010).

2.4.2 Plasticité synaptique dans l'ATV

Contrairement aux données relativement complexes sur la plasticité synaptique dans le Nacc, l'interprétation des données relatives à la plasticité induite par les drogues d'abus dans l'ATV est plus claire: les effets des drogues convergent généralement vers l'activation des neurones dopaminergiques. Il existe dans l'ATV une forme de PLT hétérosynaptique

des synapses GABAergiques sur les neurones dopaminergiques. Elle est dépendante des récepteurs NMDA et de l'oxyde nitrique et elle est induite par la stimulation extracellulaire à haute fréquence (100 Hz). Cette forme de PLT est bloquée par les opiacés (Nugent *et al*, 2007), la cocaïne, la nicotine et le stress (Niehaus *et al*, 2010). Un blocage de cette PLT enlève ainsi un frein potentiel sur l'activité des neurones dopaminergiques.

Il existe beaucoup de données sur l'effet des drogues d'abus sur la plasticité des synapses glutamatergiques établies sur les neurones dopaminergiques de l'ATV. Attestant de l'importance de ces synapses dans l'action des drogues d'abus, l'injection systémique d'un antagoniste du récepteur NMDA inhibe l'induction de la sensibilisation aux effets locomoteurs de la cocaïne et de l'amphétamine suite à des administrations répétées (Karler *et al*, 1989). Quelques années plus tard, il a été démontré que le site principal de cet effet inhibiteur du blocage du récepteur NMDA sur la sensibilisation se trouve dans l'ATV (Cador *et al*, 1999; Kalivas & Alesdatter, 1993; Vezina & Queen, 2000). De plus, l'injection répétée de NMDA directement dans l'ATV peut elle-même induire une sensibilisation (Schenk & Partridge, 1997). Finalement, la préférence conditionnée pour un endroit auparavant associé à une prise de drogue est aussi inhibée quand la transmission glutamatergique est bloquée spécifiquement dans l'ATV (Harris & Aston-Jones, 2003; Harris *et al*, 2004). Ainsi, il semble donc qu'effectivement, la modulation des synapses glutamatergiques via les récepteurs NMDA joue un rôle clé dans la sensibilisation aux drogues d'abus et l'apprentissage qui y est associé. Un mécanisme plausible de cette plasticité serait l'induction de la PLT aux terminaisons axonales glutamatergiques de l'ATV. Une première démonstration de ce mécanisme a été rapportée par Ungless *et al* (2001): une injection unique de cocaïne est en mesure d'induire une augmentation du ratio des courants synaptiques AMPA/NMDA détectable 24 heures plus tard. L'interprétation proposée est que l'augmentation de ce ratio reflète une augmentation durable de la composante AMPA des synapses glutamatergiques, potentiellement causée par une augmentation du nombre de récepteurs à la surface de la membrane postsynaptique; il s'agit en somme d'une forme de PLT. Compatible avec cette possibilité, l'induction de la PLT *ex vivo* n'était plus possible après une injection préalable de cocaïne, et l'induction de la DLT

était facilitée (Ungless *et al*, 2001). Cette découverte a été suivie rapidement par une évaluation de l'effet des autres drogues d'abus sur le ratio AMPA/NMDA; il a été montré que plusieurs des classes majeures de drogues d'abus (la morphine, la nicotine, les benzodiazépines et l'éthanol) induisent la même augmentation du ratio AMPA/NMDA, tandis que des drogues sans potentiel d'abus, telles que la fluoxétine (un inhibiteur de la recapture de la sérotonine) ou le carbamazépine n'induisent pas un effet semblable (Saal *et al*, 2003). Cette augmentation du ratio AMPA/NMDA semble représenter un mécanisme d'apprentissage appétitif fondamental. En effet, l'auto-administration d'une solution de sucrose, un stimulus appétitif pour des souris, l'induit également (Chen *et al*, 2008). Par contre, l'augmentation du ratio AMPA/NMDA est beaucoup plus persistante quand c'est la cocaïne qui est auto-administrée (au moins 3 mois) plutôt que le sucrose (une semaine), ce qui suggère que les drogues d'abus déstabilisent un mécanisme d'apprentissage motivationnel d'une façon pathologique (Chen *et al*, 2008).

Cette PLT peut être induite en appliquant la cocaïne directement sur des tranches fraîches de mésencéphale. Initialement, ceci induit une insertion de récepteurs NMDA à la synapse (Schilstrom *et al*, 2006). Cependant, 3-5 heures après une brève application de cocaïne, le ratio AMPA/NMDA montre une augmentation (Argilli *et al*, 2008). Cette forme de PLT induite par la cocaïne est due à une augmentation du nombre de récepteurs AMPA n'incluant pas la sous-unité GluR2; elle peut par ailleurs être réversée par un agoniste des récepteurs métabotropes mGluR1 (Bellone & Luscher, 2006).

La plasticité induite par les psychostimulants aux terminaisons glutamatergiques de l'ATV dépend d'une activation des récepteurs dopaminergiques de type D5 (Argilli *et al*, 2008; Schilstrom *et al*, 2006), ainsi que des récepteurs NMDA (Engblom *et al*, 2008; Ungless *et al*, 2001; Zweifel *et al*, 2008). Cette dernière observation a mené à l'hypothèse que c'est une augmentation de la libération somatodendritique de dopamine au sein de l'ATV qui est à la base de la PLT induite par les psychostimulants. Ceci voudrait dire qu'une simple activation des neurones dopaminergiques pourrait mimer l'effet des drogues d'abus. En accord avec cette hypothèse, l'activation sélective des neurones

dopaminergiques par stimulation optogénétique est suffisante pour induire une insertion de récepteurs AMPA qui n'incluent pas de sous-unité GluR2 (Brown *et al*, 2010).

Des souris KO qui ne peuvent pas exprimer la PLT aux terminaisons glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques démontrent des changements de comportements liés aux drogues d'abus. Par exemple, la sensibilisation aux drogues d'abus à long terme semble être inhibée, ainsi que la préférence conditionnée pour un endroit auparavant associé à une prise de drogue (Zweifel *et al*, 2008) (voir cependant Engblom *et al* (2008)). Finalement, la ré-initiation des comportements de la recherche à la drogue suite aux amorces, un modèle animal de la rechute, sont diminués (Engblom *et al*, 2008).

Il est donc bien établi que les drogues d'abus induisent une PLT aux synapses glutamatergiques établies sur les neurones dopaminergiques de l'ATV. Malgré ceci, il est reconnu qu'il est très difficile d'induire une PLT par stimulation directe des afférences glutamatergiques de l'ATV *in vitro*. Bien que deux études antérieures aient rapporté l'induction d'une PLT en réponse à une stimulation extracellulaire à 1 Hz appariée à une dépolarisation soutenue ou en réponse à une stimulation à haute fréquence (100 Hz) dans des tranches d'ATV (Bonci & Malenka, 1999; Overton *et al*, 1999), il semble avoir été impossible pour d'autres laboratoires de reproduire ce phénomène. Par contre, en 2005, un groupe a développé un protocole de stimulation appariant de façon répétée une stimulation extracellulaire avec l'induction d'un potentiel d'action dans le neurone dopaminergique enregistré (protocole de « spike time-dependent pairing ») (Liu *et al*, 2005). Il a été démontré que ce protocole peut mener à l'induction d'une PLT uniquement quand les récepteurs GABAergiques de type A sont bloqués (Liu *et al*, 2005; Luu & Malenka, 2008). Cette PLT est dépendante de l'activation des récepteurs NMDA et l'activation de la PKC (Luu & Malenka, 2008). Il faut noter finalement que cette PLT est de petite taille (augmentation de moins de 25% de la taille de la réponse synaptique). Puisqu'il est impossible d'induire une PLT sans blocage des récepteurs GABA_A, il est donc probable que certains signaux, dont la transmission GABAergique, régulent de façon négative l'induction de la PLT dans l'ATV. Un exemple de ce genre de mécanisme impliquant le système GABAergique a été proposé par Nugent et collaborateurs : ceux-ci ont montré que

l'activation des récepteurs NMDA dans les neurones dopaminergiques peut induire une libération d'oxyde nitrique, ce qui mène à la potentialisation des synapses GABAergiques sur les neurones dopaminergiques (Nugent & Kauer, 2008; Nugent *et al*, 2007). L'identification d'autres signaux régulateurs, impliquant ou non les neurones GABAergiques, représenterait une avancée importante pour notre compréhension des mécanismes de la PLT dans le VTA.

Il serait donc important de mieux comprendre les mécanismes endogènes qui régulent l'induction de la PLT aux synapses glutamatergiques de l'ATV. Dans la section suivante, nous discuterons de deux de ces signaux potentiels: les endocannabinoïdes et la neurotensine.

Partie 3: Les endocannabinoïdes et la neurotensine

3.1 Les endocannabinoïdes

Dans cette section nous discuterons du système des endocannabinoïdes, un système de messenger chimique rétrograde qui est abondant dans le cerveau, ainsi que du système de la neurotensine, un neuropeptide également abondant, qui présente une interaction très étroite avec le système dopaminergique. La neurotensine pourrait avoir une influence directe sur les endocannabinoïdes, comme on le verra plus tard dans cette section.

3.1.1 Le système des endocannabinoïdes

L'isolation du delta9-tétrahydrocannabinol, le component psychoactif le plus important de la marijuana (Mechoulam & Gaoni, 1967a, b) a mené à l'identification des récepteurs des cannabinoïdes, puis ensuite à la découverte des cannabinoïdes endogènes, aussi appelés endocannabinoïdes. Il existe deux types de récepteurs des cannabinoïdes, nommés CB1 et CB2. Le récepteur CB1, cloné en 1990 (Matsuda *et al*, 1990), est un récepteur couplé au protéines Gi/o qui est le responsable principal des effets psychoactifs des cannabinoïdes, ainsi que d'autres effets de ces substances, tels que l'hypothermie et

l'analgésie (Chevaleyre *et al*, 2006; Howlett *et al*, 2004). Le récepteur CB2, cloné en 1993 (Munro *et al*, 1993), est lui aussi un récepteur couplé aux protéines Gi/o, qui est présent presque exclusivement dans les cellules immunitaires (Chevaleyre *et al*, 2006; Howlett *et al*, 2004). Ce récepteur ne sera pas discuté d'avantage ici.

Le récepteur CB1 est un des types de récepteur le plus abondant dans le cerveau. Il présente une expression hétérogène et est présent dans de nombreuses structures (Tableau 1) (Herkenham *et al*, 1991; Moldrich & Wenger, 2000). Ce récepteur est surtout présent sur les terminaisons axonales, et son activation entraîne typiquement une diminution de la libération des neurotransmetteur (Schlicker & Kathmann, 2001) via une régulation négative des canaux calciques, l'ouverture de canaux potassiques, l'inhibition de la voie de AMP-cyclique (Chevaleyre *et al*, 2006) et l'inhibition du mécanisme d'exocytose (Takahashi & Linden, 2000; Yamasaki *et al*, 2006).

Table 1. Regional distribution of cannabinoid receptors in rat brain

Structure	Specific binding (pmol/mg protein)
Olfactory areas	
Ependymal and subependymal layer and olfactory ventricle	4.32 ± 0.79
Internal granular and plexiform and mitral cell layers	2.89 ± 0.48
External plexiform layer	0.57 ± 0.10
Glomerular layer	0.65 ± 0.07
Olfactory nerve layer	0.42 ± 0.02
Accessory olfactory bulb	0.77 ± 0.19
Anterior olfactory nuclei	2.48 ± 0.33
Olfactory tubercle	1.60 ± 0.09
White matter tracts	
Anterior commissure, intrabulbar	3.29 ± 0.24
Corpus callosum	0.57 ± 0.10
Internal capsule	0.30 ± 0.06
Fimbria	0.70 ± 0.09
Stria terminalis	1.51 ± 0.11
Cerebral cortex	
Cingulate cortex, (prelimbic) area 3	2.26 ± 0.18
Frontal (motor) cortex, areas 1-3	2.68 ± 0.27
Parietal (somatosensory I) cortex	2.10 ± 0.29
Occipital (visual I) cortex	1.72 ± 0.28
Occipital (visual II) cortex	1.72 ± 0.31
Temporal (auditory) cortex	1.45 ± 0.32
Entorhinal cortex	1.52 ± 0.22
Granular retrosplenial cortex	1.70 ± 0.28
Hippocampal formation	
Dentate gyrus molecular layer	4.09 ± 0.23
Dentate gyrus hilus	2.92 ± 0.09
Field CA3 of Ammon's horn	4.05 ± 0.16
Field CA1 of Ammon's horn	3.19 ± 0.26
Dorsal subiculum	3.08 ± 0.31
Basal ganglia	
Accumbens nucleus	2.27 ± 0.42
Caudate-putamen, medial	2.47 ± 0.30
Caudate-putamen, lateral	4.33 ± 0.43
Globus pallidus	6.42 ± 0.50
Ventral pallidum	1.56 ± 0.25
Entopeduncular nucleus	5.44 ± 0.45
Substantia nigra pars reticulata	6.33 ± 0.13
Ventral tegmental area	1.46 ± 0.29
Septum	
Medial septum and nuclei of the diagonal band	2.43 ± 0.35
Lateral septum	2.13 ± 0.08
Amygdala	
Medial amygdaloid nucleus	1.12 ± 0.11
Basolateral amygdaloid nucleus	1.78 ± 0.14
Central amygdaloid nucleus	1.61 ± 0.11
Nucleus of the lateral olfactory tract	2.34 ± 0.52

Table 1. Continued

Structure	Specific binding (pmol/mg protein)
Diencephalon	
Medial preoptic area	1.75 ± 0.30
Suprachiasmatic nucleus	0.97 ± 0.20
Supraoptic nucleus	0.90 ± 0.16
Paraventricular hypothalamic nucleus	1.28 ± 0.19
Median eminence	0.58 ± 0.15
Ventromedial hypothalamic nucleus (VMH)	1.58 ± 0.15
Lateral hypothalamus (LH)	1.87 ± 0.22
Mammillary nuclei (MM/ML)	1.90 ± 0.35
Dorsal thalamus	1.33 ± 0.20
Medial habenula	1.13 ± 0.22
Lateral habenula	1.93 ± 0.39
Brain stem	
Central gray substance	1.89 ± 0.37
Oculomotor nucleus	0.47 ± 0.07
Red nucleus	0.66 ± 0.16
Interpeduncular nucleus	0.89 ± 0.07
Interpeduncular nucleus, lateral subnucleus	2.07 ± 0.44
Pontine nuclei	0.91 ± 0.30
Superior colliculus	1.47 ± 0.16
Inferior colliculus	0.89 ± 0.24
Median raphe nucleus	1.06 ± 0.13
Cuneiform nucleus	1.79 ± 0.39
Parabrachial nucleus	2.00 ± 0.23
Locus coeruleus	1.48 ± 0.25
Pontine reticular nucleus, caudal	0.65 ± 0.08
Vestibular nuclei	0.27 ± 0.14
Dorsal cochlear nucleus	1.45 ± 0.37
Nucleus of the solitary tract, rostral	1.79 ± 0.36
Nucleus of the solitary tract, caudal	2.43 ± 0.45
Inferior olive	1.20 ± 0.01
Ambiguous nucleus	1.14 ± 0.21
Area postrema	1.18 ± 0.31
Hypoglossal nucleus	1.44 ± 0.43
Spinal trigeminal nucleus	0.80 ± 0.20
Gracile and cuneate nuclei	0.74 ± 0.13
Cerebellum	
Molecular layer	4.19 ± 0.35
Granule layer	0.96 ± 0.27
Deep nuclei	0.23 ± 0.14
Cervical spinal cord	
Substantia gelatinosa (layers 1, 2)	0.95 ± 0.22
Lamina X (layer 10)	1.08 ± 0.31
Ventral horn (layers 7-9)	0.60 ± 0.08
Pituitary	
Neural lobe	0.33 ± 0.15
Anterior lobe	0.15 ± 0.08

The data were taken from films exposed for 3 weeks. Similar results were obtained from films exposed for 8 d. The amounts bound reflect equilibrium binding of 10 nM ³H-CP55,940; assuming a K_d of approximately 15 nM, about 40% of the receptors would be occupied.

Tableau 1: Distribution des récepteurs CB1 dans le cerveau du rat, identifiée par autoradiographie. Tableau tiré de Herkenham et al (1991).

Les endocannabinoïdes (ECs) sont des messagers lipidiques qui sont libérés via le compartiment somatodendritique des neurones et qui agissent comme agonistes endogènes des récepteurs CB1 et CB2. Plusieurs ECs ont été identifiés; les deux qui ont été le plus étudié à date sont l'arachidonoyléthanolamide (anandamide) (Devane *et al*, 1992) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) (Mechoulam *et al*, 1995; Sugiura *et al*, 1995). Ce dernier serait l'EC le plus abondant dans le cerveau (Chevaleyre *et al*, 2006). L'anandamide est probablement synthétisé à partir de la phosphatidyléthanolamine, qui est convertie en N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine (NArPE) par le N-acyl transférase. Ensuite, la phospholipase D transforme le NArPE en anandamide. Quant au 2-AG, il existe plusieurs possibilités de synthèse: dans une première voie, probablement la plus importante, la phospholipase C (PLC) transforme les dérivés du phosphatidylinositol en diacylglycérol (DAG) qui par la suite est converti en 2-AG par la diacylglycérol-lipase (DAG-L). Les modèles de voies de synthèse de l'anandamide et du 2-AG sont illustrés dans la figure 7.

Suite à leur synthèse, les ECs sont libérés dans le milieu extracellulaire, vraisemblablement via un transporteur transmembranaire qui n'a pas encore été déterminé. Ce transporteur membranaire de l'anandamide hypothétique, capable de transporter autant l'anandamide et le 2-AG, jouerait aussi un rôle dans la recapture des ECs en vue de leur dégradation, ce qui mettrait fin à leur signalisation. La dégradation de l'anandamide se fait par hydrolyse via l'hydrolase des amides d'acides gras (ou FAAH, de l'anglais «fatty acid amide hydrolase») (De Petrocellis *et al*, 2004). Le FAAH converti l'anandamide en acide arachidonique et en éthanolamine. La FAAH peut aussi hydrolyser le 2-AG en acide arachidonique et en glycérol, mais l'enzyme de dégradation de choix pour le 2-AG est la monoacylglycérol lipase (Dinh *et al*, 2002).

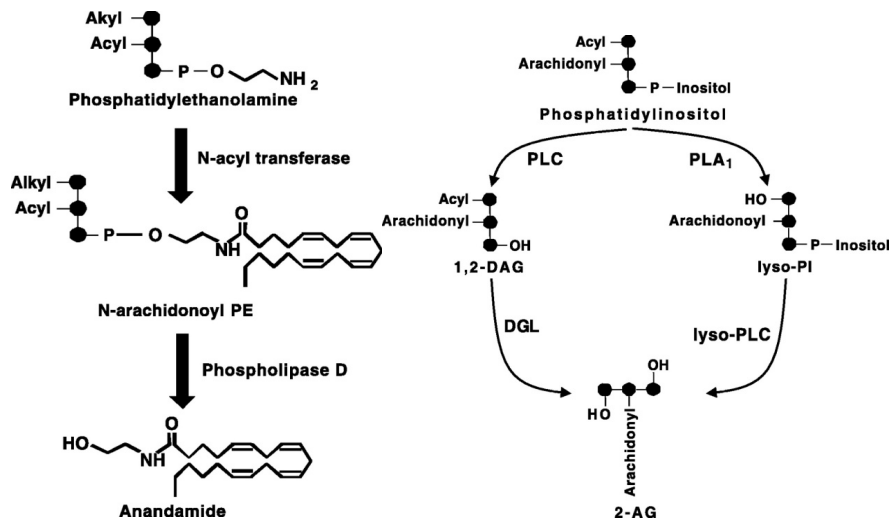


Figure 7: Modèles de synthèse de l'anandamide (gauche) et du 2-AG (droite). Figure adaptée de Freund *et al* (2003).

3.1.2 Les endocannabinoïdes et la transmission synaptique

Comme mentionné dans la section précédente, l'activation des récepteurs CB1 peut entraîner une diminution de la libération des neurotransmetteurs. Les circonstances favorisant la production et la libération des ECs dans le cerveau ne sont pas encore complètement élucidées. Cependant, la dépolarisation neuronale, associée à une entrée de calcium dans le compartiment somatodendritique semble représenter une situation propice à la production d'ECs (Llano *et al*, 1991; Pitler & Alger, 1992). D'autre part, la stimulation répétées d'afférences glutamatergiques, associée à une activation de récepteurs mGluR serait un autre contexte pouvant potentiellement mener à la production d'ECs (Maejima *et al*, 2001; Melis *et al*, 2004a; Melis *et al*, 2004b) (Fig. 8). La libération des ECs induite par une activation de récepteurs mGluR n'est pas nécessairement dépendante du calcium intracellulaire; cependant, elle semble potentialisée par l'élévation du calcium (Hashimotodani *et al*, 2007). Ainsi, il existe au moins trois façons d'induire la synthèse et la libération des ECs: 1) une entrée calcique importante via une dépolarisation membranaire somatodendritique, une activation des mGluRs importante, ou une combinaison des deux.

Dans le dernier cas, il est possible que des signaux insuffisants pour déclencher seuls la synthèse d'ECs deviennent supra-maximaux par leur sommation (Hashimoto *et al*, 2007).

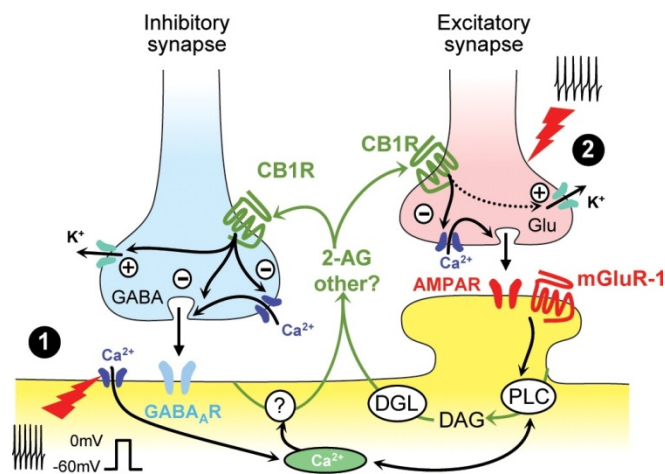


Figure 8: Induction de la libération de 2-AG par la dépolarisation membranaire ou l'activation présynaptique répétée aux deux types de synapses les plus abondantes dans le cerveau. Image adaptée de Chevalleyre *et al* (2006).

La libération des ECs induit habituellement une diminution de brève durée (moins d'une minute) de la libération des neurotransmetteurs à la synapse. Il s'agit donc d'une forme de plasticité synaptique à court terme. Les ECs peuvent aussi induire une forme de plasticité à long terme. Généralement, la plasticité à long terme induite par des ECs prend la forme d'une DLT. Elle dépend de l'activation des récepteurs CB1 initialement, mais n'implique pas une activation continue. Elle peut être induite dans plusieurs régions du cerveau et ce, tant aux terminaisons glutamatergiques que GABAergiques (Chevalleyre *et al*, 2006). Les premières données expérimentales suggérant l'existence d'une telle DLT vient de la découverte que la DLT striatale, induit par une stimulation à haute fréquence (Lovinger *et al*, 1993), nécessite un influx calcique dans la cellule postsynaptique (Calabresi *et al*, 1992) et est due à une diminution de la libération de glutamate (Choi & Lovinger, 1997a, b). Son

induction nécessite la présence et l'activation des récepteurs CB1 (Gerdeman *et al*, 2002), mais aussi, fait surprenant, de l'activation des récepteurs D2 de la dopamine (Giuffrida *et al*, 1999).

3.1.3 Les endocannabinoïdes dans l'ATV

Les récepteurs CB1 sont présents dans l'ATV (Herkenham *et al*, 1991) et ce, tant aux synapses GABAergiques que glutamatergiques. La machinerie nécessaire à la synthèse du 2-AG est également présente dans les neurones dopaminergiques de l'ATV (Matyas *et al*, 2008). L'effet global du delta9-tétrahydrocannabinol systémique ou *in vitro* sur les neurones dopaminergiques est une augmentation de la fréquence de décharge (French, 1997; French *et al*, 1997). Un effet identique est aussi induit par l'agoniste synthétique des récepteurs CB1, le WIN-55212-2 (Gessa *et al*, 1998). Les neurones dopaminergiques de l'ATV libèrent des ECs suite à l'activation de la transmission glutamatergique ou à la dépolarisation de ces neurones. Ces ECs activent ensuite les récepteurs CB1 présents sur les terminaisons glutamatergiques et GABAergiques (Melis *et al*, 2004a; Melis *et al*, 2004b; Riegel & Lupica, 2004; Szabo *et al*, 2002). Le 2-AG semble être le principal EC libéré par les neurones dopaminergiques (Melis *et al*, 2004a). Finalement, le 2-AG entraîne une DLT suite à une stimulation extracellulaire à basse fréquence appariée à une dépolarisation modérée (Haj-Dahmane & Shen, 2010). Le 2-AG joue donc un rôle important dans le contrôle excitateur et inhibiteur de l'activité des neurones dopaminergiques, autant à court qu'à long terme. Dans le contexte de ces considérations, la possibilité que les protocoles de stimulation utilisés pour induire la PLT aux synapses glutamatergiques de l'ATV induisent aussi la libération d'ECs, et donc puissent agir de façon à réguler négativement l'induction de la PLT doit être considéré. Cette question sera abordée dans le premier article de cette thèse.

3.2 La neurotensine

3.2.1 Le système de la neurotensine

La neurotensine (NT) est un neuropeptide formé de 13 acides aminés, initialement isolé de l'hypothalamus bovin (Carraway & Leeman, 1973). Il est abondant dans le cerveau ainsi qu'en périphérie. Ce peptide agit sur plusieurs récepteurs, dont trois ont été clonés à ce jour: NTS1, NTS2 et NTS3. Ces trois récepteurs ont chacun des différences importantes par rapport à l'autre.

La NTS1 est un récepteur couplé aux protéines G, avec une très haute affinité pour la NT. Ce récepteur est insensible à la lévocabastine, un antagoniste du récepteur histaminergique H1 qui se lie au récepteur NTS2 (Binder *et al*, 2001; Tanaka *et al*, 1990; Vita *et al*, 1993). Le NTS1 est associé à plusieurs cascades de signalisation intracellulaire: il est couplé à la PLC et la signalisation par l'IP3, il peut activer la formation de GMP cyclique, induire la production de l'acide arachidonique, activer les MAP kinases et inhiber Akt (St-Gelais *et al*, 2006; Vincent *et al*, 1999). Finalement, il cause une augmentation du calcium intracellulaire (St-Gelais *et al*, 2004; Trudeau, 2000; Woll & Rozengurt, 1989). Le NTS1 est entre autre impliqué dans la régulation de la température corporelle et dans la régulation de la prise alimentaire (Remaury *et al*, 2002). Il existe deux antagonistes pour le NTS1. Le SR142948A, qui est un antagoniste non-sélectif pouvant aussi bloquer le NTS2, et le SR48692, qui est un antagoniste plus spécifique pour le NTS1. Ce récepteur se trouve en grande quantité sur les neurones dopaminergiques de l'ATV (Binder *et al*, 2001; St-Gelais *et al*, 2006).

Le NTS2 est lui aussi un récepteur couplé aux protéines G. Il a une plus faible affinité pour la NT que le NTS1 et démontre une forte affinité pour la lévocabastine (Chalon *et al*, 1996; Mazella *et al*, 1996). Son expression élevée dans des régions où il y a peu d'expression de la NT suggère que le NTS2 est également impliqué dans la signalisation d'un autre ligand (Sarret *et al*, 2003). La signalisation via le NTS2 est moins bien caractérisée que celle via le NTS1; elle semble dépendre étroitement du contexte

cellulaire (Binder *et al*, 2001; Mazella & Vincent, 2006). Ce récepteur se trouve entre autre dans l'ATV, possiblement sur des neurones dopaminergiques (Walker *et al*, 1998).

Le NTS3 est un récepteur qui n'est pas couplé aux protéines G. Il s'agit d'une protéine qui avait indépendamment été nommée gp95/sortilin (Mazella *et al*, 1998), une protéine de triage intracellulaire (Petersen *et al*, 1997) qui peut également agir comme récepteur avec un seul passage transmembranaire. Ce récepteur, très différent des deux autres, est en mesure de lier plusieurs autres ligands qui ont des rôles très différents de ceux de la NT. Les fonctions de ce récepteur de la NT sont mal compris pour le moment (Mazella & Vincent, 2006). Celui-ci ne sera pas discuté d'avantage dans la suite de cette thèse.

La synthèse de la NT s'effectue à partir d'un précurseur peptidique inactif qui contient aussi un autre neuropeptide, la neuromedin N (Kislauskis *et al*, 1988). La prohormone convertase 2 est probablement l'enzyme principale responsable de la conversion du précurseur en NT et neuromedin, tel que suggéré par le chevauchement de la distribution des neurones qui synthétisent la NT et celle de cette convertase (Villeneuve *et al*, 2002; Villeneuve *et al*, 2000a). Cependant, les prohormone convertases 1 et 5A sont également capables de cliver ce précurseur (Villeneuve *et al*, 2000a; Villeneuve *et al*, 2000b). Une fois synthétisée, la NT est emmagasinée dans des vésicules denses. Elle peut ensuite être libérée par un mécanisme dépendant du calcium (Kitabgi *et al*, 1990). Après sa libération, la NT peut être dégradée par plusieurs peptidases (Binder *et al*, 2001; St-Gelais *et al*, 2006).

La distribution du système neurotensinergique dans le cerveau (Fig. 9) appuie l'hypothèse d'une forte interaction avec le système dopaminergique méso-corticolimbique. Les corps cellulaires des neurones qui synthétisent la NT se trouvent entre autre dans l'ATV, le Nacc, le noyau central de l'amygdale, le septum latéral, le noyau du lit de la strie terminale (BNST de l'anglais « bed nucleus of the stria terminalis »), l'hippocampe et les noyaux arqué et paraventriculaire de l'hypothalamus (Binder *et al*, 2001; St-Gelais *et al*, 2006). Ces régions reçoivent pour la plupart elles-mêmes des terminaisons

neurotensinergiques. De plus, la substance noire, le cortex préfrontal, l'hypophyse et le noyau rétrobulbaire en reçoivent aussi (Binder *et al*, 2001; St-Gelais *et al*, 2006) (fig. 9).

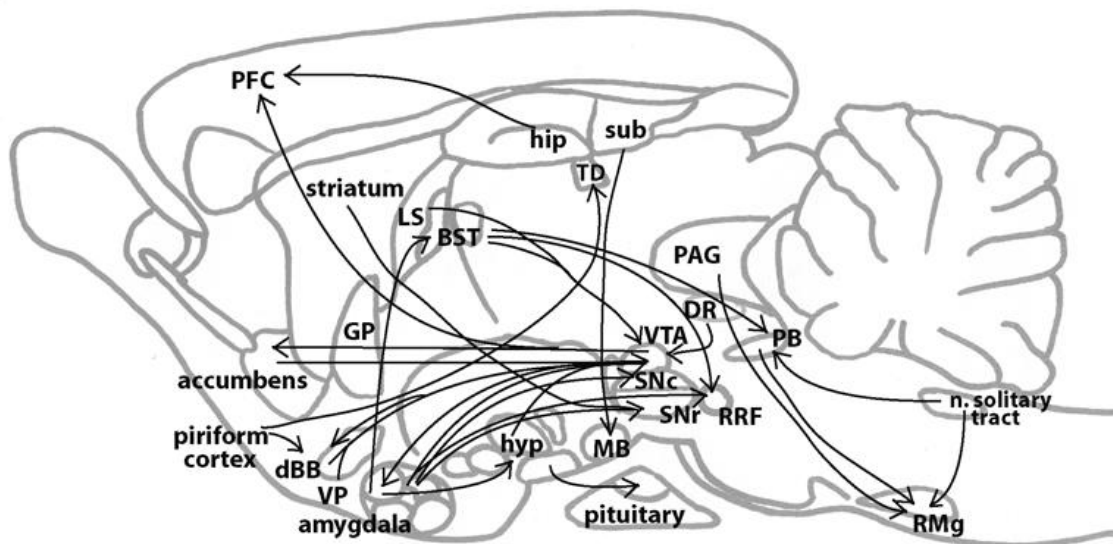


Figure 9: Le système neurotensinergique. Figure tirée de (St-Gelais *et al*, 2006).

Dans l'ATV, il existe plusieurs neurones dopaminergiques qui expriment aussi la NT et une grande quantité de fibres immunopositives pour la NT se retrouvent dans l'ATV autour des neurones dopaminergiques (Hökfelt *et al*, 1984a). Ces fibres semblent provenir entre autre du septum latéral, de l'aire pré-optique latérale, du BNST, du pallidum ventral et du raphé dorsal (Zahm *et al*, 2001). Par ailleurs, de nombreuses fibres glutamatergiques qui viennent innover les neurones dopaminergiques proviennent de ces mêmes régions (Geisler *et al*, 2007).

3.2.2 Les effets de la NT sur la transmission dopaminergique et glutamatergique

La NT augmente la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques du mésencéphale et les dépolarise (Farkas *et al*, 1996; Pinnock, 1985), un effet qui est dépendant du calcium intracellulaire (St-Gelais *et al*, 2004). Son effet excitateur implique aussi vraisemblablement une régulation négative des autorécepteurs somatodendritique D2

retrouvés sur les neurones dopaminergiques. L'activation du NTS1 provoque une internalisation hétérologue du récepteur D2 (Thibault *et al*, 2011).

La libération de la dopamine peut être facilitée par la NT. Par exemple, une injection intracérébroventriculaire de NT, ou bien une injection directe de NT dans l'ATV augmente l'activité des neurones dopaminergiques et la libération de la dopamine (Blaha & Phillips, 1992; Kalivas & Duffy, 1990). Cependant, les effets de la NT sur le système dopaminergique sont complexes; à titre d'exemple, des anticorps dirigés contre la NT injectés dans le Nacc augmentent la libération de la dopamine, ce qui suggère qu'au niveau terminal, la NT peut avoir un effet inhibiteur sur la libération de dopamine (Tanganelli *et al*, 1994). Pourtant, des récepteurs à la NT sont présents sur les terminaisons dopaminergiques dans le striatum (Quirion *et al*, 1985) et plusieurs travaux suggèrent un effet facilitateur de la NT sur les terminaisons axonales dopaminergiques (Fawaz *et al*, 2009; Legault *et al*, 2002).

Par ailleurs, des études de microdialyse suggèrent que la NT peut aussi induire une augmentation de la libération de glutamate dans plusieurs régions du cerveau, dont le striatum, la substance noire et le cortex préfrontal (Ferraro *et al*, 1995; Ferraro *et al*, 2001; Ferraro *et al*, 2000). Par contre, ces données gagneraient à être confirmées par des études électrophysiologiques permettant une mesure plus directe de la libération de glutamate. Une étude électrophysiologique récente a justement montré que la NT induisait une baisse de l'amplitude de réponses synaptiques glutamatergiques dans le striatum dorsal et ce, via un mécanisme impliquant les ECs (Yin *et al*, 2008), ce qui n'est pas compatible avec les études de microdialyse.

3.2.3 Un rôle de la NT dans la toxicomanie?

À cause de son interaction anatomique et fonctionnelle étroite avec la voie méso-corticolimbique, la NT a été étudiée en relation avec les maladies associées à ce système, y compris la toxicomanie. De fait, la NT peut produire des effets comportementaux psychostimulants lorsqu'injectée directement dans l'ATV (Kalivas *et al*, 1983; Kalivas *et al*, 1981). Elle peut aussi induire une préférence conditionnée pour un endroit auparavant

associé à la prise de la NT, suggérant un effet renforçant de ce peptide (Glimcher *et al*, 1984) et être auto-administrée par des rats (Glimcher *et al*, 1987). Par contre, ceci ne semble pas être le cas chez les singes, qui ne peuvent s'auto-administrer un agoniste des récepteurs de la NT (Fantegrossi *et al*, 2005). La NT sensibilise les rats à l'effet locomoteur de l'amphétamine (Rompre, 1997) et l'administration d'antagonistes de la NT réduit la sensibilisation à l'amphétamine (Panayi *et al*, 2002; Rompre & Perron, 2000).

Or, la NT agit sur les neurones dopaminergiques de l'ATV, tel que suggéré par l'abondante innervation neurotensinergique de cette région. Elle peut par ailleurs induire une libération d'ECs dans le striatum. Dans le premier article nous montrons que les ECs régulent de façon négative l'induction de la PLT. Il est alors possible que 1) la NT exogène induise une libération d'ECs dans l'ATV aussi et 2) la stimulation extracellulaire locale dans l'ATV induise une libération de NT, induisant par la suite la synthèse et la libération des ECs et finalement 3) que ces ECs agissent pour inhiber l'induction de la PLT. Nous avons examiné ces trois questions dans le deuxième article présenté dans cette thèse.

Partie 4: Problématique et hypothèses

De nombreux travaux suggèrent que le système dopaminergique méso-corticolimbique, qui prend son origine dans l'ATV, est impliqué dans la toxicomanie. Par ailleurs, les drogues d'abus induisent toutes une plasticité synaptique des synapses glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques. Cette plasticité à long terme correspond à une forme de PLT. La plasticité synaptique induite par les drogues d'abus pourrait représenter une version pathologique d'une forme de plasticité normalement produite dans le contexte d'apprentissages motivationnels naturels. Ainsi, l'étude des mécanismes et des facteurs qui régulent cette PLT est essentielle pour mieux comprendre les effets des drogues dans l'ATV. Pourtant, il est notoirement difficile d'induire une PLT des synapses glutamatergiques de l'ATV *in vitro* par un protocole de stimulation électrique. Nous croyons que cette difficulté résulte en partie du fait que l'induction de cette PLT est étroitement régulée par de nombreux signaux endogènes. Dans le cadre de cette thèse, notre objectif principal était donc d'évaluer l'implication de deux messagers chimiques présents dans l'ATV et ayant le potentiel de réguler l'induction de la PLT.

Le récepteur principal des ECs, le CB1, est localisé de façon préférentielle sur les terminaisons glutamatergiques. Son activation par les ECs peut provoquer une diminution de la transmission synaptique glutamatergique. Sachant que les ECs peuvent être libérées par les neurones dopaminergiques de l'ATV en réponse à la stimulation répétée des afférences glutamatergiques ou à la dépolarisation cellulaire, nous avons émis l'hypothèse que le protocole de stimulation extracellulaire habituellement utilisé pour induire la PLT induit une libération d'ECs, ce qui pourrait réguler négativement l'induction de cette PLT.

La NT a de nombreuses influences sur le système méso-corticolimbique. Par ailleurs, il existe une dense innervation neurotensinergique au sein de l'ATV. Dans le striatum, la NT peut induire la libération d'ECs. Nous avons donc proposé l'hypothèse que la NT puisse être libérée en réponse au protocole de stimulation extracellulaire habituellement utilisé pour induire la PLT. La production d'ECs par les neurones

dopaminergiques dans ces circonstances pourrait ensuite inhiber l'induction de la PLT.
Pour une représentation schématique de ces hypothèses, voir la figure 10.

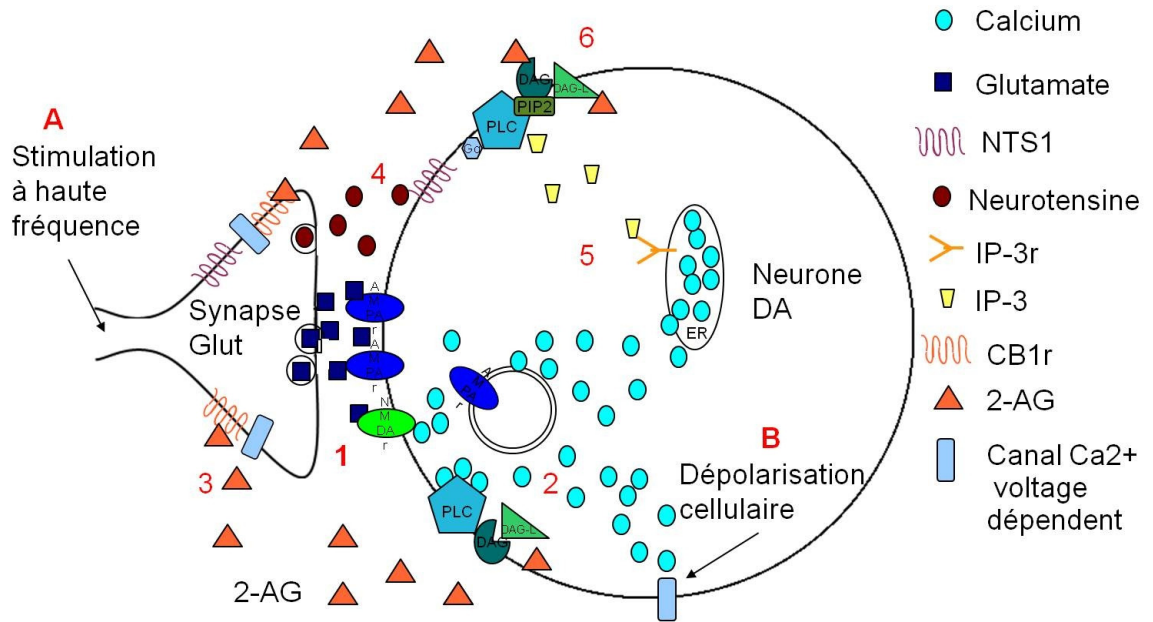


Figure 10: Représentation schématique des deux hypothèses principales: L'induction de la PLT implique la stimulation à haute fréquence des afférences glutamatergiques (A) et la dépolarisation du neurone post-synaptique enregistré (B). La stimulation présynaptique causerait la libération de glutamate et l'activation des récepteurs AMPA et NMDA postsynaptiques (1) et un influx calcique postsynaptique qui mène à une production de 2-AG (2). Le 2-AG se lie aux récepteurs CB1 sur la terminaison glutamatergique (3) ce qui diminuerait la libération de glutamate subséquente et perturberait l'induction de PLT. En même temps, la stimulation à haute fréquence pourrait causer la libération de la NT de l'afférence (4) ou d'une autre terminaison neurotensinergique locale, ce qui pourrait entraîner la libération de calcium des stocks intracellulaire via l'IP3 (5) et l'activation de PLC (6), deux signaux qui pourraient déclencher la production de 2-AG et perturber l'induction de la PLT.

Résultats

Contribution des co-auteurs

Les deux articles présentés dans cette section sont tous les deux le résultat d'expériences que j'ai effectuées au cours de mon doctorat. Je suis le premier et principal auteur des deux articles, ce qui implique que j'ai réalisé la plupart des expériences présentées dans ces articles et que je les ai rédigés. Ces travaux ont été supervisés par le Dr Louis-Eric Trudeau. Plusieurs autres personnes ont participé aux expériences et la préparation de ces manuscrits:

Article 1:

Caroline Fasano a aidé avec la conception des expériences, ainsi que la prise des images et la mise en page de celles-ci.

Dominic Thibault a effectué les expériences de transfection du récepteur CB1 sur les cellules HEK.

Jean-Claude Lacaille a mis à notre disposition le poste d'enregistrement électrophysiologique et a participé à la rédaction de l'article.

Article 2:

Laura Charlotte Bruneau a effectué les expériences d'immunohistochimie et l'analyse d'objets et de colocalisation.

Article 1

The endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol inhibits long-term potentiation of glutamatergic synapses onto ventral tegmental area dopamine neurons in mice.

Christian Kortleven (M.Sc.)^{1,2,3}, Caroline Fasano (PhD)^{1,3,*}, Dominic Thibault (M.Sc.)^{1,2,3},
Jean-Claude Lacaille (PhD)^{2,3} and Louis-Eric Trudeau (PhD)^{1,3}

¹Department of pharmacology, ²Department of physiology, ³Groupe de Recherche sur le
Système Nerveux Central, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

* Current affiliation: Douglas Mental Health University Institute, Montréal, Québec,
Canada

European Journal of Neuroscience, 2011, 33 (10): 1751-1760.

ABSTRACT

Drugs of abuse cause changes in the mesocorticolimbic dopamine system such as a long-term potentiation (LTP)-like phenomenon at glutamatergic synapses onto ventral tegmental area (VTA) dopamine (DA) neurons. Abolishing this LTP interferes with drug seeking behavior. Endocannabinoids (ECs) can be released by DA neurons in response to repetitive activation, which can inhibit glutamate release. Therefore, we hypothesized that ECs may act as negative regulators of LTP. Here we tested the induction of LTP in DA neurons of the VTA in mice expressing enhanced GFP (eGFP) under the control of the tyrosine hydroxylase (TH) promoter. Immunohistochemistry showed colocalization of CB1 receptors with vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in terminals near DA neuron dendrites, with less extensive colocalization with vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2). In addition, a CB1 receptor agonist, as well as trains of stimulation leading to EC production, decreased glutamate release onto DA neurons. We found that blocking CB1 receptors or synthesis of the EC 2-AG was without effect on basal EPSP-amplitude. However, it facilitated the induction of LTP. As previously reported, antagonizing GABA_A transmission also facilitated LTP induction. Combining GABA_A and CB1 receptor antagonists did not lead to larger LTP. LTP induced in the presence of CB1 receptor blockade was prevented by an NMDA receptor antagonist. Our observations argue in favor of the hypothesis that 2-AG acts as a negative regulator of LTP in the VTA. Understanding the factors that regulate long term synaptic plasticity in this circuit is critical to aid our comprehension of drug addiction in humans.

INTRODUCTION

Addiction is thought to be due, in part, to long-lasting changes in the mesocorticolimbic dopamine (DA) system. Behavioral sensitization, a long-lasting phenomenon thought to underlie the craving typical to addiction in humans (Berridge & Robinson, 1998), seems dependent on NMDA subtype glutamate receptor activation in the ventral tegmental area (VTA) (Kalivas & Alesdatter, 1993), as does conditioned place preference for cocaine and morphine (Harris & Aston-Jones, 2003; Harris *et al.*, 2004). A single cocaine injection *in vivo* causes an increase in the AMPA/NMDA ratio of glutamatergic synaptic currents, which is an indicator of long term potentiation (LTP) *in vivo*, in the VTA. (Ungless *et al.*, 2001). It was subsequently found that amphetamine, morphine, nicotine and ethanol all cause similar changes in the AMPA/NMDA ratio in VTA DA neurons (Saal *et al.*, 2003). Therefore, it seems that an induction of LTP at glutamatergic synapses onto DA neurons is a common denominator in the action of all major classes of drugs of abuse.

Chen et al (2008) showed that this LTP occurs when cocaine or natural rewards are self-administered. LTP at excitatory synapses in the VTA may thus underlie natural forms of motivational learning. Self-administration of cocaine caused an LTP that was significantly more persistent than that induced by natural rewards. This suggests that drugs of abuse hijack a natural learning mechanism in the VTA (*Chen et al*, 2008). Mice in which this LTP was abolished through selective inactivation of NMDA receptors in DA neurons exhibited a normal initial sensitization to cocaine, but showed significantly less drug-

induced locomotor activation 21 days after cocaine withdrawal, indicating an aberrant delayed sensitization. These mice also displayed a lack of conditioned place preference (Zweifel *et al.*, 2008), but see (Engblom *et al.*, 2008). Finally, reinstatement of cocaine seeking is abolished in similar KO mice (Engblom *et al.*, 2008).

Because of the implication of LTP at glutamatergic synapses onto VTA DA neurons in the long term actions of drugs of abuse, it seems essential to further understand the mechanisms that regulate the induction of LTP at these synapses. However, it has so far been difficult to reliably induce LTP in DA neurons *ex vivo*. A robust, albeit small, LTP was reported to be induced by a spike time pairing protocol (Liu *et al.*, 2005; Luu & Malenka, 2008). This LTP could be induced when GABA-transmission was blocked. These observations suggest that the induction of LTP may be gated by various neurotransmitter systems.

Endocannabinoids (ECs), acting in a retrograde fashion, can modulate neurotransmission and synaptic plasticity by a presynaptic mechanism through activation of CB1 receptors (for review, see: Chevalyere *et al.*, 2006). ECs have been shown to inhibit glutamatergic transmission onto VTA DA neurons (Melis *et al.*, 2004b; Melis *et al.*, 2004a). DGL-alpha, the biosynthetic enzyme of the EC 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), is expressed in VTA DA neurons and colocalizes with CB1 receptors on both symmetric and asymmetric terminals in this region (Matyas *et al.*, 2008). Here we tested the hypothesis that ECs negatively regulate LTP induction in the VTA.

MATERIAL AND METHODS

Animals. All procedures were approved by the animal ethics committee (CDEA) of the University of Montreal. Transgenic mice (P13-P24) of the TH-eGFP/21-31 line expressing the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene under the control of the tyrosine hydroxylase (TH) promoter (Sawamoto *et al.*, 2001), were used in all electrophysiological experiments to facilitate identification of VTA DA neurons. Although electrophysiological criteria are often used to identify presumed DA neuron in brain slice experiments, evidence has been presented that this may sometimes be unreliable (Table 1 in Jones & Kauer, 1999; Margolis *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2010), thus justifying the use of alternate approaches. In the present work, eGFP expression was used to initially select DA neurons. Considering the existence of a modest amount of ectopic eGFP expression in these mice (Jomphe *et al.*, 2005), post-recording immunohistochemistry was performed in most cases to confirm the presence of TH in the recorded neurons.

Drugs. The following drugs were used in electrophysiological experiments: SR95531 (10 and 2 μ M), WIN55,212-2 mesylate (1 μ M) (both from Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), AP5 (20 and 25 μ M) and AM251 (500 nM and 4 μ M) (Sigma, St- Louis, MO, USA), Tetrahydrolipstatin (2 μ M; intra-pipette) (Calbiochem, San Diego, CA, USA), CNQX (20 μ M) (RBI, Natick, MA, USA).

Slice preparation. Mice were anaesthetized with isoflurane and killed by decapitation. The brain was removed and placed in an ice-cold oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂) sucrose-solution which contained (in mM): sucrose (250), KCl (2), MgCl₂ (7), CaCl₂ (0.5), NaHPO₄ (1.2), glucose (11), NaHCO₃ (26), pH 7.35. Horizontal slices (250 μm) were cut in cold sucrose solution using a Leica VT1000S vibrating microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and transferred to a slice-saver containing oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at room temperature. ACSF contained (in mM): NaCl (126), KCl (3.5), MgCl₂ (1.3), CaCl₂ (2), NaHPO₄ (1.2), glucose (11), NaHCO₃ (26), pH 7.35, 305 mOsm. Slices were rested in ACSF for at least one hour before transfer to the recording chamber which was continuously perfused with oxygenated ACSF (1.5 ml/min) heated to 30 ± 1 °C, using a TC-324B in-line heating unit (Warner Instruments, Hamden, CT, USA).

Electrophysiology. The stimulation electrode (concentric bipolar Pt/Ir, FHC, Bodoïn, ME, USA) was positioned in the rostral part of the VTA and recordings were started only after an equilibration period of at least 20 minutes. Recording electrodes (3.5-7 MΩ) were pulled from borosilicate capillaries (WPI, FL, USA) using a p-97 Flaming Brown micro-pipette puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA). Electrodes were filled with an intrapipette solution containing (in mM): potassium methylsulfate (145), NaCl (10), EGTA (0.1), MgATP (2), GTP (Tris salt) (0.6), HEPES (10), phosphocreatine (10), pH 7.35, 300 mOsm. Biocytin (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to pipette solutions for post-recording identification of the neurons using immunohistochemistry.

Whole cell current- and voltage-clamp recordings were performed using a MultiClamp 700A amplifier, filtered at 2 KHz and digitized at 20 KHz and acquired using a Digidata 1440A digitizer, Pclamp 9 and 10 acquisition software and analyzed with Clampex software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Drugs were bath-applied and in case of recordings with the CB1 agonist WIN 55,212-2 and endocannabinoid release experiments, 2 μ M of SR95531 was added to the ACSF solution.

In experiments evaluating the effect of drugs on basal synaptic transmission, afferents were stimulated at 0.1 Hz for 40 minutes, or 32 minutes in the case of tetrahydrolipstatin (THL). Excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) were recorded from eGFP-expressing neurons that were current clamped at -70 mV. Drugs were applied after a baseline period of 4 minutes and the application was maintained throughout the remaining 36 minutes. In LTP experiments, drugs were bath applied 4 minutes before the start of the recordings, with the exception of experiments performed with THL in the intra-pipette solution. A 10 minute baseline period of 0.1 Hz extracellular stimulation and EPSP recording was obtained before LTP-induction took place. LTP was induced using the spike-time dependent pairing protocol described in Liu *et al* (2005). Briefly, an extracellular stimulation was followed 5 ms later by a 3 ms intracellular current injection of 1-2 nA to produce an action potential. This single pairing was performed 5 times per train at 10 Hz, for twenty trains, each separated by 5 seconds. Following LTP induction, a post-pairing period of 20 minutes identical to the baseline period was performed. For experiments evaluating endocannabinoid release induced by pairing trains, 15 baseline EPSPs were

evoked at 0.1 HZ, following which one or 20 pairing trains were applied. Five seconds after the trains, 10 more EPSPs were recorded at 0.1 Hz.

In experiments evaluating the pharmacological profile of EPSPs, 10 EPSPs at 0.1 Hz were obtained in the absence of pharmacological agents. CNQX (20 μ M) was then allowed to wash in for 5 minutes before a further 10 EPSPs were recorded in continued presence of the drug. SR95531 (2 μ M) was then added and allowed to wash in for 5 minutes. A final 10 EPSPs were obtained in the presence of both drugs.

The bridge balance (current-clamp) and series resistance (voltage-clamp) were monitored throughout all recordings and cells displaying a change of more than 30% in these parameters were discarded.

Cell culture and transfections. HEK 293 cells, used to test the specificity of the CB1 antibody, were plated on collagen/poly-L-lysine pre-coated 1.5-cm round glass coverslips and incubated in 100x15-mm Petri dishes (2 coverslips per dish) containing 2.5 ml of DMEM enriched with 1% penicillin-streptomycin, 1% glutamine and 10% foetal bovine serum (Wisent, St-Jean-Baptiste, Qc, Canada). Upon reaching \pm 80% confluence, coverslips were transferred to 12-well plates containing 1 ml per well of basic DMEM, and the cells were transiently transfected with a Flag-tagged CB1 plasmid (provided by Dr. K. Mackie, Indiana University) using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. 24 to 48h later, cells were fixed for 20 minutes in 4% PFA before immunocytochemistry.

Immunohisto- and immunocytochemistry. Immunolabeling was performed to confirm the recorded neuron's dopaminergic phenotype. Slices were fixed for at least 24h in 4% PFA and incubated overnight with a mouse monoclonal anti-TH antibody (1:5000) (Sigma). Slices were then incubated for 2 hours with both a fluorescent anti-mouse secondary antibody (1:250-1:500) (Alexa 546) to visualize the TH primary antibody and a streptavidin-conjugated Alexa 488 antibody (1:250) to visualize biocytin.

Tissue used for the immunostaining shown in figure 2 was obtained by transcardial perfusion with 4% PFA in PBS of deeply anaesthetized mice (P16). The brains were immediately removed afterwards and kept in 4% PFA for 4 hours, before being transferred to PBS with 0.01% NaN₃ and stored for 24 hours at 4°C. Horizontal Sections (25 µm) were then prepared using the vibrating microtome.

For eGFP labeling, performed to show colocalization of eGFP and TH (Fig. 1), a rabbit anti-GFP primary antibody (1:5000) (Clontech, Mountain View, CA, USA) was used and visualized with an anti-rabbit fluorescent secondary antibody (Alexa 488, 1:250). For the labeling of CB1, VGLUT1 and VGLUT2, to show the presence of these receptors on glutamatergic afferents, a rabbit anti-CB1 primary antibody (Nyiri *et al.*, 2005) was used (1:500, provided by Dr. K. Mackie, Indiana University) and visualized by an anti-rabbit fluorescent secondary antibody (Alexa 647, 1:250) and a guinea pig anti-VGLUT1 (1:5000) or a mouse anti-VGLUT2 primary antibody (1:1000) (Millipore, Billerica, MA, USA), visualized by an anti-guinea pig (Alexa 555, 1:250) or a mouse fluorescent secondary antibody (Alexa 546, 1:250).

For labeling of transfected HEK-cells, a mouse anti-FLAG antibody, conjugated to FITC, was used to confirm transfection and to determine colocalization with CB1 immunoreactivity, as previously described. All fluorescent secondary antibodies were obtained from Molecular Probes, Eugene, OR, USA.

For capture of epifluorescence images (Figure 1 & S-1), an inverted Nikon Eclipse TE-200 fluorescence microscope equipped with a Hamamatsu Orca-II digital-cooled CCD camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA) and an Olympus workstation using the Image-Pro Plus 6.2 software suite was used. Fluorescence excitation was controlled through the ScopePRO module of Image-Pro Plus and a DG4 xenon lamp (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Fluorescence was using collected using a Nikon 4X (0.13 N.A.) or 40X objective (N.A. 0.75) after passing through 510-550-nm (Alexa 488) or 575-645-nm (Alexa 546) band-pass emission filters.

For capture of confocal images (Figure 2), a laser scanning confocal microscope (Fluoview FV1000, Olympus) was used together with an Olympus 60X oil-immersion objective (N.A. 1.42). The 488 nm wavelength of an argon laser was used for excitation of eGFP. Fluorescence was collected after passing through a 500-530 nm band-pass emission filter. The 543 nm wavelength of a helium-neon laser was used for excitation of the Alexa 546-coupled and Alexa 555-coupled secondary antibodies used to detect VGLUT2 and VGLUT1 receptor antibodies respectively. Fluorescence was collected after passing through a 555-625 nm band-pass emission filter. The 633 nM wavelength of a helium-neon laser was used for excitation of the Alexa 647-coupled secondary antibodies used to detect

the CB1 antibodies. Fluorescence was collected after passing through a 655-755 nm band-pass emission filter.

Colocalization analysis. Image stacks were obtained from the VTA of a total of 12 immunostained slices, 6 for VGLUT1 and 6 for VGLUT2. A threshold was applied and 3 images per stack were analyzed for percentage of colocalization of VGLUT and CB1 signals and one average percentage of signal overlap per stack was thus obtained. No analysis of the absolute number of VGLUT terminals containing CB1 receptor was performed. It should be noted that since the colocalization analysis performed takes into account the surface of two signals, a value of 10% colocalization does not mean that 10% of terminals contain CB1 signal, but rather that 10% of the surface occupied by VGLUT signal is occupied by CB1 signal.

Statistical analysis. The amplitude of recorded EPSPs was measured using Clampex software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). In experiments evaluating basal synaptic transmission, the 4 minute baseline period was normalized to the average of the first two minutes of this period. In LTP recordings, the last 5 minutes of the baseline period was normalized to the first 2.5 minutes of this same 5 minute period. The last 10 minutes of all recordings were compared to these normalized baseline periods. For experiments evaluating endocannabinoid release in response to pairing trains, all 15 EPSPs of the baseline period were normalized to the average of the first 7 EPSPs evoked during that baseline period. The last 10 of these baseline EPSPs were compared to the 10 EPSPs that

followed the pairing trains. Two-tailed paired and unpaired t-tests and ANOVAs with Tukey post-hoc tests were performed, where appropriate, using Graphpad Prism software (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. Values are presented as average \pm SEM. All averages are expressed as percentages of baseline values.

RESULTS

Identification of VTA DA neurons

Patch-clamp recordings were obtained from VTA DA neurons in horizontal brain slices. Because current electrophysiological methods to identify DA neurons such as the presence or absence of the rectifying current I_h may be unreliable (Table 1 in Jones & Kauer, 1999; Margolis *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010), we used a line of mice expressing eGFP under the control of the TH promoter (Sawamoto *et al.*, 2001) (Fig. 1A-C). Post-recording anti-TH immunohistochemistry was performed to confirm the expression of TH in most recorded neurons (Fig. 1D-F). Out of 194 recorded eGFP positive neurons that were identified by the presence of biocytin, 87,1% were confirmed to be immuno-positive for TH (not shown). Neurons that were conclusively confirmed not to express TH were excluded from final analyses. 32 neurons were identified solely by eGFP expression prior to recording.

CB1 receptors are present on VGLUT1 and VGLUT2 positive axon terminals in the VTA.

To validate that CB1 receptors are indeed present and functional on glutamatergic afferents to the VTA in our mouse model and determine whether these are VGLUT1-expressing terminals, predicted to be of cortical origin, and/or VGLUT2-expressing terminals, predicted to be of sub-cortical origin (Geisler *et al.*, 2007), we performed CB1

immunohistochemistry and used the CB1 receptor agonist WIN55,212-2 mesylate (1 μ M) (WIN). Using double-labeling immunohistochemistry, we evaluated the distribution of CB1 receptors on glutamatergic axon terminals in close proximity to DA neurons. We used the endogenous eGFP signal to identify the dendrites and cell body of DA neurons (Fig. 2A and 2E). CB1 receptors were localized using an antibody that otherwise strongly and selectively recognized CB1 receptors, as confirmed by over-expression of the receptor in HEK cells (Supplementary Fig. 1). This specificity test was performed, as it has been reported that commercially available CB1-receptor antibodies are often unreliable (Grimsey *et al.*, 2008).

CB1-immunoreactivity was detected in punctate structures close to VTA DA neuron dendrites (Fig. 2B and 2F). Abundant VGLUT1- and VGLUT2 positive terminals were also detected (Fig. 2C and 2G), and colocalization between the CB1 signal and the VGLUT signals was found in a subset of axonal-like varicosities, suggesting that the CB1 receptor is indeed present on glutamatergic terminals close to DAergic cell bodies and dendrites in the TH-eGFP/21-31 mouse line (Fig. 2D and 2H). Colocalization analysis on confocal images taken from thin slices (25 μ m) of the mouse VTA (P16), revealed that $7.25 \pm 1.5\%$ of VGLUT1 signal colocalized with CB1 staining in the VTA, and $11.15 \pm 1.08\%$ of total CB1 staining colocalizes with VGLUT1 staining (N=23 stacks of 3 images each, 6 slices). In comparison, although quite abundant, only $0.15 \pm 0.04\%$ of VGLUT2 signal colocalized with CB1 staining and $0.85 \pm 0.13\%$ of total CB1 staining colocalized with VGLUT2 staining (N=18 stacks of 3 images each, 6 slices). There was thus significantly more CB1 signal that colocalized with VGLUT1 compared to VGLUT2 ($t_{39}=4.172$, $P=0.0002$).

In support of this morphological data, we found that the CB1 receptor agonist WIN55,212-2 mesylate (WIN) caused a robust decrease in evoked EPSC amplitude ($48.8 \pm 14.9\%$, $N=5$, $t_4=9.287$, $P=0.0007$) (Fig. 3A-B). This strongly suggests that CB1 receptors are indeed present on glutamatergic synapses onto DA neurons, the activation of which results in a decrease of glutamate-release. Such receptors can also be activated by the release of ECs, as confirmed by our ability to induce depolarization-induced suppression of excitation, using a stimulation protocol that was previously used successfully in rat VTA DA neurons (Melis *et al.*, 2004a). This protocol consisted of a single train of 10 extracellular stimulations evoked at 5 Hz. We found that the amplitude of the first two EPSPs evoked after this stimulation protocol was significantly decreased compared to baseline ($74.02 \pm 3.7\%$, $N=4$, $t_3=11.95$, $P=0.0013$, not shown). This decrease was abolished by the CB1 receptor antagonist AM251 ($4 \mu\text{M}$) ($106.2 \pm 3.1\%$, $N=4$, $t_3=1.199$, $P=0.32$, not shown). Finally, we tested whether pairing trains such as those used in our LTP induction protocol also cause a similar decrease in glutamatergic transmission in DA neurons through release of ECs. Although a single pairing train did not produce a classical, short-lasting, decrease in the amplitude of the first two EPSPs following the train, this stimulation protocol induced a slowly-developing and significant overall decrease of EPSP amplitude, reaching $86.9 \pm 4.6\%$ of pre-train values ($N = 10$, $t_9=2.719$, $P=0.024$) (Fig. 3C). This decrease was abolished by the CB1 receptor antagonist AM251 ($4\mu\text{M}$), with post-train values reaching $102.5 \pm 3.3\%$ of pre-train values ($N=8$, $t_7=1.317$, $P=0.23$) (Fig. 3D). These experiments were performed in the presence of AP-5 ($20 \mu\text{M}$) to avoid NMDA receptor-dependent facilitation caused by the train. The average post-train amplitude was

significantly decreased in the presence of AP-5 alone, but not in the presence of both AP-5 and AM251 ($t_{16}=2.619$, $P=0.019$) (Fig. 3E). Similarly, when tested in the presence of AP-5, the 20 pairing trains used in our LTP induction protocol caused a small but statistically significant decrease in the amplitude of the first two EPSPs after the pairing trains, compared to the pre-train values ($N=8$, $t_7=2.853$, $P=0.025$) (Fig. 3F).

As the decreases in EPSP-amplitude presumably caused by EC release were rather small, we wondered whether the full magnitude of EC release was partly masked by non-NMDA mediated facilitation of synaptic transmission. Similar experiments were therefore performed with unchanged extracellular stimulation parameters, but without post-synaptic action potentials. We found that after 20 trains of non-paired stimulation, the amplitude of the first two post-stimulation EPSPs significantly decreased to $69.79 \pm 9.14\%$ of pre-train values ($N=10$, $t_9=3.228$, $P=0.01$) (Fig. 3G). This decrease was abolished when AM251 was present ($104 \pm 7.6\%$, $N=8$, $t_7=0.409$, $P=0.7$) (Fig. 3H). The average amplitude of the first two EPSPs in the absence of AM251 was thus significantly smaller than the average in the presence of AM251 ($t_{16}=2.795$, $P=0.013$) (Fig. 3I), showing that during stimulation trains, significant EC release and CB1 activation occurs.

Evidence for tonic inhibition of glutamatergic transmission onto DA neurons through GABA_A but not CB1 receptors.

We first evaluated the effect of GABA_A and CB1 receptor antagonists, as well as the 2-AG synthesis inhibitor tetrahydrolipstatin (THL) on basal synaptic transmission evoked at a rate

of 0.1 Hz (Fig. 4A). The GABAA receptor antagonist SR95531 (10 μ M) caused a gradually-developing increase in evoked EPSP-amplitude reaching an average of $124 \pm 8.4\%$ of baseline values during the last 10 minutes of drug application (N=8, $t_7=3.329$, $P=0.013$). In comparison, in control experiments without drug application, no significant change in EPSP-amplitude was detected ($100.8 \pm 13.4\%$ of baseline value, N=5, $t_4=0.04732$, $P=0.97$). Similarly, the CB1 receptor antagonist AM251 (500 nM) caused no change in EPSP-amplitude ($101.4 \pm 9.3\%$, N=6, $t_5=0.478$, $P=0.65$), nor did THL (2 μ M) when present in the intrapipette solution ($105 \pm 10.2\%$, N=6, $t_5=0.6081$, $P=0.57$) (Fig. 4A). These findings suggest that while GABAA receptor-mediated transmission tonically inhibits glutamatergic EPSPs under our conditions, CB1 receptor-mediated transmission does not.

The gradually-developing increase in EPSP-amplitude during application of SR95531 (Fig. 4B) may reflect a mechanism of synaptic plasticity. Alternately, it could simply suggest that under our recording conditions, a small overlapping GABA-mediated IPSP was present and gradually blocked by SR95531. To test this possibility, we evoked EPSPs at -70 mV and applied CNQX (20 μ M) to determine how much of the recorded postsynaptic response was AMPA-receptor-mediated. We found that after 5 minutes of CNQX, only $1.99 \pm 2.9\%$ of the initial EPSP-amplitude remained. Subsequent application of SR95531 failed to further reduce that small remaining synaptic response ($1.94 \pm 1.98\%$ of the initial EPSP-amplitude) (N=5, $t_4=0.018$, $P=0.99$) (Fig. 4C). These findings show that the increase in EPSP-amplitude observed after SR95531 was not due to the presence of overlapping IPSPs.

GABA and 2-AG negatively regulate the induction but not expression of NMDA-dependent LTP in the VTA.

We next examined induction of LTP using a spike-time pairing protocol. As previously shown (Liu *et al.*, 2005), under drug-free conditions (ACSF), this LTP protocol was ineffective in inducing a change in EPSP-amplitude ($99.5 \pm 6.4\%$, $N=6$, $t_5=0.1057$, $P=0.92$) (Fig. 5A). In the presence of SR95531 (10 μ M), significant LTP was induced ($123.1 \pm 8.9\%$, $N=10$, $t_9=2.824$, $P=0.02$) (Fig. 5B). The effect of SR95531 alone did not interfere with the quantification of LTP because its effect had already reached a plateau by the pre-induction time period of LTP experiments, as revealed by an analysis of control experiments evaluating the effect of SR95531 on EPSP amplitude at periods that correspond to the analyzed pre- and post induction periods in the LTP group (Fig. 4B) ($t_{14}=0.966$, $P = 0.35$). This observation of LTP induced in the presence of GABA_A blockade is compatible with previous findings obtained in rats and wild-type mice (Liu *et al.*, 2005; Luu & Malenka, 2008) and shows that similar LTP can be induced in eGFP positive DA neurons of TH-eGFP mice.

Because DA neurons release ECs during the stimulation trains used to induce LTP, we reasoned that these ECs could partially counteract the induction of LTP. To test this hypothesis, we evaluated the induction of LTP in the presence of the CB1 receptor antagonist AM251. A significant LTP was induced under these conditions ($115.7 \pm 4.9\%$, $N=11$, $t_{10}= 2.757$, $P=0.02$ at 500 nM of AM251 and $128.8 \pm 11.2 \%$, $N=10$, $t_9=2.489$, $P=0.034$ at 4 μ M of AM251) (Fig. 5C-D respectively), compatible with the idea that

activation of CB1 receptors occurs during stimulation trains, thus negatively influencing LTP induction or expression.

We next evaluated whether ECs influence the expression rather than the induction of LTP. We bath-applied AM251 immediately after the LTP pairing trains had taken place. We found that no LTP occurred under these circumstances ($97.69 \pm 5.28\%$, $N=6$, $t_5=0.0001$, $P=0.99$) (Fig. 5E), showing that ECs need to be blocked during and not after pairing stimuli. These findings show that ECs negatively regulate LTP induction and not LTP expression.

In order to identify which EC was involved in the inhibition of plasticity at these synapses, we added the 2-AG synthesis inhibitor tetrahydrolipstatin (THL) to the pipette solution ($2\mu\text{M}$). In the presence of THL, LTP was induced ($138.8 \pm 14.8\%$, $N=9$, $t_8=2.971$, $P=0.018$) (Fig. 5F). The magnitude of LTP induced in the presence of THL was not different than that induced in the presence of 500 nM or $4\ \mu\text{M}$ of AM251 ($F_{2,27}=1.203$, $P=0.316$, ANOVA with Tukey post-hoc analysis). This observation suggests that 500 nM of AM251 is sufficient to block enough CB1 receptors to prevent the inhibitory effect of 2-AG on LTP induction. Also, this strongly suggests that 2-AG is likely to be the sole EC required for this CB1-mediated inhibition of LTP-induction at glutamatergic synapses onto DA neurons.

To verify whether GABA and ECs affect LTP independently, we combined both SR95531 ($10\mu\text{M}$) and AM251 (500nM) (Fig. 5G). In the presence of both antagonists, a robust LTP was induced ($132 \pm 8.2\%$, $N=9$, $t_8=3.692$, $P=0.004$) which, however, was not

significantly different from that induced in the presence of either antagonist alone ($F_{2,29}=2.437$, $P=0.105$, ANOVA with Tukey post-hoc analysis).

Considering that NMDA receptors are necessary for the induction of behavioral sensitization to drugs of abuse and that an LTP-like phenomenon may be involved, we next evaluated whether LTP induced in VTA DA neurons by spike-time pairing in the presence of GABAA and CB1 receptor antagonists is also dependent on NMDA receptors. We found that no LTP could be induced in the presence of the NMDA receptor antagonist AP5 (25 μ M) ($90.5 \pm 5.4\%$, $N=6$, $t_5=0.4517$, $P=0.67$) (Fig. 5H).

The summary data of all LTP experiments is shown in Figure 5I.

DISCUSSION

In the present work, we first showed that functional CB1 receptors are present on VGLUT1-positive terminals in close proximity of DA neuron dendrites, with less extensive colocalization found in VGLUT2-positive terminals. We found that in addition to GABAA receptors, EC CB1 receptors also negatively regulate LTP induction in the VTA through their activation by 2-AG. Moreover, the facilitation of LTP induced by antagonists of the two types of receptors was not additive, suggesting the implication of a final common pathway or the presence of a ceiling-effect. Finally, ECs appear to act as negative regulators of LTP induction, rather than LTP expression.

Based on functional and structural data, glutamatergic fibers in the rat VTA have been previously suggested to possess CB1 receptors, activation of which can cause a decrease of EPSC amplitude (Melis *et al.*, 2004a; Melis *et al.*, 2004b; Matyas *et al.*, 2008). Here we confirmed these findings in our transgenic TH-eGFP mice. The region of origin of the stimulated glutamatergic afferents was not identified in the present study, but previous work has shown that they originate in large part from the prefrontal cortex and several subcortical regions (Geisler *et al.*, 2007). Our immunohistochemical co-identification of VGLUT 1 and 2 with CB1-positive terminals in the VTA suggests that although CB1 receptors are present on glutamatergic afferents coming from both cortical and subcortical regions, they may be more abundant on VGLUT1-positive terminals, presumably coming from cortical regions,

The large population of VGLUT-negative terminals containing CB1 receptors that we observed can be presumed to be GABAergic, as a large proportion of intrinsic VTA neurons are GABAergic and this region also receives dense GABAergic projections. The presence of CB1 receptors on VTA axon terminals presumed to be GABAergic based on ultrastructural characteristics has been shown recently (Matyas *et al.*, 2008). The relative abundance of such CB1-expressing GABAergic terminals in the VTA may explain the previous observation that the summed effect of systemic and local administration of CB1 receptor agonists on VTA DA neurons is excitation (French *et al.*, 1997; Cheer *et al.*, 2000).

We showed that these CB1 receptors are activated during stimulation and pairing trains used to induce LTP induction in VTA DA neurons. We detected an AM251-sensitive decrease in EPSP amplitude after both paired and un-paired trains of stimulation, suggesting that ECs are produced under conditions used to induce LTP. The specific signal leading to the activation of EC production was not identified in the present work, but calcium influx through dendritic voltage-dependent calcium channels or activation of metabotropic glutamate receptors (mGluR) could be involved (Chevaleyre *et al.*, 2006).

Importantly, we found that blocking CB1 receptors allowed for induction of LTP, as does inhibiting the synthesis of 2-AG. Blocking CB1 receptors after the induction protocol had taken place was not sufficient to allow for LTP to occur. This suggests that the activation of CB1 receptors occurring during a pairing train interferes with induction, rather than expression, of LTP and that the EC released during the trains is 2-AG. This is compatible

with the finding that hippocampal LTP elicited by moderate stimulations or theta-burst stimulations is facilitated by CB1 receptor blockade (Slanina *et al.*, 2005, but see Carlson *et al.*, 2002), as well with the demonstration that 2-AG-dependent LTD of glutamatergic synapses can be induced in midbrain DA neurons during low frequency stimulation combined with moderate post-synaptic depolarization (Haj-Dahmane & Shen, 2010).

Although previous work had shown that blocking GABA_A receptors facilitates LTP induction in the rat VTA (Liu *et al.*, 2005) without inducing a change in basal synaptic transmission, in the present work we found that by itself, the GABA_A receptor antagonist SR95531 caused a gradually-developing increase in EPSP-amplitude. The incongruity between our results and those of Liu *et al* may perhaps be explained by the difference in species used (rats vs mice) or in identification of DA neurons before recording. It is possible that by using I_h- and firing rate parameters as criteria for DA neuron identification, these authors included a different sub-set of neurons with differential synaptic properties in comparison to DA neurons identified in the present work on the basis of TH promoter activity and post-recording TH immunohistochemistry. This latter approach is likely to have allowed us to sample a broader population of confirmed DA neurons. A recent extracellular recording study performed in the VTA reported that bath application of a GABA_A antagonist increased the amplitude of evoked field-potentials as well as EPSPs measured intracellularly, presumably by blocking simultaneously-generated and overlapping IPSPs (Nugent *et al.*, 2008). We found that no significant overlapping IPSPs were present under our conditions. However, we cannot exclude a possible implication of GABA_A receptor-mediated shunting or an increase in fiber excitability in mediating the

increase in EPSP-amplitude. Irrespective of the direct effect of GABA_A receptor blockade, we confirmed here in TH/eGFP transgenic mice the previous conclusion that a significant LTP can indeed be induced in the VTA under such conditions (Liu *et al.*, 2005; Luu & Malenka, 2008).

Although both GABA_A and CB1 receptor blockade facilitated the induction of LTP, we found that simultaneous blockade of both receptors did not lead to a statistically significant increase in the magnitude of LTP. One interpretation of this finding is that both of these manipulations facilitate LTP through a final common pathway. However, it is also possible that in VTA dopamine neurons, a ceiling effect prevents any further increase in the magnitude of LTP induced in this manner, thus preventing any additive effect of the two manipulations.

The NMDA receptor antagonist AP-5 prevented the induction of LTP when applied in the presence of both GABA_A and CB1 receptor antagonists. This finding, compatible with recent reports (Liu *et al.*, 2005; Argilli *et al.*, 2008; Luu & Malenka, 2008), confirms that spike time dependent LTP relies on activation of NMDA-receptors. In this context, it is interesting to note that cell-specific knock-out of NMDA receptor NR1 subunits in mouse DA neurons prevents enhancement of glutamatergic transmission in the VTA by cocaine but fails to block the initial phase of locomotor sensitization to this drug (Engblom *et al.*, 2008; Zweifel *et al.*, 2008). However, other adaptive changes to drugs of abuse such as reinstatement of drug seeking and the late phase of sensitization after prolonged drug withdrawal were abolished in these KO mice (Engblom *et al.*, 2008; Zweifel *et al.*, 2008).

Also, when cocaine induced LTP at glutamatergic synapses onto DA neurons is persistent, plasticity occurs in the nucleus accumbens (Mameli *et al.*, 2009).

The physiological impact of LTP of glutamatergic inputs to DA neurons on the activity of these neurons and on DA release is presently undetermined. Although facilitation of DA release could occur, it is important to consider that GABAergic transmission onto DA neurons can also undergo NMDA-dependent LTP through retrograde nitric oxide signalling (Nugent *et al.*, 2007). Such parallel potentiation of GABAergic synapses could act as a gain modulator in these circuits. Although the specific role and impacts of LTP at glutamatergic afferents onto DA neurons remains to be clarified, it is likely to be of great importance for long-term adaptations to drugs of abuse.

Additional work will also be required to explore the physiological significance of 2-AG as a negative regulator of LTP induction in the VTA. What signals lead to the production of 2-AG is presently unclear. We showed that under circumstances where AP-5 is blocking NMDA receptor signaling, pairing trains induce a small but significant AM251-sensitive decrease in glutamate release. However, in the absence of both AP-5 and post-synaptic action potentials, a more extensive AM251-sensitive decrease in EPSP amplitude was detected. One interpretation of these findings is that 2-AG production is partly, although not entirely dependent on calcium influx through the NMDA receptor.

An additional implication of mGluR receptors is possible.

However, Luu & Malenka (2008) showed that a broad-spectrum mGluR antagonist fails to facilitate LTP induced in the presence of picrotoxin in VTA DA neurons. It is to be noted,

nonetheless, that the ability of an mGluR antagonist to facilitate STD-LTP when applied alone has not been evaluated. It also remains to be determined whether other sources of calcium influx such as voltage-dependent calcium channels could participate.

Since blocking CB1 receptors or synthesis of 2-AG facilitated LTP induction, we can hypothesize that 2-AG acts through CB1 receptors to inhibit excitation of DA neurons and reduces DA release and behavioral responses to drugs of abuse. However, as mentioned previously, CB1 receptor activation enhances the firing of DA neurons and previous work has shown that phasic DA release in response to drugs of abuse in the nucleus accumbens partly requires CB1 receptor activation (Cheer *et al.*, 2007). In addition, blockade or knock-out of the CB1 receptor causes blunting of cocaine self-administration (Soria *et al.*, 2005). Such a paradox can only be resolved by considering the global effect of CB1 receptors on both GABAergic and glutamatergic terminals in the VTA, as well as the widespread distribution of CB1 receptors elsewhere in the brain. The implication of CB1 receptors in gating the induction of long-term depression of GABAergic inputs to DA neurons in response to repeated cocaine administration and activation of mGluRs by glutamate is likely to be a factor explaining the facilitatory role of ECs in addiction (Pan *et al.*, 2008a, b).

We showed in the present work that induction of LTP in the VTA can be facilitated when 2-AG action at CB1 receptors is blocked, through a pathway that at least partially overlaps with that induced by GABA_A blockade. Considering recent work suggesting that other neuromodulators such as orexin-A can also regulate LTP in the VTA (Borgland *et al.*,

2006), it is possible that while LTP is difficult to induce under basal conditions in the VTA, a number of different signals exist that can gate its induction under appropriate physiological or pathological conditions. Because LTP at glutamatergic synapses onto VTA DA neurons represents a likely mechanism by which drugs of abuse cause long lasting drug-related adaptive changes, further work will be critical to elucidate the conditions and mechanisms by which LTP can be induced in this structure.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to L.-E. Trudeau (MOP-49591) and to J.-C. Lacaille (MOP-10848) and from an infrastructure grant from the Fonds de la recherche en santé du Québec to the GRSNC. J.-C.L is the recipient of the Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology. The authors would like to thank Dr. K. Kobayashi for the use of the TH-eGFP mice, Dr. K. Mackie for graciously providing the CB1 antibody and plasmid and Marie-Josée Bourque for her help in the immunohistochemical identification of dopamine neurons.

The authors declare to have no conflicts of interest.

ABBREVIATIONS

2-AG, 2-Arachidonoylglycerol;
DA, dopamine;
EC, endocannabinoid;
eGFP, enhanced green fluorescent protein;
LTP, long-term potentiation;
mGluR, metabotropic glutamate receptor
TH, tyrosine hydroxylase;
THL, Tetrahydrolipstatin
VGLUT, vesicular glutamate transporter;
VTA, ventral tegmental area;
WIN, WIN55,212-2 mesylate;

REFERENCES

- Argilli E., Sibley D.R., Malenka R.C., England P.M. & Bonci A. (2008). Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **28**, 9092-9100.
- Berridge K.C. & Robinson T.E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* **28**, 309-369.
- Carlson G., Wang Y. & Alger B.E. (2002). Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* **5**, 723-724.
- Cheer J.F., Marsden C.A., Kendall D.A. & Mason R. (2000). Lack of response suppression follows repeated ventral tegmental cannabinoid administration: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* **99**, 661-667.
- Cheer J.F., Wassum K.M., Sombers L.A., Heien M.L., Ariansen J.L., Aragona B.J., Phillips P.E. & Wightman R.M. (2007). Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *J Neurosci* **27**, 791-795.
- Chen B.T., Bowers M.S., Martin M., Hopf F.W., Guillory A.M., Carelli R.M., Chou J.K. & Bonci A. (2008). Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**, 288-297.
- Chevalyere V., Takahashi K.A. & Castillo P.E. (2006). Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*.

- Haj-Dahmane, S. & Shen R.Y. (2010). Regulation of Plasticity of Glutamate Synapses by Endocannabinoids and the Cyclic-AMP/Protein Kinase A Pathway in Midbrain Dopamine Neurons. *J Physiol*. (In press)
- Engblom D., Bilbao A., Sanchis-Segura C., Dahan L., Perreau-Lenz S., Balland B., Parkitna J.R., Lujan R., Halbout B., Mameli M., Parlato R., Sprengel R., Luscher C., Schutz G. & Spanagel R. (2008). Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron* **59**, 497-508.
- French E.D., Dillon K. & Wu X. (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* **8**, 649-652.
- Geisler S., Derst C., Veh R.W. & Zahm D.S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* **27**, 5730-5743.
- Grimsey NL, Goodfellow CE, Scotter EL, Dowie MJ, Glass M & Graham ES. (2008). Specific detection of CB1 receptors: cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *J. Neurosci Methods* **171**, 78-86.
- Harris G.C. & Aston-Jones G. (2003). Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. *Neuropsychopharmacology* **28**, 73-76.
- Harris G.C., Wimmer M., Byrne R. & Aston-Jones G. (2004). Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine. *Neuroscience* **129**, 841-847.
- Jomphe C., Bourque M.J., Fortin G.D., St-Gelais F., Okano H., Kobayashi K. & Trudeau L.E. (2005). Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified

dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J Neurosci Methods* **146**, 1-12.

Jones S. & Kauer J.A. (1999). Amphetamine depresses excitatory synaptic transmission via serotonin receptors in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **19**, 9780-9787.

Kalivas P.W. & Alesdatter J.E. (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**, 486-495.

Liu Q.S., Pu L. & Poo M.M. (2005). Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* **437**, 1027-1031.

Luu P. & Malenka R.C. (2008). Spike timing-dependent long-term potentiation in ventral tegmental area dopamine cells requires PKC. *J Neurophysiol* **100**, 533-538.

Mameli M., Halbout B., Creton C., Engblom D., Parkitna J.R., Spanagel R. & Luscher C. (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat Neurosci* **12**, 1036-1041.

Margolis E.B., Lock H., Hjelmstad G.O. & Fields H.L. (2006). The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol* **577**, 907-924.

Matyas F., Urban G.M., Watanabe M., Mackie K., Zimmer A., Freund T.F. & Katona I. (2008). Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* **54**, 95-107.

- Melis M., Perra S., Muntoni A.L., Pillolla G., Lutz B., Marsicano G., Di Marzo V., Gessa G.L. & Pistis M. (2004a). Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci* **24**, 10707-10715.
- Melis M., Pistis M., Perra S., Muntoni A.L., Pillolla G. & Gessa G.L. (2004b). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci* **24**, 53-62.
- Nugent F.S., Hwang A.R., Udaka Y. & Kauer J.A. (2008). High-frequency afferent stimulation induces long-term potentiation of field potentials in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1704-1712.
- Nugent FS, Penick EC & Kauer JA. (2007). Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature* **446**, 1086-1090
- Nyiri G., Cserep C., Szabadits E., Mackie K., Freund T.F. (2005). CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* **136**(3): 811-822.
- Pan B., Hillard C.J. & Liu Q.S. (2008a). D2 dopamine receptor activation facilitates endocannabinoid-mediated long-term synaptic depression of GABAergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons via cAMP-protein kinase A signaling. *J Neurosci* **28**, 14018-14030.
- Pan B., Hillard C.J. & Liu Q.S. (2008b). Endocannabinoid signaling mediates cocaine-induced inhibitory synaptic plasticity in midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* **28**, 1385-1397.

- Saal D., Dong Y., Bonci A. & Malenka R.C. (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* **37**, 577-582.
- Sawamoto K., Nakao N., Kobayashi K., Matsushita N., Takahashi H., Kakishita K., Yamamoto A., Yoshizaki T., Terashima T., Murakami F., Itakura T. & Okano H. (2001). Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6423-6428.
- Slanina K.A., Roberto M. & Schweitzer P. (2005). Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology* **49**, 660-668.
- Soria G., Mendizabal V., Tourino C., Robledo P., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R. & Valverde O. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1670-1680.
- Ungless M.A., Whistler J.L., Malenka R.C. & Bonci A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* **411**, 583-587.
- Zhang T.A., Placzek, A.N. & Dani J.A. (2010) In vitro identification and electrophysiological characterization of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* **59**, 431-436.
- Zweifel L.S., Argilli E., Bonci A. & Palmiter R.D. (2008). Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron* **59**, 486-496.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

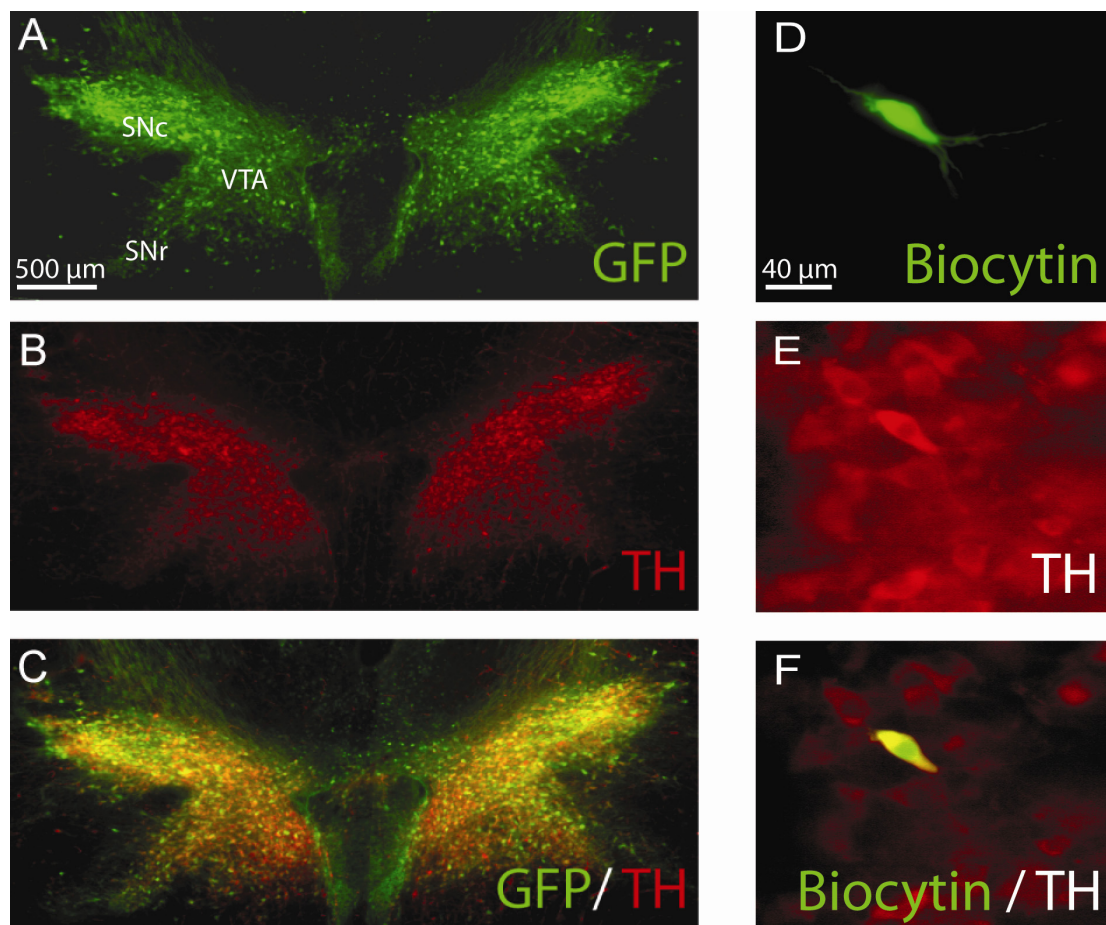


Figure 1: Identification and localization of DA neurons in TH-eGFP/21-31 mice. **A.** eGFP amplified by anti-eGFP immunostaining identifying DA neurons of the VTA and substantia nigra compacta (SNc) and – reticulata (SNr) in a horizontal brain section prepared from a postnatal day 15 mouse. **B.** Anti-tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining of the same brain section shown in *A*. **C.** Merged image showing the extensive colocalization of both signals. **D.** A recorded neuron labeled for biocytin. **E.** The same section, stained for TH. **F.** Merge of the two images, confirming the expression of TH in the recorded neuron.

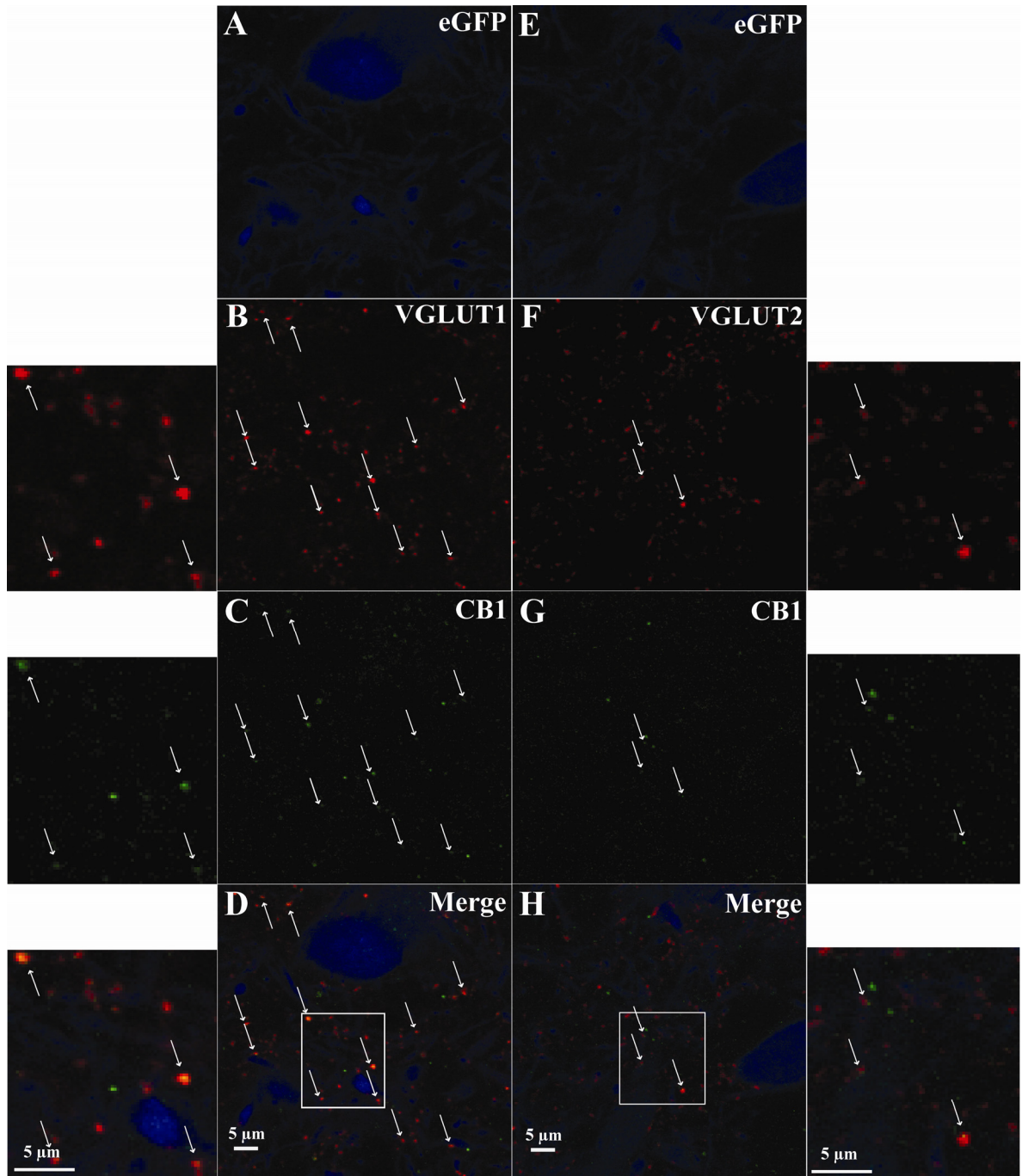


Figure 2: Localization of CB1 receptors on VGLUT1 and VGLUT2 positive axonal varicosities in the VTA. **A.** Endogenous eGFP expression (shown in blue) in a section of the VTA in a horizontal midbrain slice. **B.** VGLUT1 expression (red) in the same section.

C. CB1 receptor expression (green) in the same section. D. Merge of the three images showing colocalization of the CB1 receptor and VGLUT1 positive terminals in close proximity to DA neurons. E-H. Same as A-D, except that VGLUT2 labeling is shown in panels F and H.

The panels on the side show a higher magnification image of the signal identified by the white box in panels D and H. White arrows indicate VGLUT1 or VGLUT2 positive terminals expressing CB1 receptors.

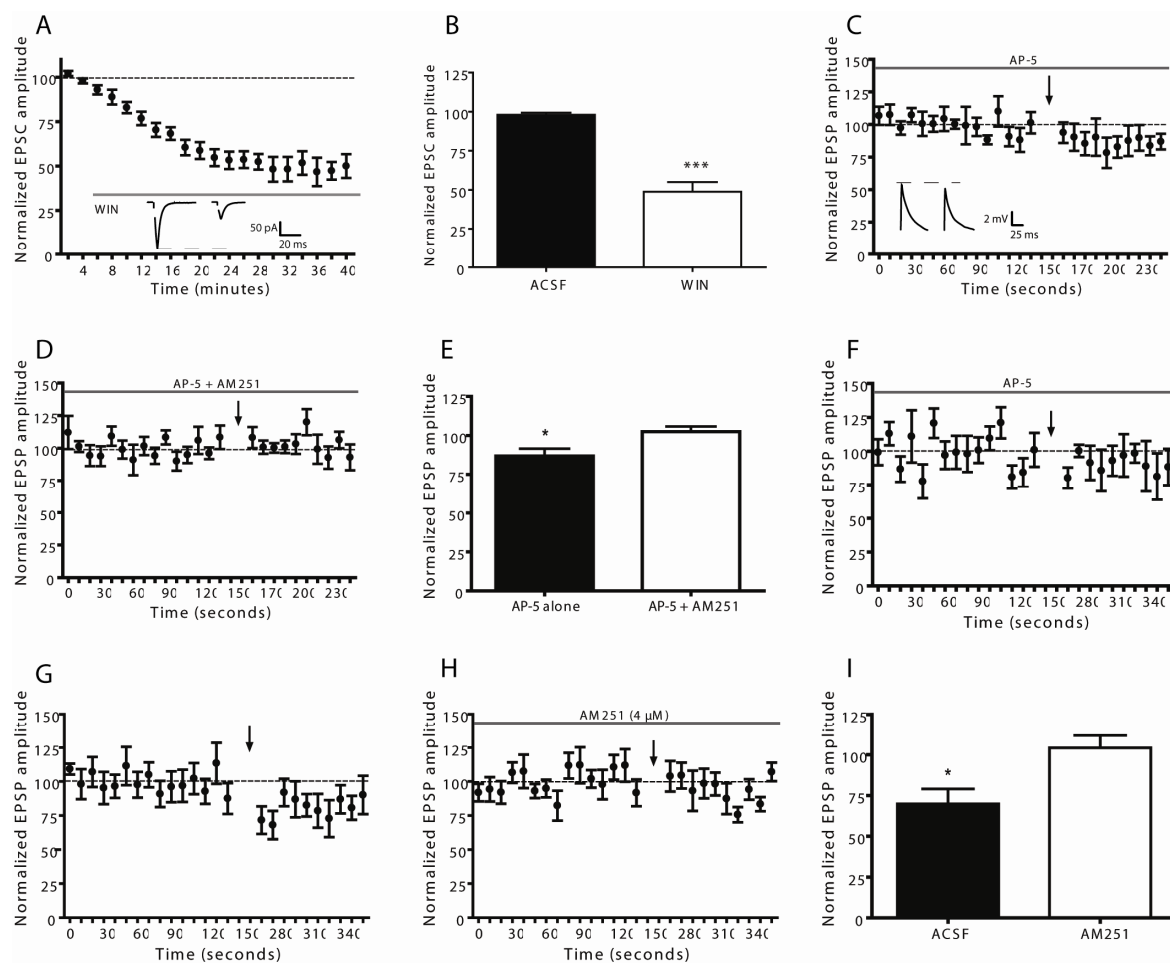


Figure 3: CB1 receptors are functional and activated by a pairing train of pre- and post-synaptic stimulation. **A.** Averaged time-course data of a voltage-clamp experiment measuring glutamate-mediated EPSCs in DA neurons. Application of the CB1 receptor agonist WIN55,212-2 mesylate (WIN; 1 μ M) elicited a large decrease in EPSC amplitude. Insets represent averaged example traces before and after application of WIN. **B.** Summary data of the experiments evaluating the effect of WIN on EPSC-amplitude, presented in comparison to the period prior to drug application. **C.** Averaged time-course data of the effects of a single pairing train used in LTP experiments on the amplitude of glutamatergic EPSPs in the presence of AP-5 (20 μ M). Arrows indicate the moment of application of the train. Insets represent averaged example traces before and after pairing stimulation. **D.** Averaged time-course data of the effects of the single pairing train on the amplitude of glutamatergic EPSPs in the presence of AP-5 (20 μ M) and AM251 (4 μ M). **E.** Summary data of the effects of the single pairing train on the amplitude of glutamatergic EPSPs. The average EPSP amplitude after the train without blockade of CB1 receptors differs significantly from the EPSP amplitude after the train when CB1 receptors are blocked with AM251 (4 μ M). **F.** Averaged time-course data of the effects of 20 pairing trains on the amplitude of glutamatergic EPSPs in the presence of AP-5 (20 μ M). **G.** Averaged time-course data of the effects of 20 trains without pairing with post-synaptic action potentials on the amplitude of glutamatergic EPSPs. **H.** Averaged time-course data of the effects of 20 trains without pairing with post-synaptic action potentials on the amplitude of glutamatergic EPSPs in the presence of AM251 (4 μ M). **I.** Summary data of the effects of 20 trains without pairing with post-synaptic action potentials on the amplitude of

glutamatergic EPSPs. The average EPSP amplitude of the first two EPSPs after the trains in the absence of CB1 blockade differs significantly from the EPSP amplitude of the first two EPSPs after the trains when CB1 receptors are blocked with AM251 (4 μ M).

Arrows indicate the moment of application of stimulation train(s).

* = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$.

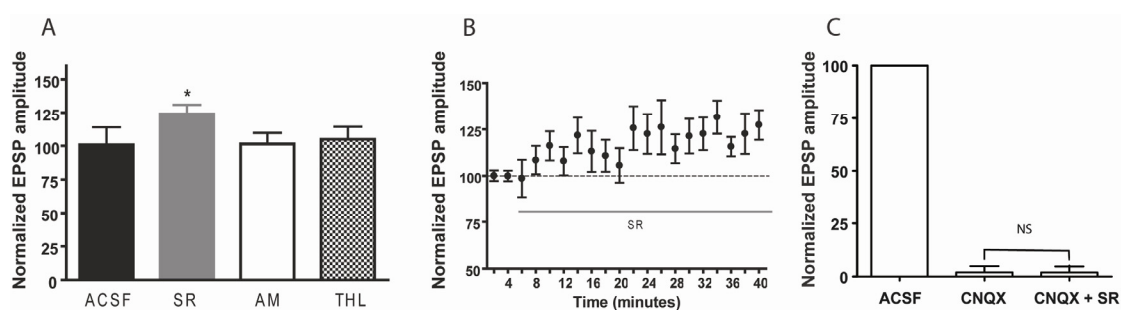


Figure 4: GABA_A receptor-mediated transmission, but not CB1 receptor-mediated transmission, tonically inhibits glutamatergic transmission onto VTA DA neurons. A.

Summary data representing average EPSP-amplitude in response to bath application of the GABA_A receptor antagonist SR95531 (SR95; 10 μ M), the CB1 receptor antagonist AM251 (AM251; 500 nM) or the 2-AG synthesis inhibitor tetrahydrolipstatin (THL; 2 μ M). While SR95531 caused an increase in EPSP-amplitude, neither AM251 nor THL caused a significant change. The bars represent the relative change in EPSP-amplitude normalized to the average of pre-application values. **B.** Averaged time-course data of the effect of SR95531 on EPSP-amplitude. **C.** Averaged normalized EPSP-amplitude after application of the AMPA-receptor antagonist CNQX (20 μ M) and after application of CNQX +

SR95531 (2 μ M). The EPSPs are thus largely AMPA receptor mediated, with no significant contamination by GABA_A mediated responses.

Error bars represent the SEM. NS= not significant, * = $p < 0.05$.

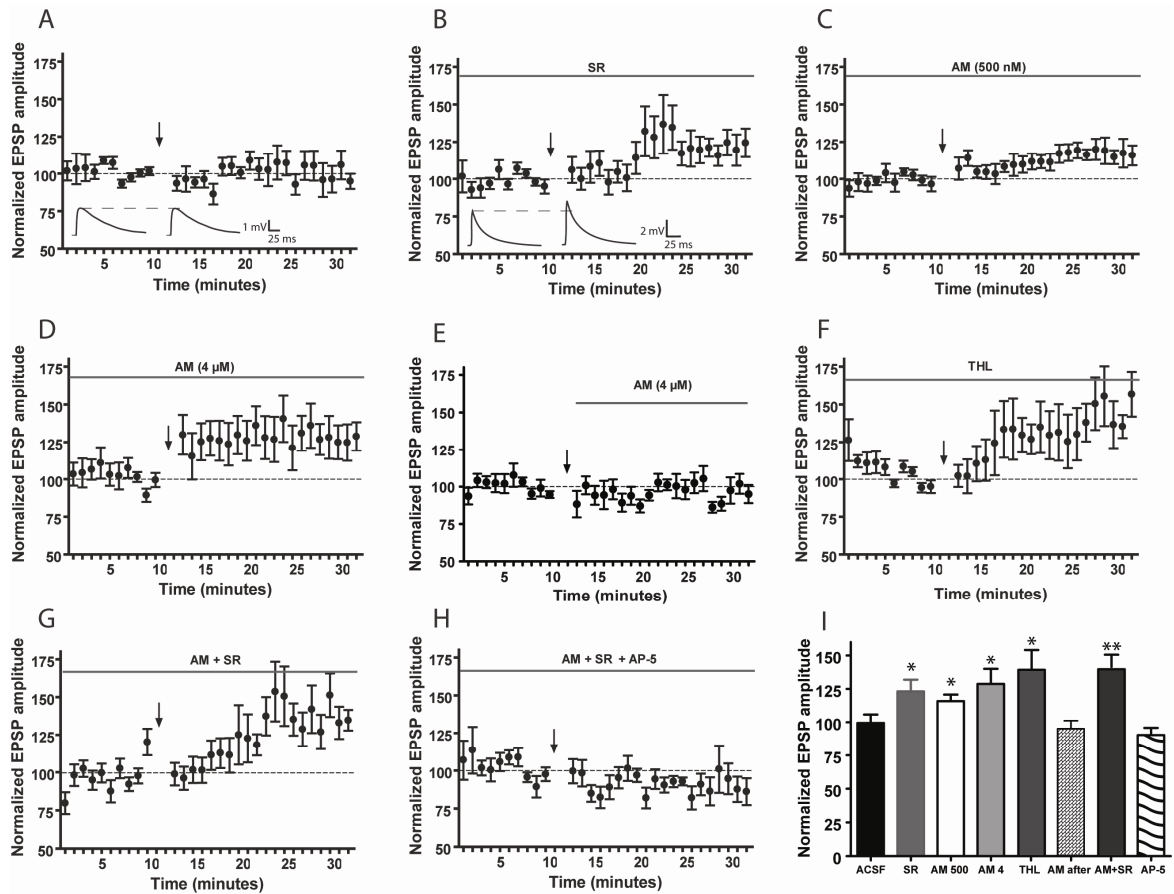


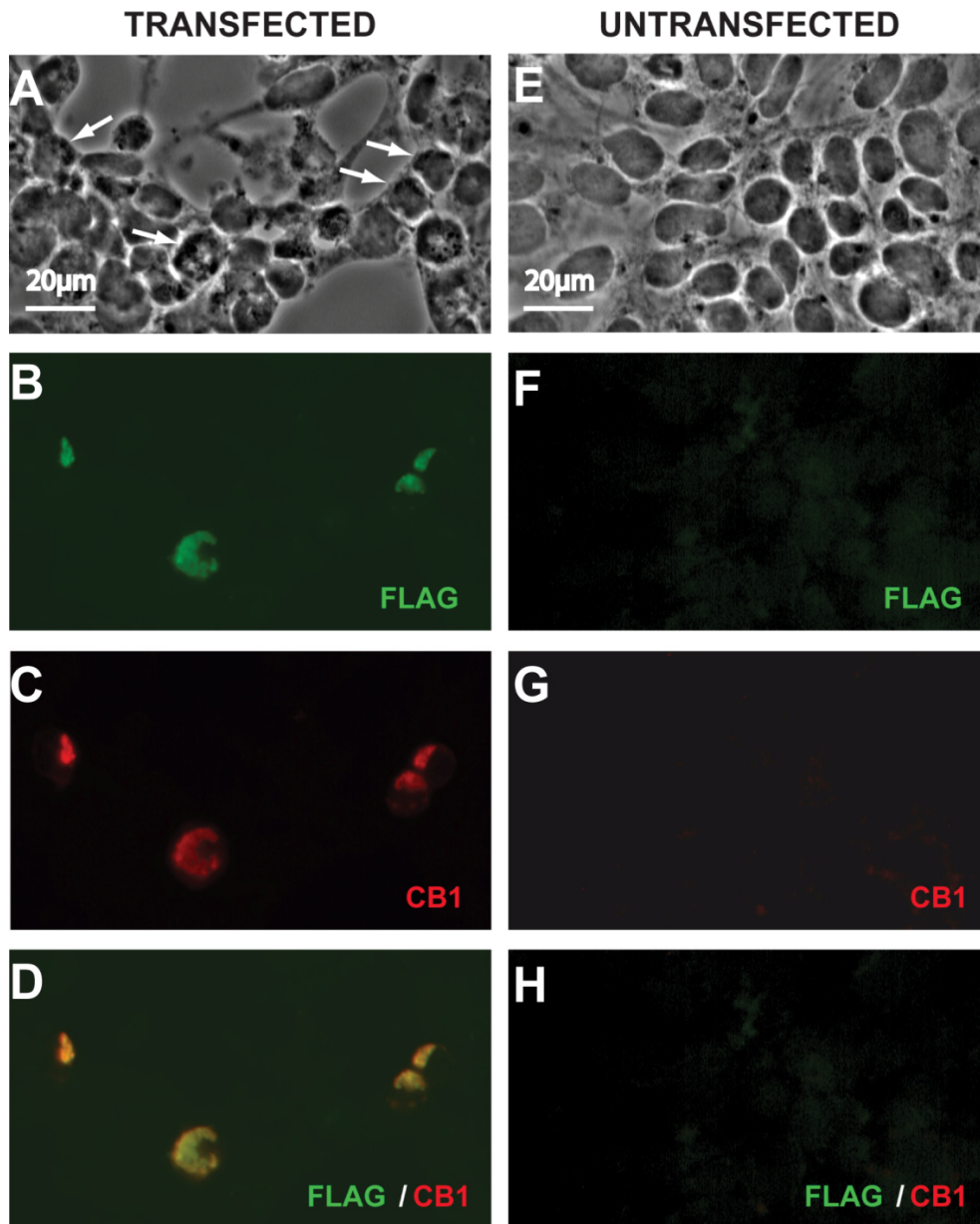
Figure 5: GABA_A receptor blockade, CB1 receptor blockade and inhibition of 2-AG synthesis allow for NMDA-dependent LTP induction. **A.** Averaged time-course data illustrating EPSP-amplitude prior to and after the spike time-dependent pairing stimulation (arrow). No significant LTP was induced in the presence of ACSF alone. Insets represent averaged example-traces before and after pairing stimulation. **B.** In the presence of

SR95531 (SR; 10 μ M), significant LTP was induced. Insets represent averaged example-traces before and after pairing stimulation. **C-D**. In the presence of AM251 (500 nM and 4 μ M respectively), significant LTP was induced. **E**. Blocking CB1 receptors with AM251 (4 μ M) after the LTP induction pairing trains had taken place failed to allow for significant LTP to occur. **F**. When THL (2 μ M) was added to the recording pipette solution, a significant LTP was induced. **G**. In the presence of both SR95531 and AM251, significant LTP was induced, but its amplitude was not larger than when the individual antagonists were used alone. **H**. The NMDA receptor antagonist AP5 (25 μ M) prevented the induction of LTP induced by spike time-pairing stimulation in the presence of both SR95531 and AM251. **I**. Summary data illustrating normalized changes in EPSP-amplitude relative to pre-pairing stimulation values.

Arrows indicate the moment of LTP induction. Error bars represent the SEM. * = $p < 0.05$;

** = $p < 0.01$.

TITLES AND LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary figure 1: Validation of the CB1 antibody using transfection of a Flag-tagged CB1 receptor in Human Embryonic Kidney (HEK) cells. A. Phase contrast image of transfected HEK cells. Arrows indicate labeled cells. **B.** Labeling of the same

cells with an anti-Flag antibody (green) identifies cells expressing the CB1 receptor. **C.** Labeling of the same cells with the CB1 antibody (red). **D.** Merge showing perfect colocalization of both signals, confirming the specificity of the antibody. **E.** Phase contrast image of untransfected cells. **F.** Labeling of untransfected cells with an anti-Flag antibody. **G.** Labeling of the same untransfected cells with the CB1 antibody. **H.** Merge showing an absence of both the Flag and the CB1 signal in untransfected cells, showing that the antibodies did not recognize other epitopes.

Article 2

Neurotensin inhibits glutamate-mediated synaptic inputs onto ventral tegmental area dopamine neurons through the release of the endocannabinoid 2-AG.

Christian Kortleven^{1,2,3}, Laura Charlotte Bruneau¹, Louis-Eric Trudeau^{1,3}

¹Département de pharmacologie, ²département de physiologie, ³Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Préparé pour soumission à: *Neuropharmacology*

ABSTRACT

Neurotensin (NT), a neuropeptide abundant in the ventral midbrain, is known to act as a key regulator of the mesolimbic dopamine (DA) system, originating in the ventral tegmental area (VTA). NT activates metabotropic receptors coupled to Gq heterotrimeric G proteins, a signaling pathway often triggering endocannabinoid (EC) production in the brain. Because ECs act as negative regulators of many glutamate synapses and have also been shown recently to gate LTP induction in the VTA, we examined the hypothesis that NT regulates glutamate-mediated synaptic inputs to VTA DA neurons. We performed whole cell patch clamp recordings in VTA DA neurons in TH-EGFP transgenic mouse brain slices and found that NT induces a long-lasting decrease of the EPSC-amplitude that was mediated by the type 1 NT receptor. An antagonist of the CB1 EC receptor blocked this decrease. This effect of NT was not dependent on intracellular calcium, but required G-protein activation and phospholipase C. Blockade of the CB1 receptor after the induction of EPSC depression reversed synaptic depression, an effect not mimicked by blocking NT receptors, thus suggesting the occurrence of prolonged EC production and release. The EC responsible for synaptic depression was identified as 2-arachidonoylglycerol, the same EC known to gate LTP induction in VTA DA neurons. However, blocking NT receptors during LTP induction did not facilitate LTP induction, suggesting that endogenously released NT is not a major source of EC production during LTP inducing stimulations.

Keywords: VTA, 2-arachidonoylglycerol, midbrain, mice, patch-clamp, synaptic

INTRODUCTION

The 13 amino-acid peptide neurotensin (NT) is abundant in the mammalian nervous system. It was first discovered and isolated from the bovine hypothalamus in 1973 (Carraway & Leeman, 1973). A large body of work has highlighted NT as a key regulator of the midbrain DA system, and notably of ventral tegmental area (VTA) DA neurons (Binder *et al*, 2001; Dana *et al*, 1989; Hökfelt *et al*, 1984a; Nemeroff *et al*, 1982; Quirion, 1983; Rostene *et al*, 1997). NT is recognized by at least three receptors, the most abundant being NTS1 and NTS2. NTS1, which has the highest affinity for NT, is a Gq-coupled receptor that is highly expressed by VTA DA neurons both in the somatodendritic and axonal compartments (a.o. Young & Kuhar, 1981), where it can act to alter DA neuron excitability and DA release. The possible implication of NT in DA-associated illnesses such as schizophrenia and drug addiction has received significant attention (For review, see: Binder *et al*, 2001; St-Gelais *et al*, 2006).

NT induces an increase in intracellular calcium in cultured midbrain DA neurons acting through the NTS1 receptor and a downstream pathway implicating phospholipase C and cationic channel activation, which leads to an increased firing rate in these neurons (St-Gelais *et al*, 2004). Considering that activation of G-protein coupled receptors such as the orexin (Haj-Dahmane & Shen, 2005), mGluR1 (Maejima *et al*, 2001) and cholecystokinin receptors (Foldy *et al*, 2007) can lead to endocannabinoid (EC) production and release (for review, see Gyombolai *et al* (2011)), it may be reasonably hypothesized that NT-mediated signaling cascades also lead to the synthesis and release of ECs by VTA DA neurons. This

hypothesis is reinforced by the recent demonstration that NT causes a decrease in evoked glutamate-mediated excitatory post-synaptic currents (EPSCs) in the striatum through EC release and retrograde activation of CB1 receptors (Yin *et al*, 2008).

Recently, we reported that ECs, in particular 2-arachidonoylglycerol, can gate the induction of long term potentiation (LTP) in DA neurons of the VTA (Kortleven *et al*, 2011). LTP in this area of the brain is otherwise known to occur after injection of cocaine (Ungless *et al*, 2001) and other drugs of abuse (Saal *et al*, 2003), and when inhibited in KO mice, causes alterations of drug-seeking behaviors (Engblom *et al*, 2008; Zweifel *et al*, 2008), although it seems that these drug-seeking behaviors are dependent on LTP in non-dopaminergic neurons of the VTA (Luo *et al*, 2010). Therefore, understanding the mechanisms of LTP in the VTA may prove to be critical to our understanding of drug addiction. Induction of LTP at glutamatergic synapses in VTA DA neurons *in vitro* has proven to be rather difficult. However, GABA_A and EC receptors have been identified recently as able to gate LTP of AMPA-mediated glutamatergic transmission in this structure (Kortleven *et al*, 2011; Liu *et al*, 2005; Luu & Malenka, 2008). Identification of the endogenous signals that lead to EC release by DA neurons and that may regulate LTP induction is required to fully understand the mechanisms of LTP induction at midbrain glutamatergic synapses, whether it is induced by physiological signals or by drugs of abuse. Here we examined the hypothesis that NT regulates EC release and that endogenously released NT acts as a negative regulator of LTP induced by a spike time dependent pairing protocol.

MATERIAL AND METHODS

Animals.

All experiments were approved by the animal ethics committee (CDEA) of the Université de Montréal. Animal discomfort and suffering was kept to an absolute minimum. Mice (P14-P21) of the TH-eGFP/21-31 line that express the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene under the control of the tyrosine hydroxylase (TH) promoter (Sawamoto *et al*, 2001) were used in electrophysiological experiments to select VTA DA neurons for recording (Jomphe *et al*, 2005).

Drugs.

SR95531 (2 μ M) and AM251 (4 and 10 μ M) were obtained from Ascent Scientific (Bristol, UK). Tetrahydrolipstatin (2 μ M; intra-pipette) and U-73122 (10 μ M; intra-pipette) were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Neurotensin 8-13 (50 nM), BAPTA (20mM; intra-pipette) and GDP- β S (1 mM; intra-pipette) were obtained from Sigma-Aldrich (St- Louis, MO, USA). Finally, SR48692 (500 nM) and SR142948A (500 nM) were supplied by Sanofi-Synthelabo (Paris, France).

Slice preparation.

Mice were anaesthetized with halothane and immediately killed by decapitation. The brain was rapidly removed and placed in ice-cold carboxygenated (95% O₂ and 5% CO₂) cutting-solution (glycerol-containing artificial cerebrospinal fluid (G-ACSF))

containing (in mM): Glycerol (250), KCl (3.5), MgCl₂ (1.3), CaCl₂ (2.0), NaHPO₄ (1.2), glucose (11), NaHCO₃ (26), pH 7.35. Solutions in which NaCl is replaced with glycerol have been proposed to increase slice quality when compared to sucrose-containing cutting solutions (Ye *et al*, 2006). Horizontal slices (200-220 μm) were cut in the same G-ACSF solution with a Leica VT1000S vibrating microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and placed in a slice-saver containing carboxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at room temperature (around 21-23°C). ACSF contained (in mM): NaCl (126), KCl (3.5), MgCl₂ (1.3), CaCl₂ (2), NaHPO₄ (1.2), glucose (11), NaHCO₃ (26), pH 7.35, 305 mOsm. Slices remained untouched in the slice-saver for at least one hour before being transferred to the recording chamber which was continuously perfused with carboxygenated ACSF (2 ml/min) heated to 30 ± 1 °C with a TC-324B in-line heating unit (Warner Instruments, Hamden, CT, USA).

Electrophysiology.

A concentric bipolar Pt/Ir stimulating electrode (FHC, Bodoïn, ME, USA) was placed in the rostral VTA and recordings were started after an equilibration period of 20 minutes. Recording electrodes (4-6 MΩ) were made from borosilicate capillaries (WPI, FL, USA) with a PP-830 micro-pipette puller (Narishige, Tokyo, Japan). Electrodes were filled with a solution containing (in mM): potassium methylsulfate (145), NaCl (10), EGTA (0.1), MgATP (2), GTP (Tris salt) (0.6), HEPES (10), phosphocreatine (10), pH 7.35, 300 mOsm.

Whole cell current- and voltage-clamp recordings were performed using a MultiClamp 700B amplifier and PClamp 10 acquisition software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Signals were filtered at 2 KHz, digitized at 20 KHz using a Digidata 1440A digitizer and analyzed with Clampex software (Molecular Devices). Drugs were bath-applied. The GABA_A receptor antagonist SR95531 (2 μ M) was added to the ACSF solution during all recordings, with the notable exception of LTP-induction recordings, as it is known that inclusion of GABA_A receptor antagonists facilitates the induction of LTP in the VTA (Kortleven *et al*, 2011; Liu *et al*, 2005; Luu & Malenka, 2008).

During voltage clamp recordings, extracellular stimulation was performed at 0.1 Hz for 25 minutes. Excitatory post-synaptic currents (EPSCs) were recorded from eGFP-expressing neurons that were voltage-clamped at -70 mV. NT was applied after a baseline period of 5 min and application was maintained for 10 min, followed by a 10 min washout period. When other drugs were used, they were present at least 5 min before the start of the recordings. The series resistance was compensated at 50% immediately before the start of the recordings.

In LTP experiments, neurons were current-clamped at roughly -70 mV using the multiclamp commander 700B in current clamp mode. A 10 min baseline period of stimulation-evoked EPSPs (0.1 Hz) was obtained before LTP-induction took place. The LTP induction protocol was a spike-time dependent pairing protocol initially described in Liu *et al* (2005), which was also used by others to demonstrate EC-gated LTP induction in VTA DA neurons (Kortleven *et al*, 2011). Briefly, extracellular stimulations (10 Hz) were followed 5 ms later by a 3 ms intracellular current injection of 2 nA to induce an action

potential in the recorded neuron, that was therefore paired with the evoked EPSP. Such a single pairing was performed 5 times per train at 10 Hz, for twenty trains, with each train separated by 5 s. After LTP induction, EPSPs were once again evoked at 0.1 Hz for 20 min to assess the effect of LTP induction on EPSP amplitude. Although this recording duration does not allow to reveal the full duration of LTP, we have shown previously that in the presence of CB1 receptor blockade, LTP is induced and detectable well within this period (Kortleven *et al*, 2011). The bridge balance (current-clamp) was monitored throughout all LTP recordings and neurons displaying a change of more than 30% in the bridge balance value were discarded.

Immunohistochemistry and imaging.

Mice of either 14 or 21 days old were anaesthetized with halothane and killed by decapitation. Their brains were removed immediately and fixed for at least 24h in 4% PFA. Sections (50 μ m) were then made using a vibratome and placed into phosphate buffered saline (PBS). These slices were incubated overnight with a rabbit anti-NT antibody (1:5000; Immunostar, Hudson, WI, USA) and a guinea pig type 1 vesicular glutamate transporter (VGLUT1) (1:5000) or a mouse type 2 vesicular glutamate transporter (VGLUT2) antibody (1:1000; both Millipore, Billerica, MA, USA). For each mouse, sections were selected in alternating fashion for VGLUT1 or VGLUT2 immunostaining, assuring a roughly equal number of sections for each VGLUT antibody. Slices were then incubated for 2 h with an Alexa Fluor 546 fluorescent anti-rabbit secondary antibody (1:500) to reveal the NT primary antibody, and an Alexa Fluor 647 anti-guinea pig or an

Alexa Fluor 647 anti-mouse secondary antibody (1:500) to visualize VGLUT1 and VGLUT2 primary antibodies, respectively. All fluorescent secondary antibodies were obtained from Molecular Probes through Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Confocal images of these slices were obtained with a laser scanning confocal microscope (Fluoview FV1000, Olympus) equipped with an Olympus 60X oil-immersion objective (N.A. 1.42). An argon laser (488 nm wavelength) was used for excitation of eGFP. Fluorescence was collected after passing through a 500-530 nm band-pass emission filter. The 543 nm wavelength of a helium-neon laser was used to reveal NT-staining, with fluorescence collection occurring through a 555-625 nm band-pass emission filter. The 633 nm wavelength of a helium-neon laser was used to reveal the VGLUT1 and -2 staining, with fluorescence collection through a 655-755 nm band-pass emission filter.

Colocalization analysis.

Two image stacks (5 images per stack, 5 μm step size) were obtained from the VTA for each hemisphere (1 rostral, 1 caudal), for a total of 4 stacks per section, whenever possible. A threshold was applied and 3 images per stack were analyzed. This analysis consisted of a particle analysis, where signal with a surface between 0.5-5 μm^2 was considered a presumed axon terminal. This was then used to count the number and percentage of terminals that showed colocalization of NT and VGLUT signals.

Statistical analysis.

The amplitude of recorded EPSCs and EPSPs was measured using Clampex software (Molecular Devices). In voltage clamp experiments, the 5 min baseline period was normalized to the average of the first two and a half min of this same period. In LTP recordings, the 10 min of the baseline period was normalized to the first 5 min of this same baseline period. This was done to control for any drift occurring during the baseline period. During voltage clamp experiments evaluating the effects of NT of EPSC amplitude, the effect of NT was quantified between min 10-17, the period showing the maximal decrease of EPSC amplitude in experiments in which NT was applied alone. This period was normalized and compared to the average of the baseline period. To quantify the induction of LTP in the LTP experiments, the last 10 min of the recordings were normalized and compared to the average of the baseline period. Two-tailed paired t-tests were performed, where appropriate, using Graphpad Prism software (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. Values are presented as average \pm SEM. All averages are expressed as percentages of baseline values.

RESULTS

NT is present in the VTA and colocalizes with VGLUT1 and VGLUT2.

Previous work has shown that NT in the VTA is present in axonal-like varicosities that are in close proximity to VTA DA neurons (Hökfelt *et al*, 1984a) and those are likely to be activated by extracellular stimulation typically used to trigger LTP. We first wished to evaluate if NT was preferentially associated with VGLUT1-positive glutamate terminals mostly originating from cortical structures, or with VGLUT2-positive terminals originating mostly from subcortical structures. NT-immunopositive axonal-like varicosities were found to be abundant in the VTA and NT-immunoreactive signal colocalized with both VGLUT1 and VGLUT2 in a subset of axon terminals (Fig. 1).

Colocalization analysis showed that NT, while equally distributed among VGLUT1 and VGLUT2 terminals at 14 days ($2.09 \pm 0.22\%$ vs $2.40 \pm 0.21\%$ respectively; $p=0.33$), is present significantly more frequently in VGLUT2-positive terminals than VGLUT1-positive terminals at 21 days ($7.61 \pm 0.90\%$ vs $2.67 \pm 0.32\%$ respectively; $p<0.0001$). The appearance of this relative segregation was associated with a significant increase in NT expression in VGLUT2 immunoreactive terminals with age ($2.40 \pm 0.21\%$ vs $7.61 \pm 0.90\%$; $p<0.0001$), suggesting a continued development of NT expression in VGLUT2, but not VGLUT1 positive terminals in juvenile mice.

NT reduces EPSC amplitude through the NTS1 receptor.

Prior to patch-clamp recording, DA neurons were identified by their expression of eGFP. We have previously found that in VTA slices of these TH-eGFP transgenic mice, 87% of eGFP positive neurons can be confirmed to be TH positive after post-recording immunohistochemistry (Kortleven *et al*, 2011). Bath application of NT (50 nM) induced a slowly-developing, long-lasting reduction in EPSC amplitude ($73.64 \pm 2.90\%$ of pre-application values; N=17; $p < 0.00001$; Fig. 2A), which did not show a significant recovery within the following 10 min washout period. This decrease in EPSC amplitude was not the result of pre- or postsynaptic rundown, as confirmed by control experiments performed without NT ($103.37 \pm 7.42\%$; N=9; $p = 0.59$; Fig. 2B). In parallel with the decrease in EPSC amplitude, NT caused a significant increase in membrane current fluctuation, revealed as an increase in current variance over time (Fig. S1A), which was likely due to the opening of non-selective cationic channels in response to NT (Jiang *et al*, 1994). No such change in current variance was observed in control experiments of the same duration performed without NT (Fig. S1B).

The NT-induced decrease in EPSC amplitude was blocked by pre-application of the broad spectrum NT receptor antagonist SR142948A (500 nM) ($96.23 \pm 2.25\%$; N=7; $p = 0.69$; Fig. 2C), which also blocked the increase in membrane variance (Fig. S1C). The NTS1-selective antagonist SR48692 (500 nM) also blocked NT-induced EPSC depression ($95.00 \pm 7.82\%$; N=7; $p = 0.53$; Fig. 2D), suggesting that the NTS1 receptor is mainly responsible for this effect of NT. However, SR48692 did not block NT-induced membrane variance elevation (Fig. S1D), suggesting that the increase in membrane variance is

independent from the mechanism leading to synaptic depression, and probably mediated by NTS2 instead of NTS1.

NT-induced EPSC depression is mediated by 2-arachidonoylglycerol through a calcium-independent pathway.

Because NT has been shown to induce EC release in the striatum (Yin *et al*, 2008), we sought to verify the possibility that this occurs in the VTA as well, leading to CB1 receptor activation on glutamate terminals. In the presence of the CB1 receptor antagonist AM251 (4 μ M), NT failed to induce a significant decrease of EPSC amplitude ($96.83 \pm 6.69\%$; N=9; $p=0.93$; Fig. 3A). This strongly suggests that ECs are involved in the synaptic depression induced by NT. The elevation in membrane current variance induced by NT was unaffected by AM251 (Fig. S1E).

Since NT has been previously shown to cause an increase of intracellular calcium in cultured VTA DA neurons (St-Gelais *et al*, 2004), we hypothesized that this increase in calcium in response to NT is required to trigger EC production and release. We tested this hypothesis by including BAPTA (20 mM) in the recording pipette. In the presence of BAPTA, NT still induced a significant decrease of EPSC amplitude ($80.53 \pm 7.00\%$; N=12; $p=0.012$; Fig. 3B), which was not significantly different compared to the effect of NT alone ($p=0.32$). This result suggests that intracellular calcium elevation is not required for EC production and synaptic depression induced by NT. Surprisingly, in neurons loaded with BAPTA, NT-induced membrane current variance was much larger compared to NT alone ($p=0.0002$; Fig. S1F), thus suggesting that NT-induced cationic channel activation is

actually under negative control by intracellular calcium. This result also otherwise provides a positive control for effectiveness of cell loading with BAPTA.

It has previously been shown that EC release induced by orexin A in the dorsal raphe nucleus is not blocked by loading neurons with BAPTA. Instead, it was found to be mediated through a presumably direct G-protein-phospholipase C (PLC) interaction (Haj-Dahmane & Shen, 2005). To evaluate whether a similar mechanism is implicated in the VTA, we added the non-hydrolysable GDP analog GDP- β S to the pipette-solution and found that it effectively blocked NT-induced EPSC depression ($95.66 \pm 6.50\%$; N=5; $p=0.77$; Fig. 3C). NT-induced membrane current variance elevation was also eliminated (Fig. S1G), compatible with the idea that another G-protein coupled receptor, presumably NTS2, is responsible for this second effect of NT. The PLC inhibitor U-73122 (10 μ M; intra-pipette) similarly blocked the effects of NT on EPSC amplitude ($99.76 \pm 8.46\%$; N=6; $p=0.97$; Fig. 3D) and membrane current variance (Fig. S1H). Finally, in an effort to identify the specific EC involved, we used tetrahydrolipstatin (THL, 2 μ M, intra-pipette), an inhibitor of the enzyme diacylglycerol-lipase that is responsible for the production of 2-arachidonoylglycerol (2-AG). THL blocked NT-mediated EPSC depression ($93.45 \pm 6.46\%$; N=5; $p=0.35$; Fig. 3E) but not NT-mediated increase in membrane current variance (Fig. S1I). This result suggests that the predominant EC involved in NT-mediated CB1 receptor activation and EPSC depression is 2-AG.

A summary of all pharmacological experiments is presented in Fig. 3F.

Evidence for protracted EC release induced by NT.

The synaptic depression caused by NT is long-lasting, with little recovery occurring during the 10 min washout period (Fig. 1A). This could be the result of a long-term depression-like phenomenon. Alternatively, it could result from protracted EC production and release in response to NT. To distinguish between these two hypotheses, we perfused the CB1 receptor antagonist AM251 (10 μ M) immediately after the end of the application of NT, once synaptic depression was at its peak ($74.34 \pm 3.77\%$; N=7; $p=0.0022$). Under such conditions, full recovery of EPSC amplitude was observed in the following 10 min period ($99.33 \pm 8.15\%$; N=7; $p=0.89$; compared to baseline; Fig. 4A). This was significantly different when compared to the values of the wash-out period during the experiments where NT was applied alone ($p=0.019$).

Protracted EC production could in principle occur because of lingering NT due to poor washout. To test this possibility, we applied the broad-spectrum NT receptor antagonist SR142948A (500 nM) immediately after the end of the 10 min NT application that once again caused a significant decrease in EPSC amplitude ($77.27 \pm 4.54\%$; N=4; $p=0.023$). Blockade of NT receptors during the NT washout period failed to promote recovery of EPSC amplitude ($69.5 \pm 5.6\%$; N=4; $p=0.022$ compared to baseline; Fig. 4B), compatible with the absence of residual NT.

Lack of evidence for NT-mediated EC release during an LTP-induction protocol.

It has recently been reported that while spike time-dependent pairing fails to induce LTP in VTA DA neurons under baseline conditions, a significant LTP of glutamate inputs

to DA neurons occurs after blockade of CB1 receptors or of 2-AG synthesis (Kortleven *et al*, 2011). Combined with the knowledge that NT is present in some of the glutamatergic fibers that are stimulated during LTP induction, we hypothesized that part of the negative gating of LTP induction by ECs could result from NT release and the associated 2-AG production. To test this hypothesis, we evaluated if similarly to CB1 receptor blockade, a broad-spectrum NT receptor antagonist would unmask LTP induction. We found that in the presence of SR142948A (500 nM), a treatment that is otherwise effective in blocking NT-induced EC release (Fig. 2C), no LTP could be induced by the spike time-dependent pairing protocol ($97.77 \pm 8.78\%$ of baseline values; N=5; p=0.92; Fig. 5).

DISCUSSION

We have found that exogenous NT induced a significant reduction of evoked glutamate-mediated EPSC amplitude in VTA DA neurons, an effect which required ECs and specifically 2-AG. We conclude that NT acts through the NTS1 receptor to release 2-AG through a calcium-independent mechanism that requires G-protein mediated activation of PLC and subsequent DAG-lipase activity. These results suggest that NT release in the VTA has the potential to lead to EC release and local synaptic depression. However, our finding that a NT receptor antagonist does not unmask LTP induction in VTA DA neurons, unlike direct CB1 receptor blockade, suggests that the spike time-dependent protocol often used to induce LTP in the VTA triggers EC release through a mechanism that is independent from NT.

An abundant literature supports the existence of a tight regulatory interaction between the central NT and DA systems (for review, see: Binder *et al*, 2001). Apart from being present in DA neurons themselves, NT has been found to be present in punctate structures that are presumed to be afferent inputs to midbrain DA neurons (Hökfelt *et al*, 1984a; Uhl *et al*, 1979). The bulk of NT-positive fibers in the VTA appear to come from the lateral preoptic rostral lateral hypothalamic continuum and the medial preoptic area (Geisler & Zahm, 2006). With a large proportion of VGLUT2-positive glutamatergic fibers that innervate the VTA also coming from similar regions (Geisler *et al*, 2007), it is therefore not unreasonable to hypothesize that a subset of such glutamatergic terminals co-

release NT and glutamate. In the present study, we found that NT colocalized with VGLUT1 and -2 in the VTA in a small subset of terminals. In 14 day old mice, this relative expression of NT was similar in both VGLUT1- and VGLUT2-positive terminals. However, at 21 days, the proportion of VGLUT2-positive terminals co-expressing NT had increased significantly, whereas the proportion of VGLUT1-positive terminals co-expressing NT remained the same. Interestingly, the increase in NT expression found here concords with an increase of NTS1 expression during development, which reaches a plateau at p21 (Lepee-Lorgeoux *et al*, 1999). Together these findings suggest the possibility that activation of glutamatergic inputs to VTA DA neurons may promote concurrent release of NT, an effect that is likely to be of increasing significance with age. Furthermore, repetitive stimulation of glutamatergic fibers during protocols used to induce LTP is likely to be a condition favoring NT co-release.

In the present study, we report that NT causes a long-lasting depression of glutamate-mediated synapses onto VTA DA neurons. Our findings stand in relative contrast to several studies that have found that NT can increase glutamatergic transmission in the striatum (Ferraro *et al*, 1998; Ferraro *et al*, 1995) and cortex (Ferraro *et al*, 2000). However, it is important to note that in these earlier studies, microdialysis was used to measure global extracellular glutamate levels, a technique that cannot provide a direct evaluation of glutamate release at specific synapses. More recently, it was shown that bath-application of NT can induce an EC-mediated decrease of EPSC amplitude in the dorsolateral striatum (Yin *et al*, 2008). This decrease was dependent on a rise in intracellular calcium, a stimulus well-known to cause the production of ECs (Chevalleyre *et al*, 2006; Piomelli, 2003).

We found that bath application of NT causes a decrease of evoked EPSCs in VTA DA neurons through a mechanism implicating the NTS1 receptor, 2-AG synthesis and CB1 receptor activation. However, we found this mechanism to be calcium-independent, a relative surprise considering that NT is known to cause an increase in intracellular calcium in DA neurons (St-Gelais *et al*, 2004). The signal leading to 2-AG production is unlikely to have been a rise in intracellular calcium in other, surrounding neurons, as selectively blocking G-protein signaling, PLC activation and 2-AG synthesis in the recorded neuron fully blocked the ability of NT to decrease evoked glutamate-mediated EPSCs. The Gq-coupled NTS1 receptor could activate other calcium-independent signaling pathways subsequent to stimulation of PLC. In addition, it is known that ECs can also be released via activation of G-protein coupled receptors, without elevation in intracellular calcium (for review, see Gyombolai *et al* (2011)). In fact, in 5-HT neurons of the dorsal raphe, the neuropeptide orexin-B can induce calcium-independent EC release that inhibits glutamatergic transmission (Haj-Dahmane & Shen, 2005). In this report, it was found that orexin-B acted by direct activation of PLC and diacylglycerol (DAG)-lipase. In the present study, we found that a very similar mechanism occurs in VTA DA neurons in response to NT, as shown by the block of NT-induced EC release by the G-protein inhibitor GDP- β S and the PLC inhibitor U-73122. The experiments with the DAG-lipase inhibitor THL furthermore suggest that 2-AG is the main EC mediating the NT-induced synaptic depression in the VTA.

In addition to inducing EPSC depression, we found that NT also caused a distinct increase in membrane current variance. This finding is compatible with previous reports

showing that NT receptors also activate non-selective cationic channels with a large permeability to sodium (Jiang *et al*, 1994). We found that this elevation of membrane current variance was still present in the presence of a NTS1 receptor antagonist, but not in the presence of a broad spectrum NT receptor antagonist known to block both NTS1 and NTS2 (Betancur *et al*, 1998). This suggests that cationic channel activation induced by NT is mediated by the NTS2 receptor, the second G-protein-coupled NT receptor. Our finding that the increase in membrane variance is absent when G-proteins are inhibited also argues in favor of the implication of NTS2, since the type 3 NT receptor is not part of the G-protein-coupled receptor family (Mazella *et al*, 1998). Our results are thus compatible with the presence of NTS2 on DA neurons, as suggested by immunolabeling studies showing the presence of this receptor in the VTA (Sarret *et al*, 2003). Surprisingly, chelation of intracellular calcium caused a large increase in NT-induced membrane current variance. One interpretation of this observation is that under basal conditions, calcium actually acts to inhibit the cationic channels activated by NT. However, this conclusion is not readily compatible with the previous finding that activation of cationic channels by NT in acutely-dissociated substantia nigra compacta DA neurons is blocked by intracellular BAPTA (Wu *et al*, 1995). An alternative interpretation is that in the presence of BAPTA, the activation of other calcium-dependent channels, such as calcium-activated potassium channels, was blocked, thus increasing cationic channel currents secondarily to an increase in membrane resistance. Further experiments will be required to examine this possibility.

An intriguing result from the present study is that NT appears to trigger protracted EC release, leading to sustained EPSC depression. This conclusion is based on our

observation that EPSC depression did not recover significantly during the 10 min NT washout period, even in the presence of a NT receptor antagonist, while post-NT perfusion with a CB1 receptor antagonist readily reversed the depression. This finding can be contrasted with previous work showing that EC-mediated long term depression (LTD) in the brain does not seem to require continuous CB1 receptor activation (for review, see Chevaleyre *et al*, 2006). In the VTA, such an EC-mediated LTD of GABAergic transmission occurs after cocaine application (Pan *et al*, 2008a, b). Our findings are nonetheless compatible with the results of Yin *et al* (2008) who showed that in the striatum, the CB1 antagonist AM251 is able to reverse NT-induced EPSC depression if applied directly after NT. Further studies will be required to extend our findings and determine exactly how long NT-induced EPSC depression lasts in VTA DA neurons and whether it represents a LTD-like phenomenon.

Several classes of drugs of abuse cause an increase of the AMPA to NMDA synaptic current ratio in VTA DA neurons (Saal *et al*, 2003; Ungless *et al*, 2001). This ratio is widely believed to reflect the induction of an LTP-like phenomenon *in vivo* in response to drugs of abuse. Such an increase in AMPA/NMDA ratio indeed occludes subsequent spike-time pairing dependent LTP in VTA DA neurons (Argilli *et al*, 2008). We have recently shown that 2-AG and CB1 receptor activation can negatively gate LTP induced in VTA DA neurons by spike-time dependent pairing (Kortleven *et al*, 2011). With the demonstration that (1) NT is expressed in VGLUT-positive terminals in the VTA and could therefore be released during stimulation of such fibers and (2) NT induces a distinct EC release, we

hypothesized that conditions that lead to significant release of NT in the VTA could negatively regulate glutamate inputs to DA neurons and LTP induction. However, in the present study, we found no evidence of an implication of endogenously-activated NT receptors in regulating LTP induction with the spike-time pairing protocol used. Further studies will be required to examine whether direct activation of the main NT-containing axonal fibers in the VTA, perhaps using optogenetics, would reveal plasticity of VTA glutamate inputs by endogenous NT.

Bibliography

Argilli E., Sibley D. R., Malenka R. C., England P. M., Bonci A. (2008) Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **28**(37): 9092-9100.

Betancur C., Canton M., Burgos A., Labeeuw B., Gully D., Rostene W., Pelaprat D. (1998) Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [3H]SR 142948A, in the rat brain. *European journal of pharmacology* **343**(1): 67-77.

Binder E. B., Kinkead B., Owens M. J., Nemeroff C. B. (2001) Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacological reviews* **53**(4): 453-486.

Carraway R., Leeman S. E. (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *The Journal of biological chemistry* **248**(19): 6854-6861.

Chevalere V., Takahashi K. A., Castillo P. E. (2006) Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*.

Dana C., Vial M., Leonard K., Beauregard A., Kitabgi P., Vincent J. P., Rostene W., Beaudet A. (1989) Electron microscopic localization of neurotensin binding sites in the midbrain tegmentum of the rat. I. Ventral tegmental area and the interfascicular nucleus. *J Neurosci* **9**(7): 2247-2257.

Engblom D., Bilbao A., Sanchis-Segura C., Dahan L., Perreau-Lenz S., Balland B., Parkitna J. R., Lujan R., Halbout B., Mameli M., Parlato R., Sprengel R., Luscher C., Schutz G., Spanagel R. (2008) Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron* **59**(3): 497-508.

Ferraro L., Antonelli T., O'Connor W. T., Fuxe K., Soubrie P., Tanganelli S. (1998) The striatal neurotensin receptor modulates striatal and pallidal glutamate and GABA release: functional evidence for a pallidal glutamate-GABA interaction via the pallidal-subthalamic nucleus loop. *J Neurosci* **18**(17): 6977-6989.

Ferraro L., Tanganelli S., O'Connor W. T., Bianchi C., Ungerstedt U., Fuxe K. (1995) Neurotensin increases endogenous glutamate release in the neostriatum of the awake rat. *Synapse* **20**(4): 362-364.

Ferraro L., Tomasini M. C., Siniscalchi A., Fuxe K., Tanganelli S., Antonelli T. (2000) Neurotensin increases endogenous glutamate release in rat cortical slices. *Life Sci* **66**(10): 927-936.

Foldy C., Lee S. Y., Szabadics J., Neu A., Soltesz I. (2007) Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystinin. *Nat Neurosci* **10**(9): 1128-1130.

Geisler S., Derst C., Veh R. W., Zahm D. S. (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* **27**(21): 5730-5743.

Geisler S., Zahm D. S. (2006) Neurotensin afferents of the ventral tegmental area in the rat: [1] re-examination of their origins and [2] responses to acute psychostimulant and antipsychotic drug administration. *Eur J Neurosci* **24**(1): 116-134.

Gyombolai P., Pap D., Turu G., Catt K. J., Bagdy G., Hunyady L. (2011) Regulation of endocannabinoid release by G proteins: A paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Molecular and cellular endocrinology*.

Haj-Dahmane S., Shen R. Y. (2005) The wake-promoting peptide orexin-B inhibits glutamatergic transmission to dorsal raphe nucleus serotonin neurons through retrograde endocannabinoid signaling. *J Neurosci* **25**(4): 896-905.

Hökfelt T., Everitt B. J., Theodorsson-Norheim E., Goldstein M. (1984) Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *The Journal of comparative neurology* **222**(4): 543-559.

Jiang Z. G., Pessia M., North R. A. (1994) Neurotensin excitation of rat ventral tegmental neurones. *J Physiol* **474**(1): 119-129.

Jomphe C., Bourque M. J., Fortin G. D., St-Gelais F., Okano H., Kobayashi K., Trudeau L. E. (2005) Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J Neurosci Methods* **146**(1): 1-12.

Kortleven C., Fasano C., Thibault D., Lacaille J. C., Trudeau L. E. (2011) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits long-term potentiation of glutamatergic synapses onto ventral tegmental area dopamine neurons in mice. *Eur J Neurosci* **33**(10): 1751-1760.

Lepee-Lorgeoux I., Betancur C., Rostene W., Pelaprat D. (1999) Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain research Developmental brain research* **113**(1-2): 115-131.

Liu Q. S., Pu L., Poo M. M. (2005) Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* **437**(7061): 1027-1031.

Luo Y., Good C. H., Diaz-Ruiz O., Zhang Y., Hoffman A. F., Shan L., Kuang S. Y., Malik N., Chefer V. I., Tomac A. C., Lupica C. R., Backman C. M. (2010) NMDA receptors on non-dopaminergic neurons in the VTA support cocaine sensitization. *PLoS one* **5**(8): e12141.

Luu P., Malenka R. C. (2008) Spike timing-dependent long-term potentiation in ventral tegmental area dopamine cells requires PKC. *J Neurophysiol* **100**(1): 533-538.

Maejima T., Hashimoto K., Yoshida T., Aiba A., Kano M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* **31**(3): 463-475.

Mazella J., Zsuzsger N., Navarro V., Chabry J., Kaghad M., Caput D., Ferrara P., Vita N., Gully D., Maffrand J. P., Vincent J. P. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* **273**(41): 26273-26276.

Nemeroff C. B., Hernandez D. E., Luttinger D., Kalivas P. W., Prange A. J., Jr. (1982) Interactions of neurotensin with brain dopamine systems. *Ann N Y Acad Sci* **400**: 330-344.

Pan B., Hillard C. J., Liu Q. S. (2008a) D2 dopamine receptor activation facilitates endocannabinoid-mediated long-term synaptic depression of GABAergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons via cAMP-protein kinase A signaling. *J Neurosci* **28**(52): 14018-14030.

Pan B., Hillard C. J., Liu Q. S. (2008b) Endocannabinoid signaling mediates cocaine-induced inhibitory synaptic plasticity in midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* **28**(6): 1385-1397.

Piomelli D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews Neuroscience* **4**(11): 873-884.

Quirion R. (1983) Interactions between neurotensin and dopamine in the brain: an overview. *Peptides* **4**(5): 609-615.

Rostene W., Azzi M., Boudin H., Lepee I., Souaze F., Mendez-Ubach M., Betancur C., Gully D. (1997) Use of nonpeptide antagonists to explore the physiological roles of neurotensin. Focus on brain neurotensin/dopamine interactions. *Ann N Y Acad Sci* **814**: 125-141.

Saal D., Dong Y., Bonci A., Malenka R. C. (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* **37**(4): 577-582.

Sarret P., Perron A., Stroh T., Beaudet A. (2003) Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* **461**(4): 520-538.

Sawamoto K., Nakao N., Kobayashi K., Matsushita N., Takahashi H., Kakishita K., Yamamoto A., Yoshizaki T., Terashima T., Murakami F., Itakura T., Okano H. (2001) Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6423-6428.

St-Gelais F., Jomphe C., Trudeau L. E. (2006) The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* **31**(4): 229-245.

St-Gelais F., Legault M., Bourque M. J., Rompre P. P., Trudeau L. E. (2004) Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* **24**(10): 2566-2574.

Uhl G. R., Goodman R. R., Snyder S. H. (1979) Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res* **167**(1): 77-91.

Ungless M. A., Whistler J. L., Malenka R. C., Bonci A. (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* **411**(6837): 583-587.

Wu T., Li A., Wang H. L. (1995) Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res* **683**(2): 242-250.

Ye J. H., Zhang J., Xiao C., Kong J. Q. (2006) Patch-clamp studies in the CNS illustrate a simple new method for obtaining viable neurons in rat brain slices: glycerol replacement of NaCl protects CNS neurons. *J Neurosci Methods* **158**(2): 251-259.

Yin H. H., Adermark L., Lovinger D. M. (2008) Neurotensin reduces glutamatergic transmission in the dorsolateral striatum via retrograde endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* **54**(1): 79-86.

Young W. S., 3rd, Kuhar M. J. (1981) Neurotensin receptor localization by light microscopic autoradiography in rat brain. *Brain Res* **206**(2): 273-285.

Zweifel L. S., Argilli E., Bonci A., Palmiter R. D. (2008) Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron* **59**(3): 486-496.

6. Titles and legends to figures

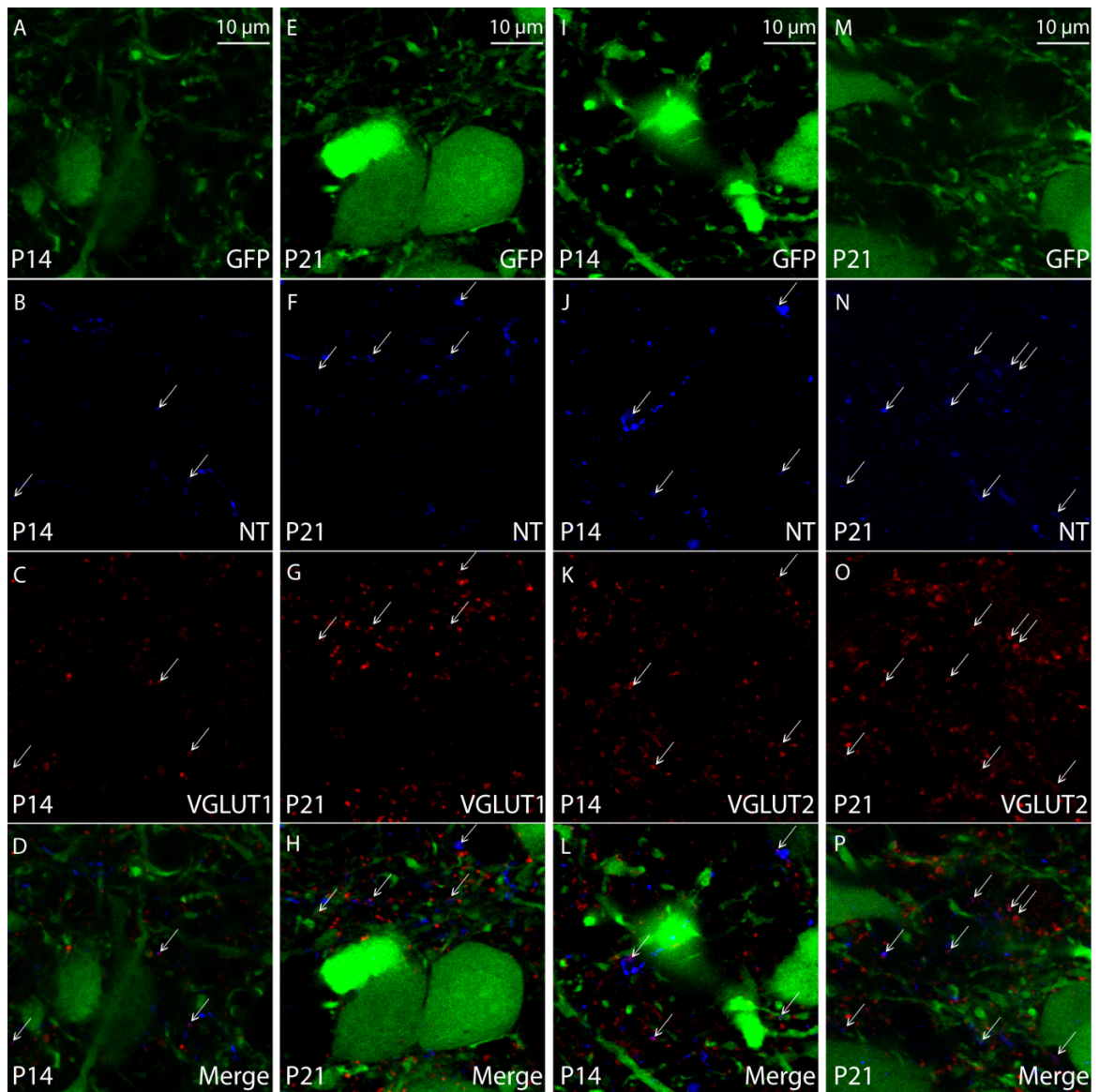


Figure 1: A subset of glutamatergic terminals in the VTA expressing VGLUT1 and VGLUT2 contain neurotensin. A. Endogenous GFP signal in presumed DAergic neurons

in thin sections of the VTA of 14 days old TH-eGFP mice. **B.** NT expression in the same section. **C.** VGLUT1 expression in the same section. **D.** Merge of the three images showing the presence of NT in VGLUT1 positive terminals of the VTA. **E-H.** Same as A-D, except that the sections are prepared from 21 days old TH-eGFP mice. **I-L.** Same as A-D, except that VGLUT2 is shown in panels K and L. **M-P.** Same as I-L, except that the sections are prepared from 21 days old TH-eGFP mice. White arrows indicate VGLUT1 or VGLUT2-positive terminals that express NT.

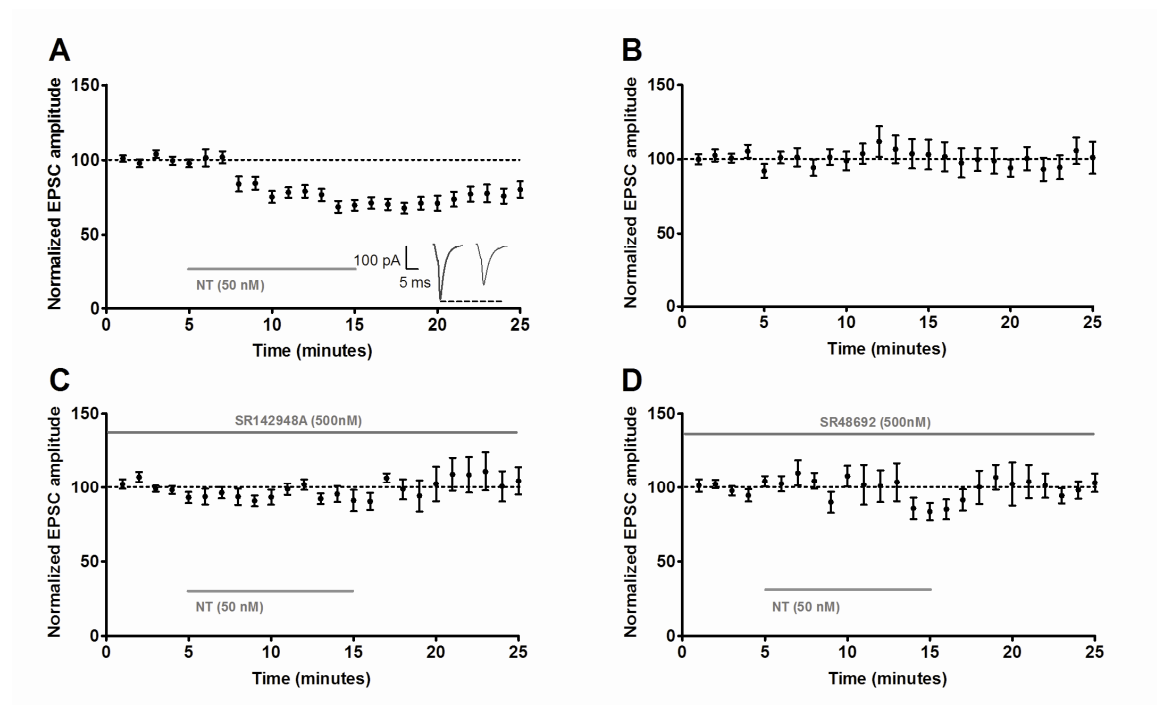


Figure 2: Neurotensin induces a prolonged decrease in the amplitude of evoked excitatory post-synaptic currents in dopamine neurons of the VTA. A. Bath application of NT (50 nM) reduces the amplitude of evoked EPSCs in DA neurons. This effect lingers during wash-out of NT. **B.** The effect of NT on EPSC amplitude is unlikely to be due to a

rundown of the EPSCs during the recordings, as no significant decrease of this amplitude occurs when no NT was applied. **C.** When in the presence of the broad spectrum NT receptor antagonist SR142948A (500 nM), NT failed to induce a significant decrease of EPSC amplitude. **D.** When in the presence of the NT1 receptor antagonist SR48692 (500 nM), NT failed to induce a significant decrease of the EPSC amplitude. Insets in A show averaged example traces of evoked EPSCs before and after NT application.

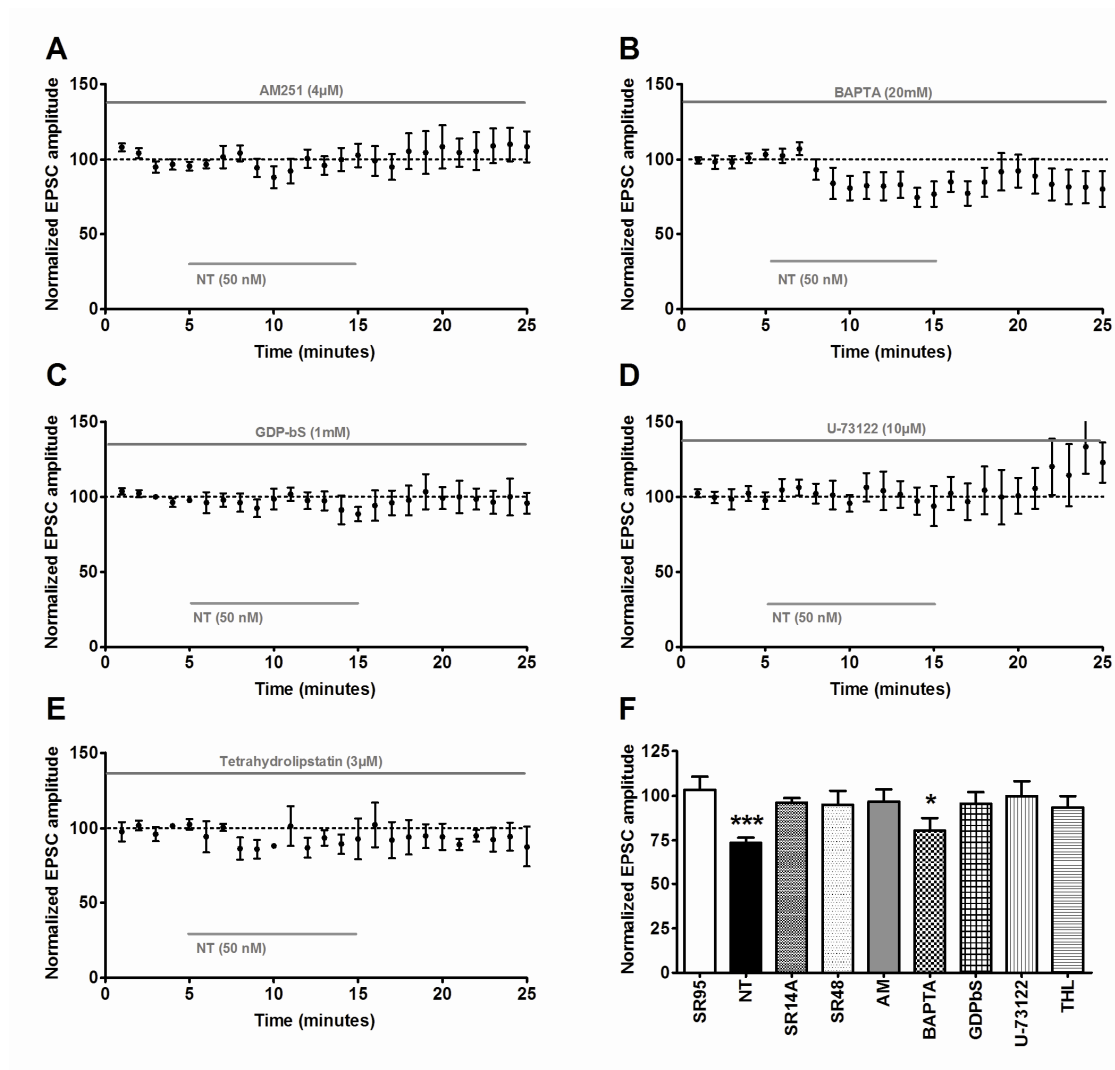


Figure 3: Neurotensin decreases EPSC amplitude through CB1 activation by 2-arachidonoylglycerol, through a calcium-independent G-protein/Phospholipase C/diacylglycerol-lipase interaction. **A.** When in the presence of the CB1 receptor antagonist AM251 (4 μ M), NT (50 nM) failed to induce a significant decrease of the EPSC amplitude. **B.** When the calcium chelator BAPTA (20 mM) was added to the intrapipette solution, NT was still able to decrease the EPSC amplitude significantly. **C.** Inhibiting G-proteins by adding GDP- β s (1 mM) blocked the NT induced decrease of EPSC amplitude. **D.** When the inhibitor of phospholipase C U-73122 (10 μ M) was added to the intrapipette solution, NT was no longer able to decrease the EPSC amplitude significantly. **E.** When the inhibitor of diacylglycerol-lipase tetrahydrolipstatin (3 μ M) was added to the intrapipette solution, NT no longer induced a significant decrease of EPSC amplitude. **F.** Summary of all NT-application voltage clamp experiments. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$

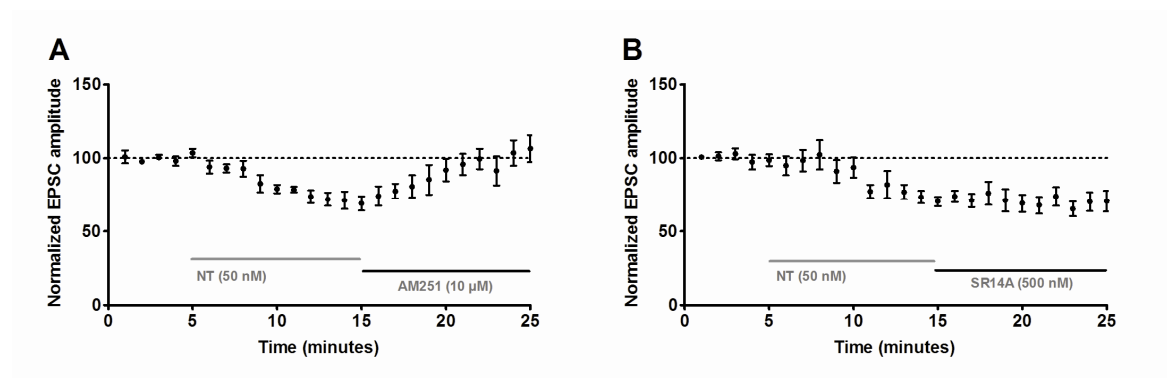


Figure 4: Neurotensin induced decrease of EPSCs is mediated by a prolonged release of endocannabinoids. **A.** When the CB1 receptor antagonist AM251 (10 μ M) was applied immediately after cessation of NT (50 nM) application, the NT induced decrease of EPSC

amplitude was reversed. **B.** The prolonged decrease of EPSC amplitude was not due to lingering NT, since blocking NT receptors with the broad spectrum NT receptor antagonist SR142948A (500 nM) did not reverse the decrease in EPSC amplitude.

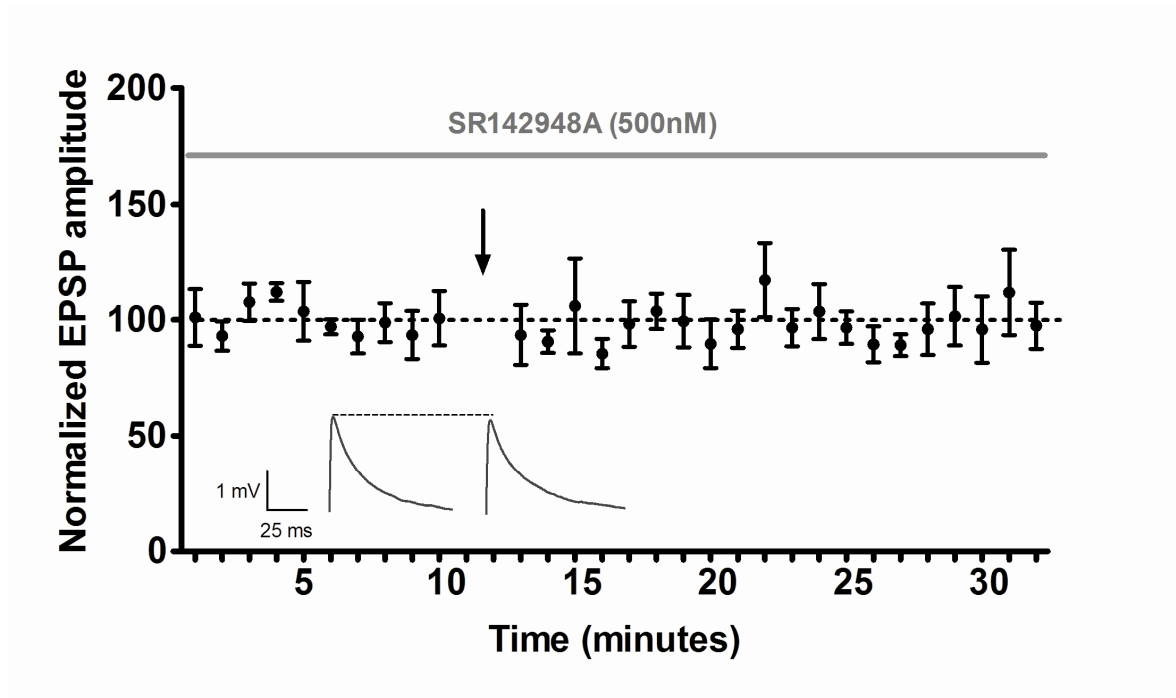
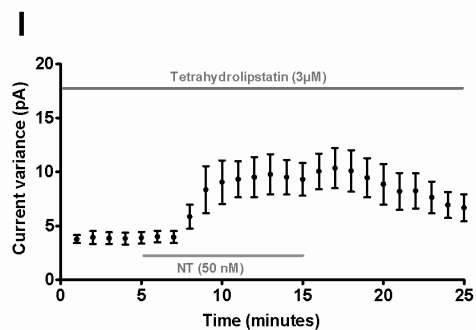
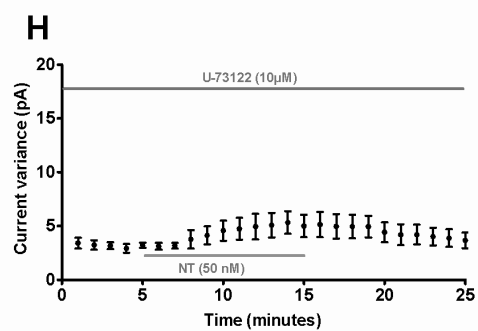
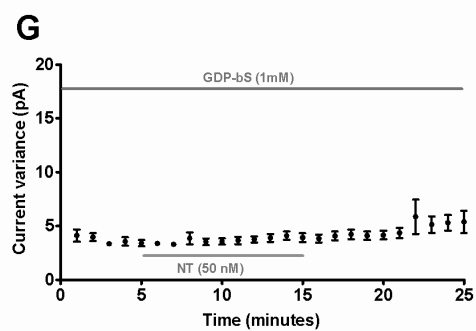
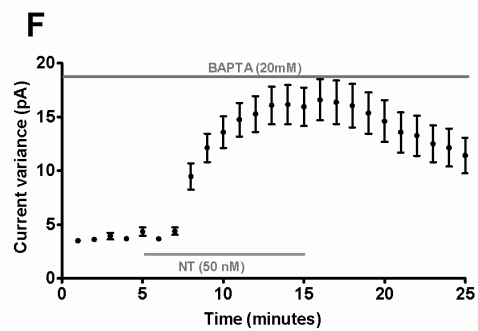
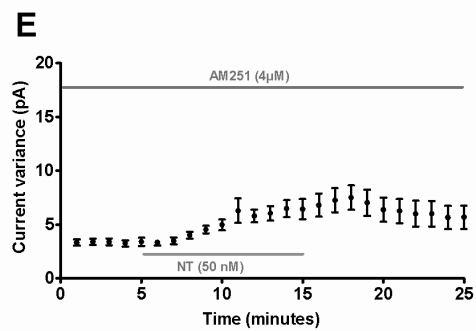
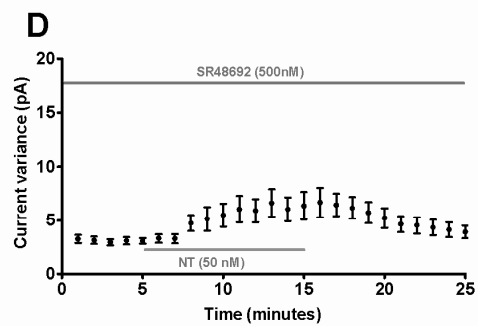
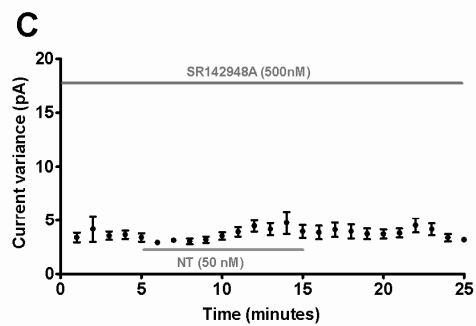
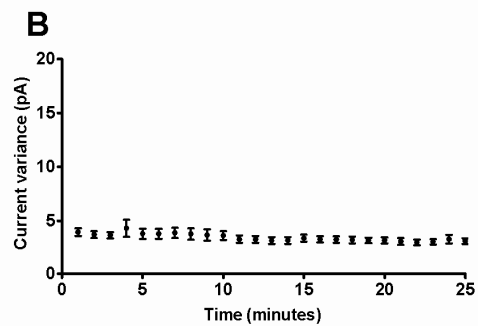
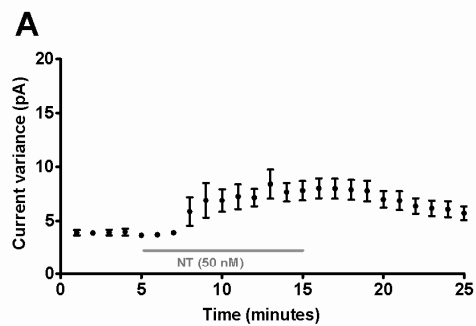


Figure 5: Neurotensin-induced endocannabinoid release does not seem to play a role in the induction of long term potentiation in VTA dopamine neurons. When in the presence of the broad spectrum NT receptor antagonist SR142948A (500 nM), no significant LTP could be induced in VTA DA neurons. The arrow represents moment of LTP induction. Insets show averaged example traces of evoked EPSPs before and after LTP induction.



Supplementary figure 1: Neurotensin induced a significant increase in membrane current variance, presumably due to NT2 receptor activation. **A.** When NT was applied, a distinct increase in membrane current variance ('noise') was observed. **B.** This noise was absent when no NT was applied. **C.** The noise was blocked when the broad spectrum NT receptor antagonist SR142948A (500 nM) was present during NT application. **D.** NT still induced significant noise when only NT1 receptors were blocked with SR48692 (500 nM). **E.** NT induced significant noise when the CB1 receptor antagonist AM251 (4 μ M) was present. **F.** When BAPTA (20 mM) was added to the intrapipette solution, NT-induced noise was significantly greater compared to NT alone. **G.** Addition of the G-protein inhibitor GDP- β s (1 mM) to the intrapipette solution blocked NT-induced noise. **H.** When the phospholipase C inhibitor U-73122 (10 μ M) was added to the intrapipette solution, NT induced noise was no longer significant. **I.** Addition of the diacylglycerol-lipase inhibitor tetrahydrolipstatin (3 μ M) did not block NT-induced noise.

Discussion

Depuis la découverte de la dopamine en tant que neurotransmetteur, le système dopaminergique du cerveau a été cartographié et son rôle dans la motivation, la cognition, le contrôle moteur, ainsi que les pathologies reliées ont été défini. Une de ces pathologies associée au système dopaminergique est la toxicomanie. Les drogues d'abus agissent sur le système dopaminergique méso-corticolimbique, agissant via une augmentation de la dopamine dans des structures comme le Nacc.

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du cerveau. Sa libération ainsi que son activation de récepteurs synaptiques montre dans plusieurs régions du cerveau une plasticité à long terme suite à une activation répétitive. Cette potentialisation à long terme (PLT) est un mécanisme neurobiologique clé de la mémoire et de l'apprentissage. Les drogues d'abus induisent une telle PLT aux synapses glutamatergiques établies sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentaire ventrale (ATV).

Dans les travaux entrepris durant cette thèse, nous avons voulu examiner les synapses glutamatergiques sur ces neurones pour mieux comprendre quels sont les mécanismes endogènes qui la régulent. Pour ce faire, nous avons tenté d'identifier certains des signaux endogènes qui peuvent influencer l'induction de la PLT dans ce système. Puisque dans de nombreuses structures, les ECs sont en mesure de diminuer la libération de glutamate de façon aigue et de façon prolongée, et peuvent être synthétisés suite à l'activation à haute fréquence de voies nerveuses et à la dépolarisation cellulaire, nous avons émis l'hypothèse qu'en réponse à des patrons de stimulation typiquement utilisés pour induire la PLT, des ECs sont produits, agissant ainsi comme un frein à l'induction de la PLT. Les résultats d'expériences réalisées pour évaluer cette hypothèse sont présentés dans le premier article.

Le système neurotensinergique du cerveau est un autre système neuromodulateur du cerveau qui est par ailleurs reconnu comme ayant un chevauchement très important avec les voies dopaminergiques méso-corticolimbiques. Les terminaisons neurotensinergiques qui innervent l'ATV proviennent en grande partie de certaines régions qui sont par ailleurs la source de projections glutamatergiques importantes qui terminent sur les neurones

dopaminergiques (Geisler *et al*, 2007; Geisler & Zahm, 2006). Ces projections sont susceptibles d'être stimulées pendant l'induction de la PLT. Dans le deuxième article, nous décrivons des travaux visant à évaluer si l'activation des récepteurs de la NT pourrait mener à la production de 2-AG (Yin *et al*, 2008), un EC qui pourrait réguler négativement la PLT dans l'ATV.

1: Considérations méthodologiques

Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé des souris transgéniques qui expriment la protéine fluorescente verte (GFP, de l'anglais « green fluorescent protein ») sous le contrôle du promoteur de la TH. Ces souris (lignée TH-eGFP/21-31) expriment ainsi la GFP dans les neurones catécholaminergiques (Matsushita *et al*, 2002; Sawamoto *et al*, 2001). Ceci facilite l'identification des neurones dopaminergiques dans des régions où il n'y a pas d'autres neurones catécholaminergiques, ce qui est le cas de l'ATV et de la substance noire. Nous avons choisi ce modèle, car l'identification des neurones dopaminergiques par des critères électrophysiologiques, tels que la présence ou non d'un courant I_h , bien que toujours fréquemment effectué, est problématique puisque la fiabilité de ces critères a été mise en doute dans plusieurs études (Cameron *et al*, 1997; Jones & Kauer, 1999; Margolis *et al*, 2010; Margolis *et al*, 2006; Wanat *et al*, 2008). Par ailleurs, la visualisation globale de la distribution des neurones exprimant la GFP dans le mésencéphale de ces souris facilite grandement l'identification régionale de l'ATV, évitant ainsi l'enregistrement accidentel de neurones dopaminergiques de la substance noire. Dans le premier article de cette thèse, nous avons effectué l'identification initiale des neurones dopaminergiques via la GFP, mais nous avons aussi inclus un marqueur intracellulaire, la biocytine, dans les pipettes d'enregistrement. Ceci nous a permis de confirmer le phénotype des neurones enregistrés à l'aide de l'immunohistochimie après fixation de la tranche. Ainsi, nous avons pu évaluer si tous les neurones GFP-positifs enregistrés exprimaient la tyrosine hydroxylase et étaient donc bel et bien dopaminergiques. Nous avons trouvé que dans 194 neurones GFP-positifs enregistrés, 87,1% expriment des niveaux de TH détectables par immunohistochimie. Ceci

nous a convaincu que l'expression de la GFP dans le cerveau de ces souris est un critère fiable pour identifier des neurones dopaminergiques. Ceci explique que pour le deuxième article, nous avons décidé de ne plus effectuer de confirmation immunohistochimique des neurones dopaminergiques.

Bien que les préparations de tranches de cerveau aigues utilisées pour les deux projets aient été très semblables, certaines différences doivent être soulignées. Pour optimiser la quantité de tranches d'ATV obtenues de chaque animal, nous avons diminué l'épaisseur de celles-ci de 250 μm dans le premier article, à 200-220 μm dans le deuxième. Ceci nous a permis d'obtenir plus de tranches contenant l'ATV, sans compromettre la qualité de celles-ci. Par ailleurs, nous avons changé la solution utilisée pour préparer les coupes; nous sommes passés d'une solution à teneur élevée en sucrose à une solution dans laquelle le NaCl est remplacé par le glycérol. Cette solution augmente la qualité des tranches en protégeant mieux les neurones pendant la coupe (Ye *et al*, 2006).

2: Régulation de la potentialisation à long terme dans l'aire tegmentaire ventrale par les endocannabinoïdes

2.1 Présence de récepteurs CB1 sur des terminaisons glutamatergiques de l'ATV

Des données fonctionnelles et structurales antérieures ont suggéré qu'il pourrait y avoir des récepteurs CB1 sur les terminaisons glutamatergiques dans l'ATV et que l'activation de ceux-ci peut provoquer une diminution de la libération de glutamate sur les neurones dopaminergiques (Matyas *et al*, 2008; Melis *et al*, 2004a; Melis *et al*, 2004b; Riegel & Lupica, 2004). Nous avons confirmé et précisé ces données par une approche immunohistochimique et électrophysiologique dans des coupes de cerveau de souris transgéniques exprimant la GFP. Bien que nous n'ayons pas identifié les régions d'origine des fibres glutamatergiques stimulées dans les expériences électrophysiologiques, des

données antérieures ont déjà suggéré que les terminaisons glutamatergiques de l'ATV proviennent en partie des couches profondes du cortex préfrontal médian ainsi que de plusieurs régions sous-corticales, telles que l'aire hypothalamique latérale, l'aire pré-optique latérale, l'hypothalamus médian, le pallidum ventral et la formation réticulaire mésopontine (Geisler *et al*, 2007). L'immunohistochimie nous a permis de montrer que les récepteurs CB1 sont bel et bien présents sur une petite sous-population de terminaisons glutamatergiques immunopositives pour VGLUT1, ce qui suggère qu'elles proviennent de régions corticales (Geisler *et al*, 2007), ou pour VGLUT2, ce qui suggèrent qu'elles proviennent de régions sous-corticales (Geisler *et al*, 2007). L'association plus fréquente du récepteur CB1 avec les terminaisons exprimant VGLUT1 suggère que ce récepteur soit plus exprimé par les afférences glutamatergiques d'origine corticale que sous-corticale (VGLUT2 positives).

En plus de son association avec des terminaisons exprimant VGLUT1 ou VGLUT2, nos travaux ont montré que ce récepteur est abondamment retrouvé sur des terminaisons immuno-négatives pour ces deux transporteurs vésiculaires du glutamate. Ces récepteurs sont donc probablement localisés en grande partie sur des terminaisons GABAergiques, puisqu'il est bien établi que l'ATV est l'hôte d'une forte innervation GABAergique provenant de neurones GABAergiques intrinsèques ainsi que de régions comme le striatum (Enoch, 2008; Johnson & North, 1992b; Steffensen *et al*, 1998). La présence de récepteurs CB1 sur des terminaisons axonales présumées GABAergiques sur la base de caractéristiques ultrastructurales a été suggéré récemment (Matyas *et al*, 2008). Cette expression élevée des récepteurs CB1 sur ces terminaisons pourrait expliquer pourquoi l'administration aiguë d'ECs ou d'agonistes synthétiques du récepteurs CB1 produit typiquement une activation des neurones dopaminergiques de l'ATV (Cheer *et al*, 2000; French *et al*, 1997; Wu & French, 2000). Ceci s'expliquerait donc par le fait que malgré la baisse de la libération de glutamate induite par l'activation de récepteurs CB1 sur les terminaisons glutamatergiques, une baisse simultanée et plus importante de la libération de GABA se produirait en parallèle, ce qui induirait une augmentation nette de l'activité des neurones dopaminergiques.

2.2 L'activation du récepteur CB1 diminue la libération de glutamate

Nous avons confirmé les travaux antérieurs montrant qu'une activation des récepteurs CB1 diminue l'amplitude des réponses synaptiques glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV (Melis *et al*, 2004a; Melis *et al*, 2004b; Riegel & Lupica, 2004). De plus, nous avons confirmé qu'un bref train de stimulation extracellulaire à moyenne fréquence (5 Hz) diminue l'amplitude des PPSEs, un effet qui est bloqué en présence de l'AM251, un antagoniste du récepteur CB1. Finalement, nous avons montré que le protocole de stimulation appariée utilisé pour l'induction de la PLT peut provoquer une diminution de l'amplitude des PPSEs. Un train de cette stimulation appariée diminue l'amplitude des PPSEs subséquents, ce qui est bloqué en présence de l'AM251. Le protocole complet (vingt trains) normalement utilisé pour induire la PLT entraîne une légère diminution qui est fortement accentuée une fois que nous n'induisons plus de potentiels d'action dans le neurone dopaminergique; ceci est aboli quand les récepteurs CB1 sont bloqués. Ainsi, suite à nos nouveaux résultats, il est maintenant clairement établi que les récepteurs CB1 sont localisés sur certaines des terminaisons glutamatergiques dans l'ATV et que l'activation de ceux-ci induit une baisse de la libération de glutamate, que cette activation soit causée par un agoniste exogène ou alors par une activation synaptique qui induit la libération des ECs par les neurones dopaminergiques eux-mêmes. Ainsi, les ECs semblent donc avoir un rôle important dans la régulation des neurones dopaminergiques de l'ATV, ainsi que dans l'induction de la PLT des synapses glutamatergiques dans cette région du cerveau.

Nous n'avons pas tenté d'identifier le signal cellulaire intracellulaire spécifique qui induit la synthèse des ECs par les neurones dopaminergiques dans les différentes conditions expérimentales décrites ci-haut. Cependant, il est probable qu'une augmentation du calcium intracellulaire induite par la dépolarisation, l'activation de récepteurs glutamatergiques de type mGluR ou une combinaison de ces deux signaux y contribuent fortement (Chevaleyre *et al*, 2006; Hashimotodani *et al*, 2007).

2.3 L'induction de la PLT est régulée négativement par le 2-AG

Nous avons obtenu dans ce projet de nombreux résultats concernant les conditions d'induction de la PLT. Nous avons tout d'abord confirmé que le protocole de stimulation appariée développé par Liu *et al* (2005) permet l'induction de la PLT en présence d'un antagoniste des récepteurs GABAergiques de type A, mais pas en conditions basales. Cette PLT est dépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Liu *et al*, 2005; Luu & Malenka, 2008). Nous avons par ailleurs découvert que le blocage des récepteurs CB1, ou alors le blocage de la synthèse de 2-AG par le tétrahydrolipstatin, dialysé dans le neurone enregistré, facilite également l'induction de la PLT. Ceci suggère donc que le protocole de stimulation apparié induit la production et la libération de 2-AG du neurone dopaminergique, ce qui agirait donc comme un facteur régulant négativement l'induction de la PLT. Nous ignorons le mécanisme exact par lequel le 2-AG régule la PLT au sein des synapses glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques. Cependant, il est peu probable que ce mécanisme implique l'activation synaptique de récepteurs GABA_A, car une activation des récepteurs CB1 sur les afférences GABAergiques près du neurone dopaminergique diminuerait la taille de ces réponses synaptiques, ce qui est justement une condition qui permet l'induction de cette même PLT (Kortleven *et al*, 2011; Liu *et al*, 2005; Luu & Malenka, 2008).

Nous avons aussi montré que l'application de l'AM251 tout de suite après le protocole d'induction de la PLT ne permet pas de démasquer une PLT « cachée ». Ceci suggère fortement que le 2-AG interfère avec la phase d'induction, plutôt que la phase d'expression de la PLT; c'est-à-dire que le 2-AG libéré régule négativement l'induction de la PLT, mais ne masque pas une PLT induite via sa libération continue et une activation continue des récepteurs CB1, suite à la phase d'induction.

Nous avons observé que le blocage combiné des récepteurs CB1 et GABA_A n'induit pas une PLT de taille plus importante que le blocage de chaque récepteur séparément. Une explication potentielle de cette observation est la PLT induite dans ces deux conditions expérimentales implique le même mécanisme cellulaire final, inconnu à ce jour, mais impliquant potentiellement la PKC (Luu & Malenka, 2008). Une autre interprétation serait

qu'un plafond de PLT maximale est atteint dans les deux conditions. Le concept d'une taille de PLT limitée aux synapses glutamatergiques de l'ATV est par ailleurs appuyé par d'autres données. Par exemple, il a été montré qu'outre les drogues d'abus, le stress peut aussi augmenter le ratio AMPA/NMDA aux synapses de l'ATV (Saal *et al*, 2003). Il serait concevable que diverses conditions expérimentales, telles que la manipulation, le transport et l'induction de l'anesthésie des animaux crée un stress suffisamment fort pour induire une PLT initiale à ces synapses, et que la PLT induite expérimentalement par la suite soit limitée en amplitude.

Notre observation à l'effet que le 2-AG inhibe l'induction de la PLT concorde avec certaines données antérieures, montrant par exemple que le blocage des récepteurs CB1 permet d'induire une PLT induite par des stimulations à haute fréquence (100Hz) (Stella *et al*, 1997; Terranova *et al*, 1995) ou par des bouffées thêta dans la région CA1 de l'hippocampe (Slanina *et al*, 2005). Cependant, il faut noter que d'autres travaux ont montré que les ECs peuvent aussi faciliter l'induction de la PLT dans la même région CA1 de l'hippocampe (Carlson *et al*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que des stimulations à basse fréquence (2HZ) appariées à des dépolarisations modérées peuvent induire une DLT des synapses glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques de l'ATV via une libération de 2-AG (Haj-Dahmane & Shen, 2010). Dans le contexte de ces observations, il est alors possible que le protocole de stimulation appariée utilisé pour induire la PLT induise en fait simultanément une baisse prolongée (ou DLT) de la libération de glutamate via le 2-AG et le CB1 et une PLT postsynaptique impliquant potentiellement l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA du glutamate. Ces deux mécanismes s'opposeraient et le résultat net serait une absence de changement de l'amplitude des PPSEs. Nous n'avons pas effectué d'expériences pour explorer cette possibilité. De nouvelles expériences électrophysiologiques pourraient permettre d'évaluer plus en détail cette hypothèse et évaluer si une forme de DLT survient effectivement dans ces conditions. Par exemple, l'utilisation de bloqueurs (toxine tétanique) de l'exocytose dépendant de la protéine SNARE, ce qui bloque l'insertion de récepteurs AMPA, combiné au protocole de stimulation appariée en présence ou en absence de SR95531 ou d'AM251 pourrait

permettre de bloquer sélectivement la PLT, révélant la DLT sous-jacente. Ce genre d'expériences permettrait d'évaluer l'hypothèse d'une DLT d'origine présynaptique.

Notre observation que la PLT induite par la stimulation appariée en présence d'un bloqueur CB1 est dépendante d'une activation des récepteurs NMDA est peu surprenante et est en fait tout à fait concordante avec certaines données récentes (Argilli *et al*, 2008; Liu *et al*, 2005; Luu & Malenka, 2008; Mameli *et al*, 2009). Le rôle important du récepteur NMDA dans la plasticité induite par les drogues d'abus à ces synapses de l'ATV a aussi été suggéré dans une étude montrant que le knockout conditionnel du récepteur NMDA dans les neurones dopaminergiques cause des changements importants dans les comportements reliés à la prise de drogues. Bien que la phase initiale de la sensibilisation à la cocaïne soit normale dans ces souris, la phase tardive, normalement présente après sevrage prolongé de la drogue, est abolie (Engblom *et al*, 2008; Zweifel *et al*, 2008). De plus, la reprise du comportement de recherche de drogue est aberrant dans ces modèles; la réexpression de la préférence conditionnée pour un endroit auparavant associé à une prise de drogue suite à l'extinction de cette préférence, un modèle animal de la rechute, est absente dans ces souris (Engblom *et al*, 2008). Par contre, utilisant un nouveau modèle de KO qui semble mieux éliminer les récepteurs NMDA dans tous les neurones dopaminergiques, Luo *et al* (2010) ont trouvé que ce sont les récepteurs NMDA sur des neurones non-dopaminergiques de l'ATV qui sont nécessaires pour l'induction de la sensibilisation aux drogues d'abus et la préférence conditionnée pour un endroit auparavant associé à une prise de drogue, ainsi que sa réexpression suite à l'extinction, mettant en doute les données publiées précédemment (Engblom *et al*, 2008; Zweifel *et al*, 2008). Dans le contexte de ces données, il est intéressant de noter que les ECs centraux ne semblent pas jouer un rôle dans l'effet renforçant de la cocaïne, ni dans la phase initiale de la sensibilisation à la cocaïne (Filip *et al*, 2006; Lesscher *et al*, 2005; Martin *et al*, 2000). Par contre, la réinitialisation de l'auto-administration de la cocaïne suite à l'extinction de ce comportement semble être diminuée quand les récepteurs CB1 centraux sont bloqués (De Vries *et al*, 2001; Filip *et al*, 2006). Le même effet a été observé pour la réinitialisation de l'auto-administration d'héroïne (De Vries *et al*, 2003). Ainsi, bien que le rôle des CB1 centraux dans la toxicomanie soit

complexe (Wiskerke *et al*, 2008), les récepteurs CB1 du mésencéphale pourraient potentiellement jouer un rôle dans le traitement de la toxicomanie, puisqu'ils semblent être impliqués dans la rechute (Lupica & Riegel, 2005). Finalement, des prétraitements avec le delta9-tétrahydrocannabinol peuvent entraîner une sensibilisation locomotrice (Cadoni *et al*, 2001) et une sensibilisation croisée avec les autres drogues d'abus, telles que l'amphétamine et l'héroïne (Lamarque *et al*, 2001), suggérant que les cannabinoïdes agissent d'une façon similaire aux autres classes de drogues d'abus.

Une question importante est de savoir si la PLT induite *in vitro* par la stimulation appariée représente en fait un mécanisme de plasticité analogue à celui induit par les drogues d'abus. Le fait que les deux mécanismes soient dépendants du récepteur NMDA est compatible avec cette possibilité. Par contre, il est important de noter que nous ne savons pas si l'induction de cette PLT par les drogues d'abus ou de façon électrophysiologique est associée à une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV et à une libération accrue de dopamine en réponse à des stimuli physiologiques ou à la prise subséquente de drogue. Il est possible que la PLT des synapses glutamatergiques soit contrebalancée par une PLT des synapses GABAergiques, ce qui pourrait limiter ou annuler l'activation du système dopaminergique mésocorticolimbique. Cette possibilité doit être considérée puisqu'il a été montré que l'activation des récepteurs NMDA peut induire une PLT de ces synapses inhibitrices via la production et libération d'un messager rétrograde, l'oxyde nitrique (Nugent *et al*, 2007). Une telle PLT des synapses inhibitrices de façon parallèle pourrait agir comme modulateur de gain sur l'activité des neurones dopaminergique pour empêcher une trop forte activité (Nugent & Kauer, 2008). Par contre, considérant que 1) l'administration répétée de cocaïne induit une DLT dans le Nacc (Kourrich *et al*, 2007) et que 2) la persistance de la PLT induite par les drogues d'abus dans l'ATV, un phénomène contrôlé par le récepteur mGluR1, soit associée à l'apparition d'une DLT dans le Nacc (Mameli *et al*, 2009), et que 3) quand la PLT dans l'ATV est abolie, cette DLT n'apparaît plus au niveau du Nacc (Mameli *et al*, 2009), il semble probable que cette PLT au niveau de l'ATV joue un rôle très important dans l'induction de la plasticité à long terme induite par les drogues d'abus ailleurs dans le cerveau.

Une autre question importante en rapport avec le mécanisme d'induction de la PLT est d'identifier quels signaux endogènes mènent à la production du 2-AG pendant l'induction de la PLT dans l'ATV. Nous avons montré qu'en présence d'AP5, un antagoniste des récepteurs NMDA, des trains de stimulations appariés ont induit une petite diminution de l'amplitude des PPSEs. En absence d'AP-5 et de stimulations postsynaptiques appariées, cette diminution était nettement plus importante. Il est donc possible que l'influx calcique via les récepteurs NMDA joue un rôle dans la production de 2-AG. Un autre déclencheur de la production du 2-AG pourrait être l'activation des récepteurs mGluR postsynaptiques (Chevaleyre *et al*, 2006; Hashimotodani *et al*, 2007). Il a été montré que la présence d'un antagoniste non-sélectif des récepteurs mGluR n'augmente pas la PLT induite en présence de la picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA_A (Luu & Malenka, 2008). Il faut retenir, par contre, que nous non plus n'avons pas trouvé une PLT plus importante en présence d'une combinaison d'antagonistes CB1 et GABA_A. Afin d'évaluer le rôle que jouent les récepteurs mGluRs dans la production de 2-AG au moment de l'induction de la PLT, il serait donc nécessaire d'induire la PLT en présence d'un antagoniste des récepteurs mGluRs, sans autres antagonistes. Finalement, il n'est pas impossible que durant le protocole de stimulation appariée, d'autres récepteurs couplés aux protéines G qui activent la PLC puissent induire la synthèse de 2-AG, une question que nous avons d'ailleurs abordée dans le deuxième article de cette thèse. Il serait également intéressant d'explorer la possibilité que des canaux calciques voltages-dépendants soient impliqués dans la production d'ECs, puisque le protocole d'induction de la PLT nécessite la dépolarisation du neurone dopaminergique.

Puisque que le blocage des récepteurs CB1 ou de la synthèse de 2-AG facilite l'induction de la PLT, et que cette PLT est induite par les drogues d'abus et joue un rôle important dans les comportements associés aux drogues d'abus, il serait tentant de spéculer que les circonstances favorisant la production de 2-AG ou l'activation des récepteurs CB1 dans l'ATV devraient diminuer l'activité des neurones dopaminergiques et inhiber la libération de dopamine ainsi que les comportements liés à la prise de drogues. Cette hypothèse est cependant incompatible avec de nombreuses données expérimentales. Par

exemple, il est largement reconnu que l'effet net des cannabinoïdes dans l'ATV est une augmentation de l'excitabilité des neurones dopaminergiques (French, 1997; French *et al*, 1997; Gessa *et al*, 1998). En fait, l'activation des récepteurs CB1 induit une augmentation de la libération de dopamine dans le Nacc (Cheer *et al*, 2007). De plus, le blocage ou la délétion génétique du récepteur CB1 entraîne une baisse de l'auto-administration de la cocaïne chez la souris (Soria *et al*, 2005). Dans le contexte de paradoxe apparent, il est également important de se rappeler que les récepteurs CB1 sont exprimés pratiquement partout dans le cerveau et que leur activation suite à la consommation de cannabis pourrait avoir de nombreux effets dans différentes régions du cerveau. Au sein de l'ATV, il est également clair que l'activation du récepteur CB1 par le delta9-tétrahydrocannabinol ou le 2-AG induira des effets complexes via une baisse de la libération de glutamate associé à une baisse, probablement dominante, de la libération de GABA. Compatible avec cet effet activateur net, l'administration répétée de cocaïne entraîne une DLT des synapses GABAergiques dans l'ATV via le récepteur CB1 (Pan *et al*, 2008a, b). Il faudrait ainsi considérer qu'il existe en parallèle deux mécanismes via le récepteur CB1 régulant l'induction de la PLT aux synapses glutamatergiques de l'ATV : 1) un effet inhibiteur direct sur les terminaisons glutamatergiques, et 2) un effet facilitateur sur l'induction de cette PLT via une diminution de la transmission synaptique GABAergique. Ces deux effets seraient en équilibre, avec le deuxième mécanisme exerçant un effet dominant. Il reste néanmoins possible que dans certaines circonstances, la production d'ECs dans un domaine dendritique restreint des neurones dopaminergiques puisse agir localement pour inhiber sélectivement certaines synapses glutamatergiques. Ceci semble se produire dans le striatum, où seules les terminaisons activées préalablement montrent une baisse de la libération de glutamate suite à l'activation des récepteurs CB1 (Singla *et al*, 2007). Ainsi, le 2-AG pourrait donc réguler indépendamment certaines synapses, en fonction de leur origine et de leur activité.

2.4 Existence d'une régulation tonique des synapses glutamatergiques via le récepteur GABA_A ?

Dans le premier article de cette thèse, nous avons montré que le SR95531, un antagoniste des récepteurs GABA_A induit en soit une augmentation graduelle de l'amplitude des PPSEs, suggérant une inhibition tonique de l'amplitude des PPSEs par le GABA. Il s'agit d'une observation qui contredit les données de Liu et collaborateurs (Liu *et al*, 2005), qui rapportent que la bicuculine, un autre antagoniste des récepteurs GABA_A, n'induit aucun changement de l'amplitude des PPSEs. La raison de cette apparente contradiction n'est pas claire pour l'instant. Cependant, il est possible que ceci résulte de différences inter-espèces, puisque nos expériences ont été effectuées chez la souris, alors que celles de Liu et collaborateurs ont été réalisées chez le rat. Il est aussi possible que le fait d'avoir sélectionné les neurones dopaminergiques grâce à l'expression de la GFP plutôt que grâce à des critères électrophysiologiques nous a permis de sélectionner une population plus large de neurones dopaminergiques. Il serait possible, par exemple, que les neurones dopaminergiques qui présentent un large courant I_h présentent des propriétés de régulation synaptiques qui diffèrent de celle des neurones dopaminergiques ne montrant pas un tel courant. Une explication plus triviale de notre observation serait que malgré le fait que les neurones dopaminergiques étaient maintenus en courant imposé très près du potentiel d'inversion des ions chlore, les PPSEs enregistrés incluaient néanmoins une petite composante GABA_A, qui se superposait à la composante principale AMPA des PPSEs. Le SR95531 aurait alors causé une hausse de l'amplitude des PPSEs en bloquant simplement les PPSIs sous-jacentes. Un effet de ce genre a d'ailleurs été montré par un autre groupe dans le contexte d'enregistrements extracellulaires et intracellulaires de neurones dopaminergiques de l'ATV (Nugent *et al*, 2008). Malgré ceci, nos résultats ne sont pas compatibles avec cette possibilité puisque nous avons observé que dans nos conditions, il n'y avait pas de composante GABA_A significative dans les PPSEs enregistrés. Une autre possibilité serait bien que les enregistrements aient été effectués au potentiel de repos du chlore, il y avait tout de même une activation simultanée de synapses GABAergiques, menant à une forme d'inhibition silencieuse ou de court-circuit membranaire (appelé

« shunting » en anglais); le blocage des récepteur $GABA_A$ aurait alors induit une augmentation de la résistance membranaire, provoquant ainsi une augmentation de l'amplitude du PPSE, tel que prédit par la loi d'Ohm ($V=RI$). Bien que ceci puisse représenter une explication logique de notre observation, il aurait été attendu que si l'effet du SR95531 était dû au blocage de l'inhibition silencieuse via le récepteur $GABA_A$, l'augmentation de la taille des PPSEs aurait dû apparaître rapidement suite à la perfusion de l'antagoniste; l'effet observé était au contraire très lent à se développer. Finalement, nous ne pouvons pas exclure que l'augmentation des PPSEs par le SR95531 soit due à une augmentation générale de l'excitabilité de fibres stimulées. En conclusion, bien que nos données ne permettent pas de clarifier le mécanisme de cette augmentation graduelle de la taille des PPSEs, nos données sont compatibles avec l'existence d'une forme d'inhibition tonique des PPSEs via le récepteur $GABA_A$ dans l'ATV.

3: La neurotensine: une source de production de 2-AG dans l'ATV

3.1 La neurotensine est présente dans certaines terminaisons glutamatergiques

Il est bien établi qu'il existe une interaction étroite entre les systèmes neurotensinergiques et dopaminergiques de la voie mésocorticolimbique (pour revue, voir Binder *et al*, 2001). Certains neurones dopaminergiques de la voie méso-corticolimbique expriment eux-mêmes la NT (Hökfelt *et al*, 1984a) et peuvent la libérer (Bean & Roth, 1991). De plus, la NT est présente dans de très nombreuses terminaisons dans l'ATV et la substance noire (Hökfelt *et al*, 1984a; Uhl *et al*, 1979). Ces terminaisons proviennent en grande partie de noyaux hypothalamiques (Geisler & Zahm, 2006), une région qui est également la source de projections glutamatergiques vers les neurones dopaminergiques de l'ATV (Geisler *et al*, 2007). Il est donc plausible que certaines afférences glutamatergiques co-libèrent la NT et le glutamate, un phénomène qui pourrait être induit par la stimulation extracellulaire typiquement utilisée pour induire la PLT.

A l'aide de l'immunohistochimie, nous avons déterminé qu'une sous-population d'afférences glutamatergiques de l'ATV contient de la NT. Dans l'ATV de souris âgées de 3 semaines, la NT est exprimée plus abondamment par les terminaisons glutamatergiques immunoréactives pour le VGLUT2 que par celles qui contiennent VGLUT1, une différence qui n'apparaît pas encore dans des souris de 2 semaines, compatible avec la possibilité d'une variation développementale de cette forme de cotransmission. Ces terminaisons qui expriment le VGLUT2 proviennent surtout de régions sous-corticales (Geisler *et al*, 2007). L'augmentation de la quantité de terminaisons VGLUT2 immunopositives qui expriment la NT est en concordance avec des données qui montrent une augmentation de l'expression du récepteur NTS1 au cours du développement postnatal. Cette augmentation atteint un plafond à p21 (Lepee-Lorgeoux *et al*, 1999). Ceci suggère que le système neurotensinergique continue à se développer durant cette période chez la souris.

3.2 Effet inhibiteur de la NT sur les synapses glutamatergiques de l'ATV

Plusieurs études antérieures ont montré que la NT est en mesure de réguler les synapses glutamatergiques dans différentes régions du cerveau. Le plus souvent, la NT semble augmenter la libération de glutamate. Par exemple, des études de microdialyse ont montré que l'application de NT exogène augmente la quantité de glutamate extrasynaptique libéré dans le striatum (Ferraro *et al*, 1998; Ferraro *et al*, 1995), la substance noire (Ferraro *et al*, 2001) et le cortex cérébral (Ferraro *et al*, 2000). La faible résolution spatiale et temporelle de cette technique, combiné à l'origine extrasynaptique probable du glutamate mesuré, limite cependant la portée de ces résultats et est peu informative sur les effets de la NT sur la libération synaptique de glutamate. Récemment, il a été montré que la NT peut induire une diminution de l'amplitude des CPSEs évoqués dans le striatum dorsolatéral, un effet dépendant du calcium intracellulaire et de l'activation des récepteurs CB1 (Yin *et al*, 2008).

La NT est en mesure d'induire une augmentation de calcium intracellulaire dans les neurones dopaminergique en culture (St-Gelais *et al*, 2004), vraisemblablement via l'activation de la PLC (Hermans *et al*, 1992), la production d'inositol trisphosphate (IP3) et la libération des stocks internes de calcium intracellulaires. Par ailleurs, une augmentation du calcium intracellulaire peut activer la synthèse des ECs (Chevaleyre *et al*, 2006; Hashimoto *et al*, 2007; Piomelli, 2003). Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer l'hypothèse que la NT soit en mesure d'induire une production d'ECs par les neurones dopaminergiques et d'inhiber ainsi les synapses glutamatergiques dans l'ATV. Nos travaux montrent qu'effectivement, la NT induit une baisse de la taille des CPSEs évoqués électriquement dans les neurones dopaminergiques de l'ATV. Nous avons observé que cette diminution est dépendante de l'activation des récepteurs CB1. De plus, elle semble nécessiter le NTS1 plutôt que le NTS2, car le SR48692, un antagoniste sélectif des NTS1 prévient cette diminution d'une façon équivalente au SR142948A, un antagoniste à large spectre bloquant à la fois le NTS1 et le NTS2.

Bien que la NT est en mesure d'induire une élévation du calcium intracellulaire dans les neurones dopaminergiques, ceci ne semble pas être essentiel pour l'effet inhibiteur

de la NT sur la taille des CPSEs, puisque l'effet n'a pas été bloqué par la dialyse des neurones dopaminergiques avec du BAPTA. Notre observation est compatible avec des données, mentionnées précédemment, montrant que le 2-AG peut être synthétisé suite à une activation de la PLC par des récepteurs glutamatergiques de type mGluR, sans nécessiter une augmentation du calcium intracellulaire (Hashimotodani *et al*, 2007; Maejima *et al*, 2001). Ces récepteurs couplés aux protéines G activent donc directement la PLC et peuvent ainsi augmenter la production de diacylglycerol, qui à son tour peut être converti en 2-AG par la diacylglycerol-lipase. Ce mécanisme a d'ailleurs été mis en évidence dans une étude portant sur l'orexine-B, qui induit une diminution de la neurotransmission par les synapses glutamatergiques établies sur les neurones sérotoninergiques du raphé dorsale (Haj-Dahmane & Shen, 2005). Dans notre étude, un mécanisme similaire semble être entré en jeu, puisque l'effet inhibiteur de la NT sur les CPSEs a été bloqué par l'inclusion dans la solution intra-pipette du GDP- β S, un inhibiteur des protéines G hétérotrimériques, du U-73122, un inhibiteur de la PLC ainsi que du tétrahydrolipstatin, un inhibiteur de la diacylglycérol-lipase. Le fait que la tétrahydrolipstatin ait bloqué l'effet de la NT est indicatif d'une libération de 2-AG par le neurone enregistré. Ainsi, nous concluons que la NT agit sur la PLC via son récepteur NTS1, induisant une production de 2-AG. Ces données mettent donc en évidence un nouveau mécanisme de régulation de la transmission synaptique glutamatergique dans l'ATV en réponse à un neuropeptide, ce qui est susceptible de contrôler l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV et leur libération de dopamine.

Nous avons observé que la NT a induit une baisse prolongée de l'amplitude des CPSEs. Le mécanisme impliqué dans cet effet prolongé de la NT nous semble particulièrement intéressant. Tel que mentionné auparavant, la libération des ECs peut être à la base de certaines formes de DLT. Cependant, ceci ne semble pas typiquement nécessiter l'activation soutenue dans le temps des récepteurs CB1 (Chevaleyre *et al*, 2006; Hashimotodani *et al*, 2007). Dans l'ATV, une telle DLT de la transmission GABAergique se produit suite à l'administration de la cocaïne (Pan *et al*, 2008a, b). Par contre, Yin *et al* (2008) ont montré que dans le striatum, un antagoniste du récepteur CB1, appliqué après

l'arrêt de l'application de la NT, peut renverser la diminution de l'amplitude des CPSEs induite par la NT. Donc, la NT semble produire une libération soutenue d'ECs dans cette région. Nos travaux suggèrent fortement qu'un même mécanisme existe dans l'ATV; nous avons observé que l'antagoniste CB1 AM251, appliqué tout de suite après l'arrêt de l'application de la NT, a induit un retour rapide de l'amplitude des CPSEs vers son niveau initial. Cette libération soutenue d'ECs ne semble pas dépendre d'une activation prolongée des NTS1 à la surface de la membrane cellulaire, puisqu'une application de l'antagoniste non-sélectif des NTS1 et NTS2 tout de suite après l'application de la NT n'a pas induit une récupération de l'amplitude des CPSEs. Nous concluons donc que la NT exogène induit une baisse soutenue de la libération de glutamate via l'activation transitoire du récepteur NTS1, menant à une production soutenue de 2-AG. D'ailleurs, le fait que la NT puisse induire une libération d'ECs et que ces ECs agissent pour diminuer la neurotransmission glutamatergique dans l'ATV et le striatum pourrait même être réconcilié avec les données obtenues à l'aide de la microdialyse, mentionnées plus tôt dans cette section; ces études ont montré que la NT augmente la quantité de glutamate extracellulaire dans certaines régions du cerveau, dont le striatum et le mésencéphale. Une explication potentielle serait que les ECs libérés par la NT, en plus de leur effet inhibiteur direct sur les synapses glutamatergiques, agiraient aussi sur les astrocytes, induisant une augmentation de la libération de glutamate par ces cellules, tel que suggéré par des travaux récents dans l'hippocampe (Navarrete & Araque, 2010). Il est donc probable que les ECs aient des effets complexes sur plusieurs types cellulaires, partout dans le cerveau.

Il est possible par ailleurs que la libération endogène de la NT puisse provoquer une vraie DLT par l'activation rétrograde des CB1 sur les terminaisons glutamatergiques innervant les neurones dopaminergiques. Ce mécanisme pourrait par exemple exister afin de protéger les neurones dopaminergiques d'une activation excessive via les terminaisons glutamatergiques, par exemple dans le contexte de conditions pathologiques comme les accidents vasculaires cérébraux. La co-libération de NT pourrait agir pour protéger les neurones dopaminergiques en provoquant une synthèse de 2-AG et l'activation des récepteurs CB1, diminuant ainsi la libération de glutamate de façon prolongée. Il faut noter

cependant que dans un modèle de neurones dopaminergiques embryonnaires en culture, la NT exogène semble plutôt induire une mort neuronale (Antonelli *et al*, 2002). Bien que spéculatif, la NT endogène, libérée à des niveaux beaucoup plus faibles, pourrait fort bien tout de même avoir un rôle principalement neuroprotecteur, ce qui devra être évalué par des expériences additionnelles.

3.3 Augmentation de la variance du courant membranaire par la NT dans les neurones dopaminergiques

Outre l'effet inhibiteur de la NT sur les CPSEs, nous avons aussi observé que la NT produit aussi une fluctuation marquée du potentiel membranaire dans les neurones dopaminergiques. Ces fluctuations, également visible en voltage imposé, font en sorte que les tracées enregistrées en présence de la NT ont un caractère particulièrement « bruyant ». Cette augmentation de la variance du courant membranaire est fort probablement due à l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs par la NT (Jiang *et al*, 1994). Il est intéressant de noter que ces fluctuations sont présentes quand le NTS1 est sélectivement bloqués, mais absentes quand les NTS1 et NTS2 sont tous deux bloqués. Ceci est compatible avec l'hypothèse que le NTS2 est principalement responsable de cet effet. Par ailleurs, considérant que l'inhibition des protéines G hétérotrimériques et le blocage de la PLC sont aussi en mesure de bloquer cette augmentation de la variance membranaire, nos résultats suggèrent que le NTS3 n'est pas impliqué, puisque celui-ci n'est pas couplé à cette voie de signalisation. Il est surprenant que l'augmentation de la variance membranaire induite par la NT ait été fortement potentialisée suite à la chélation du calcium intracellulaire par le BAPTA. Nous n'avons pas tenté d'élucider d'avantage les particularités de cette activation probable de canaux cationiques, mais l'effet étonnant du BAPTA suggère qu'en condition basale, en absence de BAPTA, le calcium puisse avoir un effet inhibiteur sur cet effet de la NT, par exemple via la fermeture d'autres classes de canaux. La fermeture de ces autres canaux pourrait, lorsque le calcium libre est présent dans la cellule, agir afin de contrebalancer l'activation des canaux cationiques responsables de l'augmentation de la variance du courant membranaire. Avec du BAPTA dans la pipette

d'enregistrement, cet effet compensatoire ne pourrait s'exprimer, amplifiant ainsi les effets de la NT. De nouvelles expériences seraient nécessaires pour évaluer cette hypothèse très spéculative.

3.4 La NT endogène n'affecte pas l'induction de la PLT dans les neurones dopaminergiques suite au protocole de stimulation appariée

Dans le premier article, nous avons montré que le 2-AG est en mesure d'agir afin d'inhiber l'induction de la PLT. De plus, la NT peut induire la synthèse et la libération du même 2-AG. Puisque certaines des terminaisons glutamatergiques stimulées lors du protocole de stimulation appariée peuvent contenir la NT, il nous apparaissait donc possible que dans ces conditions, la libération de NT et la libération de 2-AG agissent de façon à réguler négativement l'induction de la PLT. Pour tester cette hypothèse, nous avons essayé d'induire la PLT avec le même protocole de stimulation utilisé dans le premier article, mais cette fois-ci en présence du SR142948A, l'antagoniste non-sélectif des récepteurs de la NT. Ceci n'a produit aucun effet facilitateur sur l'induction de la PLT, suggérant ainsi que contrairement à notre hypothèse, il y a trop peu, ou même aucune libération de la NT en réponse au protocole de stimulation appariée utilisé. Cette observation n'exclut pas nécessairement un rôle de la NT dans la PLT qui survient *in vivo* ou en réponse aux drogues d'abus. Considérant que la NT intra-ATV produit elle-même des effets comportementaux similaires aux drogues d'abus (Glimcher *et al*, 1984), il est possible qu'elle aussi induirait une PLT aux synapses glutamatergiques au sein de l'ATV via les mêmes mécanismes que les drogues d'abus. En tout les cas, il a été clairement établi que la NT joue un rôle dans le développement de la sensibilisation aux drogues d'abus, qui dépend des récepteurs NMDA de l'ATV (Panayi *et al*, 2005; Panayi *et al*, 2002; Rompre, 1997). Cependant, nous devons néanmoins conclure qu'elle ne semble pas jouer un rôle très important dans l'induction de la PLT dans nos conditions expérimentales, avec une stimulation appariée à 10 Hz. L'utilisation de protocoles faisant appel à des stimulations à

plus haute fréquence pourrait éventuellement mettre en évidence une contribution de la NT endogène à l'induction de la PLT à ces synapses de l'ATV.

4: Conclusions et perspectives

Nos travaux nous ont permis de découvrir que le 2-AG est libéré suite à des trains de stimulations extracellulaires et que cette libération peut inhiber l'induction de la PLT dans les neurones dopaminergiques de l'ATV. Le blocage des récepteurs CB1 est suffisant pour faciliter l'induction de cette PLT par ce protocole qui s'avère inefficace en absence de blocage des récepteurs GABA_A. Cette PLT est dépendante des récepteurs de type NMDA, tout comme la PLT induite par les drogues d'abus dans les mêmes neurones.

D'autre part, nous avons démontré que la NT, un peptide abondant dans l'ATV, est en mesure d'induire la production de 2-AG via un mécanisme indépendant du calcium intracellulaire, mais qui requiert les protéines G hétérotrimériques, l'activation de la PLC et la synthèse de 2-AG. Ce 2-AG nouvellement synthétisé agit de façon soutenue sur les récepteurs CB1 des terminaisons glutamatergiques pour diminuer la libération de glutamate sur les neurones dopaminergiques. Par contre, la NT endogène ne semble pas réguler négativement l'induction de la PLT dans les neurones dopaminergiques de l'ATV. Nous concluons que malgré la capacité de la NT d'induire la synthèse et la libération de 2-AG, ce neuropeptide n'est pas libéré de façon suffisante en réponse au protocole de stimulation apparié utilisé.

Les systèmes des ECs et neurotensinergiques sont donc capables de réguler la transmission synaptique glutamatergique sur les neurones dopaminergiques de l'ATV à court et à long terme. Il serait maintenant important de poursuivre ces travaux en évaluant le rôle de ces mêmes systèmes dans la plasticité synaptique induite par les drogues d'abus dans le contexte de la toxicomanie. A titre d'exemple, pour mieux comprendre le rôle du 2-AG et de la NT dans la plasticité induite par les drogues d'abus, il serait intéressant d'utiliser un protocole permettant justement d'induire une PLT *in vitro*, en réponse à l'application aiguë d'une drogue d'abus comme la cocaïne ou l'amphétamine sur des tranches d'ATV de souris. Tel que montré auparavant, une telle application est suffisante pour induire une augmentation du ratio AMPA/NMDA aux synapses glutamatergiques de l'ATV, mimant ainsi l'effet produit *in vivo* par les différentes classes de drogues d'abus

(Argilli *et al*, 2008). Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet sur le ratio AMPA/NMDA produit *in vitro* par la cocaïne, avec ou sans pré-incubation des tranches avec un antagoniste du récepteur CB1, un agoniste du récepteur CB1, un antagoniste des récepteurs à la NT ou un agoniste de ces récepteurs. Si les antagonistes CB1 sont donc capables d'inhiber l'induction de la PLT induite par stimulation électrique (qui semble partager les mécanismes d'induction de la PLT par les drogues d'abus), il est possible qu'un prétraitement avec cet antagoniste CB1 facilite l'induction de la PLT par la cocaïne. À l'inverse, un prétraitement avec un agoniste du récepteur CB1 pourrait diminuer l'effet potentialisateur de la cocaïne sur les synapses glutamatergiques dans l'ATV. Par ailleurs, un prétraitement avec la NT pourrait induire une libération soutenue d'endocannabinoïdes et elle pourrait ainsi avoir un effet inhibiteur sur la PLT induite par la cocaïne. Ces expériences pourraient ainsi permettre d'avoir un premier aperçu du rôle de ces deux systèmes dans la plasticité synaptique induite par les drogues d'abus et donc de mieux comprendre leur rôle dans la toxicomanie.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'orexine-A, un neuropeptide qui agit sur un système de récepteurs semblable à celui de la NT, induit une augmentation du nombre de récepteurs NMDA synaptiques dans les neurones dopaminergiques de l'ATV, un mécanisme qui semble nécessaire pour l'induction de la sensibilisation à la cocaïne (Borgland *et al*, 2006) et qui joue un rôle dans la régulation des comportements liés aux drogues d'abus (Bonci & Borgland, 2009; Richards *et al*, 2008). Il serait donc logique de regarder plus en détail les effets de la NT sur les composantes AMPA et NMDA des synapses glutamatergiques de l'ATV. Une action similaire de la NT à celle de l'orexine-A sur les récepteurs NMDA pourrait par exemple être à la base de son effet potentialisateur sur la sensibilisation aux drogues d'abus (Panayi *et al*, 2002; Rompre & Perron, 2000; Rompre, 1997).

Bibliographie

Albanese A., Altavista M. C., Rossi P. (1986) Organization of central nervous system dopaminergic pathways. *Journal of neural transmission Supplementum* **22**: 3-17.

Anagnostaras S. G., Robinson T. E. (1996) Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behavioral neuroscience* **110**(6): 1397-1414.

Antonelli T., Tomasini M. C., Finetti S., Giardino L., Calza L., Fuxe K., Soubrie P., Tanganelli S., Ferraro L. (2002) Neurotensin enhances glutamate excitotoxicity in mesencephalic neurons in primary culture. *Journal of neuroscience research* **70**(6): 766-773.

Argilli E., Sibley D. R., Malenka R. C., England P. M., Bonci A. (2008) Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **28**(37): 9092-9100.

Badiani A., Camp D. M., Robinson T. E. (1997) Enduring enhancement of amphetamine sensitization by drug-associated environmental stimuli. *J Pharmacol Exp Ther* **282**(2): 787-794.

Bean A. J., Roth R. H. (1991) Extracellular dopamine and neurotensin in rat prefrontal cortex in vivo: effects of median forebrain bundle stimulation frequency, stimulation pattern, and dopamine autoreceptors. *J Neurosci* **11**(9): 2694-2702.

Bellone C., Luscher C. (2006) Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed in vivo by mGluR-dependent long-term depression. *Nat Neurosci* **9**(5): 636-641.

Betancur C., Canton M., Burgos A., Labeeuw B., Gully D., Rostene W., Pelaprat D. (1998) Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [3H]SR 142948A, in the rat brain. *European journal of pharmacology* **343**(1): 67-77.

Binder E. B., Kinkead B., Owens M. J., Nemeroff C. B. (2001) Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacological reviews* **53**(4): 453-486.

Björklund A., Dunnett S. B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences* **30**(5): 194-202.

Blaha C. D., Phillips A. G. (1992) Pharmacological evidence for common mechanisms underlying the effects of neurotensin and neuroleptics on in vivo dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. *Neuroscience* **49**(4): 867-877.

Bliss T. V., Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**(2): 331-356.

Bonci A., Borgland S. (2009) Role of orexin/hypocretin and CRF in the formation of drug-dependent synaptic plasticity in the mesolimbic system. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**: 107-111.

Bonci A., Malenka R. C. (1999) Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **19**(10): 3723-3730.

Borgland S. L., Taha S. A., Sarti F., Fields H. L., Bonci A. (2006) Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* **49**(4): 589-601.

Braitenberg V., Schüz A. (1998). *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity*, 2nd edn. Springer: Berlin.

Brodie M. S., Shefner S. A., Dunwiddie T. V. (1990) Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res* **508**(1): 65-69.

Brown M. T., Bellone C., Mameli M., Labouebe G., Bocklisch C., Balland B., Dahan L., Lujan R., Deisseroth K., Luscher C. (2010) Drug-driven AMPA receptor redistribution mimicked by selective dopamine neuron stimulation. *PLoS one* **5**(12): e15870.

Burnashev N., Khodorova A., Jonas P., Helm P. J., Wisden W., Monyer H., Seeburg P. H., Sakmann B. (1992) Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* **256**(5063): 1566-1570.

Cadoni C., Pisanu A., Solinas M., Acquas E., Di Chiara G. (2001) Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl)* **158**(3): 259-266.

Cador M., Bjiyou Y., Cailhol S., Stinus L. (1999) D-amphetamine-induced behavioral sensitization: implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation. *Neuroscience* **94**(3): 705-721.

Calabresi P., Maj R., Pisani A., Mercuri N. B., Bernardi G. (1992) Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* **12**(11): 4224-4233.

Cameron D. L., Wessendorf M. W., Williams J. T. (1997) A subset of ventral tegmental area neurons is inhibited by dopamine, 5-hydroxytryptamine and opioids. *Neuroscience* **77**(1): 155-166.

Carboni E., Spieleswoy C., Vacca C., Nosten-Bertrand M., Giros B., Di Chiara G. (2001) Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. *J Neurosci* **21**(9): RC141: 141-144.

Carlezon W. A., Jr., Thome J., Olson V. G., Lane-Ladd S. B., Brodtkin E. S., Hiroi N., Duman R. S., Neve R. L., Nestler E. J. (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* **282**(5397): 2272-2275.

Carlson G., Wang Y., Alger B. E. (2002) Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* **5**(8): 723-724.

Carlsson A., Lindqvist M., Magnusson T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* **180**(4596): 1200.

Carlsson A., Lindqvist M., Magnusson T., Waldeck B. (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* **127**(3296): 471.

Carraway R., Leeman S. E. (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *The Journal of biological chemistry* **248**(19): 6854-6861.

Chalon P., Vita N., Kaghad M., Guillemot M., Bonnin J., Delpech B., Le Fur G., Ferrara P., Caput D. (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS letters* **386**(2-3): 91-94.

Cheer J. F., Marsden C. A., Kendall D. A., Mason R. (2000) Lack of response suppression follows repeated ventral tegmental cannabinoid administration: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* **99**(4): 661-667.

Cheer J. F., Wassum K. M., Sombers L. A., Heien M. L., Ariansen J. L., Aragona B. J., Phillips P. E., Wightman R. M. (2007) Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *J Neurosci* **27**(4): 791-795.

Chen B. T., Bowers M. S., Martin M., Hopf F. W., Guillory A. M., Carelli R. M., Chou J. K., Bonci A. (2008) Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**(2): 288-297.

Chen B. T., Hopf F. W., Bonci A. (2010) Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Ann N Y Acad Sci* **1187**: 129-139.

Chevalyere V., Takahashi K. A., Castillo P. E. (2006) Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*.

Chittajallu R., Braithwaite S. P., Clarke V. R., Henley J. M. (1999) Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* **20**(1): 26-35.

Choi S., Lovinger D. M. (1997a) Decreased frequency but not amplitude of quantal synaptic responses associated with expression of corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* **17**(21): 8613-8620.

Choi S., Lovinger D. M. (1997b) Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2665-2670.

Collingridge G. L., Kehl S. J., McLennan H. (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* **334**: 33-46.

Conn P. J., Pin J. P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* **37**: 205-237.

Cornwall J., Cooper J. D., Phillipson O. T. (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain research bulletin* **25**(2): 271-284.

Dackis C. A., Gold M. S. (1985) New concepts in cocaine addiction: the dopamine depletion hypothesis. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **9**(3): 469-477.

Dahlstrom A., Fuxe K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**(7): 398-399.

Dal Bo G., St-Gelais F., Danik M., Williams S., Cotton M., Trudeau L. E. (2004) Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J Neurochem* **88**(6): 1398-1405.

Dana C., Vial M., Leonard K., Beauguard A., Kitabgi P., Vincent J. P., Rostene W., Beaudet A. (1989) Electron microscopic localization of neurotensin binding sites in the midbrain tegmentum of the rat. I. Ventral tegmental area and the interfascicular nucleus. *J Neurosci* **9**(7): 2247-2257.

Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* **65**(1): 1-105.

De Petrocellis L., Cascio M. G., Di Marzo V. (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British journal of pharmacology* **141**(5): 765-774.

De Vries T. J., Homberg J. R., Binnekade R., Raaso H., Schoffelmeer A. N. (2003) Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **168**(1-2): 164-169.

De Vries T. J., Shaham Y., Homberg J. R., Crombag H., Schuurman K., Dieben J., Vanderschuren L. J., Schoffelmeer A. N. (2001) A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nature medicine* **7**(10): 1151-1154.

Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**(5090): 1946-1949.

Dinh T. P., Freund T. F., Piomelli D. (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chemistry and physics of lipids* **121**(1-2): 149-158.

El Mestikawy S., Wallen-Mackenzie A., Fortin G. M., Descarries L., Trudeau L. E. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature reviews Neuroscience* **12**(4): 204-216.

Engblom D., Bilbao A., Sanchis-Segura C., Dahan L., Perreau-Lenz S., Balland B., Parkitna J. R., Lujan R., Halbout B., Mameli M., Parlato R., Sprengel R., Luscher C., Schutz G., Spanagel R. (2008) Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron* **59**(3): 497-508.

Enoch M. A. (2008) The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **90**(1): 95-104.

Falck B., Hillarp N. A., Thieme G., Torp A. (1962) Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **10**: 348-354.

Fantegrossi W. E., Ko M. C., Woods J. H., Richelson E. (2005) Antinociceptive, hypothermic, hypotensive, and reinforcing effects of a novel neurotensin receptor agonist, NT69L, in rhesus monkeys. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **80**(2): 341-349.

Farkas R. H., Chien P. Y., Nakajima S., Nakajima Y. (1996) Properties of a slow nonselective cation conductance modulated by neurotensin and other neurotransmitters in midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* **76**(3): 1968-1981.

Fawaz C. S., Martel P., Leo D., Trudeau L. E. (2009) Presynaptic action of neurotensin on dopamine release through inhibition of D(2) receptor function. *BMC neuroscience* **10**: 96.

Ferraro L., Antonelli T., O'Connor W. T., Fuxe K., Soubrie P., Tanganelli S. (1998) The striatal neurotensin receptor modulates striatal and pallidal glutamate and GABA release: functional evidence for a pallidal glutamate-GABA interaction via the pallidal-subthalamic nucleus loop. *J Neurosci* **18**(17): 6977-6989.

Ferraro L., Tanganelli S., O'Connor W. T., Bianchi C., Ungerstedt U., Fuxe K. (1995) Neurotensin increases endogenous glutamate release in the neostriatum of the awake rat. *Synapse* **20**(4): 362-364.

Ferraro L., Tomasini M. C., Fernandez M., Bebe B. W., O'Connor W. T., Fuxe K., Glennon J. C., Tanganelli S., Antonelli T. (2001) Nigral neurotensin receptor regulation of nigral glutamate and nigroventral thalamic GABA transmission: a dual-probe microdialysis study in intact conscious rat brain. *Neuroscience* **102**(1): 113-120.

Ferraro L., Tomasini M. C., Siniscalchi A., Fuxe K., Tanganelli S., Antonelli T. (2000) Neurotensin increases endogenous glutamate release in rat cortical slices. *Life Sci* **66**(10): 927-936.

Filip M., Golda A., Zaniewska M., McCreary A. C., Nowak E., Kolasiewicz W., Przegalinski E. (2006) Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. *Pharmacological reports : PR* **58**(6): 806-819.

Foldy C., Lee S. Y., Szabadics J., Neu A., Soltesz I. (2007) Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystokinin. *Nat Neurosci* **10**(9): 1128-1130.

Frandsen A., Schousboe A. (1990) Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **8**(2): 209-216.

Fremeau R. T., Jr., Burman J., Qureshi T., Tran C. H., Proctor J., Johnson J., Zhang H., Sulzer D., Copenhagen D. R., Storm-Mathisen J., Reimer R. J., Chaudhry F. A., Edwards R. H. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14488-14493.

French E. D. (1997) delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. *Neurosci Lett* **226**(3): 159-162.

French E. D., Dillon K., Wu X. (1997) Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* **8**(3): 649-652.

Freund T. F., Katona I., Piomelli D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews* **83**(3): 1017-1066.

Furukawa H., Singh S. K., Mancusso R., Gouaux E. (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**(7065): 185-192.

Geisler S., Derst C., Veh R. W., Zahm D. S. (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* **27**(21): 5730-5743.

Geisler S., Zahm D. S. (2006) Neurotensin afferents of the ventral tegmental area in the rat: [1] re-examination of their origins and [2] responses to acute psychostimulant and antipsychotic drug administration. *Eur J Neurosci* **24**(1): 116-134.

Gerdeman G. L., Ronesi J., Lovinger D. M. (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* **5**(5): 446-451.

Gessa G. L., Melis M., Muntoni A. L., Diana M. (1998) Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *European journal of pharmacology* **341**(1): 39-44.

Gessa G. L., Muntoni F., Collu M., Vargiu L., Mereu G. (1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* **348**(1): 201-203.

Giros B., Jaber M., Jones S. R., Wightman R. M., Caron M. G. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**(6566): 606-612.

Giuffrida A., Parsons L. H., Kerr T. M., Rodriguez de Fonseca F., Navarro M., Piomelli D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* **2**(4): 358-363.

Glass M. J., Lane D. A., Colago E. E., Chan J., Schlussman S. D., Zhou Y., Kreek M. J., Pickel V. M. (2008) Chronic administration of morphine is associated with a decrease in surface AMPA GluR1 receptor subunit in dopamine D1 receptor expressing neurons in the shell and non-D1 receptor expressing neurons in the core of the rat nucleus accumbens. *Experimental neurology* **210**(2): 750-761.

Glimcher P. W., Giovino A. A., Hoebel B. G. (1987) Neurotensin self-injection in the ventral tegmental area. *Brain Res* **403**(1): 147-150.

Glimcher P. W., Margolin D. H., Giovino A. A., Hoebel B. G. (1984) Neurotensin: a new 'reward peptide'. *Brain Res* **291**(1): 119-124.

Gras C., Herzog E., Bellenchi G. C., Bernard V., Ravassard P., Pohl M., Gasnier B., Giros B., El Mestikawy S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* **22**(13): 5442-5451.

Grenhoff J., Aston-Jones G., Svensson T. H. (1986) Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand* **128**(3): 351-358.

Grimm J. W., Hope B. T., Wise R. A., Shaham Y. (2001) Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* **412**(6843): 141-142.

Groc L., Choquet D. (2006) AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell and tissue research* **326**(2): 423-438.

Gyombolai P., Pap D., Turu G., Catt K. J., Bagdy G., Hunyady L. (2011) Regulation of endocannabinoid release by G proteins: A paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Molecular and cellular endocrinology*.

Haj-Dahmane S., Shen R. Y. (2005) The wake-promoting peptide orexin-B inhibits glutamatergic transmission to dorsal raphe nucleus serotonin neurons through retrograde endocannabinoid signaling. *J Neurosci* **25**(4): 896-905.

Haj-Dahmane S., Shen R. Y. (2010) Regulation of the Plasticity of Glutamate Synapses by Endocannabinoids and Cyclic-AMP/Protein Kinase A Pathway in Midbrain Dopamine Neurons. *J Physiol*.

Harris G. C., Aston-Jones G. (2003) Critical role for ventral tegmental glutamate in preference for a cocaine-conditioned environment. *Neuropsychopharmacology* **28**(1): 73-76.

Harris G. C., Wimmer M., Byrne R., Aston-Jones G. (2004) Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine. *Neuroscience* **129**(3): 841-847.

Hashimotodani Y., Ohno-Shosaku T., Kano M. (2007) Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **13**(2): 127-137.

Hayashi Y., Shi S. H., Esteban J. A., Piccini A., Poncer J. C., Malinow R. (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* **287**(5461): 2262-2267.

Hebb D. O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory* Wiley: New York, , xix, 335 p.pp.

Hemmings H. C., Jr., Greengard P., Tung H. Y., Cohen P. (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **310**(5977): 503-505.

Herkenham M., Lynn A. B., Johnson M. R., Melvin L. S., de Costa B. R., Rice K. C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* **11**(2): 563-583.

Hermans E., Maloteaux J. M., Octave J. N. (1992) Phospholipase C activation by neurotensin and neuromedin N in Chinese hamster ovary cells expressing the rat neurotensin receptor. *Brain research Molecular brain research* **15**(3-4): 332-338.

Herzog E., Bellenchi G. C., Gras C., Bernard V., Ravassard P., Bedet C., Gasnier B., Giros B., El Mestikawy S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* **21**(22): RC181.

Hirling H. (2009) Endosomal trafficking of AMPA-type glutamate receptors. *Neuroscience* **158**(1): 36-44.

Hisano S., Hoshi K., Ikeda Y., Maruyama D., Kanemoto M., Ichijo H., Kojima I., Takeda J., Nogami H. (2000) Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain research Molecular brain research* **83**(1-2): 34-43.

Hökfelt T., Everitt B. J., Theodorsson-Norheim E., Goldstein M. (1984a) Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *The Journal of comparative neurology* **222**(4): 543-559.

Hökfelt T., Smith C. B., Norell G., Peters A., Crane A., Goldstein M., Brownstein M., Sokoloff L. (1984b) Attempts to combine 2-deoxyglucose autoradiography and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Neuroscience* **13**(2): 495-512.

Hollmann M., Hartley M., Heinemann S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**(5007): 851-853.

Howlett A. C., Breivogel C. S., Childers S. R., Deadwyler S. A., Hampson R. E., Porrino L. J. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 345-358.

Hyman S. E., Malenka R. C. (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature reviews Neuroscience* **2**(10): 695-703.

Isaac J. T., Nicoll R. A., Malenka R. C. (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* **15**(2): 427-434.

Jiang Z. G., Pessia M., North R. A. (1994) Neurotensin excitation of rat ventral tegmental neurones. *J Physiol* **474**(1): 119-129.

Johnson S. W., North R. A. (1992a) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* **12**(2): 483-488.

Johnson S. W., North R. A. (1992b) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* **450**: 455-468.

Jomphe C., Bourque M. J., Fortin G. D., St-Gelais F., Okano H., Kobayashi K., Trudeau L. E. (2005) Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J Neurosci Methods* **146**(1): 1-12.

Jones S., Kauer J. A. (1999) Amphetamine depresses excitatory synaptic transmission via serotonin receptors in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **19**(22): 9780-9787.

Kalivas P. W., Alesdatter J. E. (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**(1): 486-495.

Kalivas P. W., Burgess S. K., Nemeroff C. B., Prange A. J., Jr. (1983) Behavioral and neurochemical effects of neurotensin microinjection into the ventral tegmental area of the rat. *Neuroscience* **8**(3): 495-505.

Kalivas P. W., Duffy P. (1990) Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **10**(9): 2940-2949.

Kalivas P. W., Lalumiere R. T., Knackstedt L., Shen H. (2009) Glutamate transmission in addiction. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**: 169-173.

Kalivas P. W., Nemeroff C. B., Prange A. J., Jr. (1981) Increase in spontaneous motor activity following infusion of neurotensin into the ventral tegmental area. *Brain Res* **229**(2): 525-529.

Karler R., Calder L. D., Chaudhry I. A., Turkanis S. A. (1989) Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci* **45**(7): 599-606.

Kim S. J., Linden D. J. (2007) Ubiquitous plasticity and memory storage. *Neuron* **56**(4): 582-592.

Kislauskis E., Bullock B., McNeil S., Dobner P. R. (1988) The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *The Journal of biological chemistry* **263**(10): 4963-4968.

Kitabgi P., De Nadai F., Cuber J. C., Dubuc I., Nouel D., Costentin J. (1990) Calcium-dependent release of neuromedin N and neurotensin from mouse hypothalamus. *Neuropeptides* **15**(2): 111-114.

Kleckner N. W., Dingledine R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241**(4867): 835-837.

Koob G. F., Le Moal M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**(2): 97-129.

Koob G. F., Le Moal M. (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci* **8**(11): 1442-1444.

Koob G. F., Le Moal M. (2008a) Addiction and the brain antireward system. *Annual review of psychology* **59**: 29-53.

Koob G. F., Le Moal M. (2008b) Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **363**(1507): 3113-3123.

Kortleven C., Fasano C., Thibault D., Lacaille J. C., Trudeau L. E. (2011) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits long-term potentiation of glutamatergic synapses onto ventral tegmental area dopamine neurons in mice. *Eur J Neurosci* **33**(10): 1751-1760.

Kourrich S., Rothwell P. E., Klug J. R., Thomas M. J. (2007) Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **27**(30): 7921-7928.

Lamarque S., Taghzouti K., Simon H. (2001) Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol enhances the locomotor response to amphetamine and heroin. Implications for vulnerability to drug addiction. *Neuropharmacology* **41**(1): 118-129.

Lauri S. E., Palmer M., Segerstrale M., Vesikansa A., Taira T., Collingridge G. L. (2007) Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus. *Neuropharmacology* **52**(1): 1-11.

Lee H. K. (2006) Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacology & therapeutics* **112**(3): 810-832.

Legault M., Congar P., Michel F. J., Trudeau L. E. (2002) Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* **111**(1): 177-187.

Lepee-Lorgeoux I., Betancur C., Rostene W., Pelaprat D. (1999) Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain research Developmental brain research* **113**(1-2): 115-131.

Lesscher H. M., Hoogveld E., Burbach J. P., van Ree J. M., Gerrits M. A. (2005) Endogenous cannabinoids are not involved in cocaine reinforcement and development of cocaine-induced behavioural sensitization. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* **15**(1): 31-37.

Liao D., Hessler N. A., Malinow R. (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* **375**(6530): 400-404.

Lindvall O., Björklund A. (1974) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* **412**: 1-48.

Lindvall O., Björklund A. (1974a) The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry* **39**(2): 97-127.

Lindvall O., Björklund A. (1974b) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* **412**: 1-48.

Lindvall O., Bjorklund A., Divac I. (1977) Organization of mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex and septum. *Advances in biochemical psychopharmacology* **16**: 39-46.

Lindvall O., Björklund A., Skagerberg G. (1984) Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* **306**(1-2): 19-30.

Liu Q. S., Pu L., Poo M. M. (2005) Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* **437**(7061): 1027-1031.

Llano I., Leresche N., Marty A. (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* **6**(4): 565-574.

Lovinger D. M., Tyler E. C., Merritt A. (1993) Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J Neurophysiol* **70**(5): 1937-1949.

Lu W., Man H., Ju W., Trimble W. S., MacDonald J. F., Wang Y. T. (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **29**(1): 243-254.

Luo Y., Good C. H., Diaz-Ruiz O., Zhang Y., Hoffman A. F., Shan L., Kuang S. Y., Malik N., Chefer V. I., Tomac A. C., Lupica C. R., Backman C. M. (2010) NMDA receptors on non-dopaminergic neurons in the VTA support cocaine sensitization. *PLoS one* **5**(8): e12141.

Lupica C. R., Riegel A. C. (2005) Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology* **48**(8): 1105-1116.

Luscher C., Ungless M. A. (2006) The mechanistic classification of addictive drugs. *PLoS medicine* **3**(11): e437.

Luu P., Malenka R. C. (2008) Spike timing-dependent long-term potentiation in ventral tegmental area dopamine cells requires PKC. *J Neurophysiol* **100**(1): 533-538.

Lynch G., Larson J., Kelso S., Barrionuevo G., Schottler F. (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* **305**(5936): 719-721.

Lynch M. A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews* **84**(1): 87-136.

Maejima T., Hashimoto K., Yoshida T., Aiba A., Kano M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* **31**(3): 463-475.

Malenka R. C., Bear M. F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**(1): 5-21.

Mameli M., Halbout B., Creton C., Engblom D., Parkitna J. R., Spanagel R., Luscher C. (2009) Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat Neurosci* **12**(8): 1036-1041.

Margolis E. B., Coker A. R., Driscoll J. R., Lemaitre A. I., Fields H. L. (2010) Reliability in the identification of midbrain dopamine neurons. *PloS one* **5**(12): e15222.

Margolis E. B., Lock H., Hjelmstad G. O., Fields H. L. (2006) The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol* **577**(Pt 3): 907-924.

Martin M., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R., Valverde O. (2000) Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci* **12**(11): 4038-4046.

Martinez J. L., Jr., Derrick B. E. (1996) Long-term potentiation and learning. *Annual review of psychology* **47**: 173-203.

Masson J., Darmon M., Conjard A., Chuhma N., Ropert N., Thoby-Brisson M., Foutz A. S., Parrot S., Miller G. M., Jorisch R., Polan J., Hamon M., Hen R., Rayport S. (2006) Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J Neurosci* **26**(17): 4660-4671.

Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**(6284): 561-564.

Matsushita N., Okada H., Yasoshima Y., Takahashi K., Kiuchi K., Kobayashi K. (2002) Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem* **82**(2): 295-304.

Matyas F., Urban G. M., Watanabe M., Mackie K., Zimmer A., Freund T. F., Katona I. (2008) Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* **54**(1): 95-107.

Mazella J., Botto J. M., Guillemare E., Coppola T., Sarret P., Vincent J. P. (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* **16**(18): 5613-5620.

Mazella J., Vincent J. P. (2006) Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides* **27**(10): 2469-2475.

Mazella J., Zsurger N., Navarro V., Chabry J., Kaghad M., Caput D., Ferrara P., Vita N., Gully D., Maffrand J. P., Vincent J. P. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* **273**(41): 26273-26276.

McKenna M. C. (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *Journal of neuroscience research* **85**(15): 3347-3358.

Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R., et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology* **50**(1): 83-90.

Mechoulam R., Gaoni Y. (1967a) The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron letters* **12**: 1109-1111.

Mechoulam R., Gaoni Y. (1967b) Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe Progress in the chemistry of organic natural products Progres dans la chimie des substances organiques naturelles* **25**: 175-213.

Melis M., Perra S., Muntoni A. L., Pillolla G., Lutz B., Marsicano G., Di Marzo V., Gessa G. L., Pistis M. (2004a) Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci* **24**(47): 10707-10715.

Melis M., Pistis M., Perra S., Muntoni A. L., Pillolla G., Gessa G. L. (2004b) Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci* **24**(1): 53-62.

Mendez J. A., Bourque M. J., Dal Bo G., Bourdeau M. L., Danik M., Williams S., Lacaille J. C., Trudeau L. E. (2008) Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci* **28**(25): 6309-6318.

Moldrich G., Wenger T. (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* **21**(11): 1735-1742.

Monaghan D. T., Bridges R. J., Cotman C. W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology* **29**: 365-402.

Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**(6441): 61-65.

Navarrete M., Araque A. (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* **68**(1): 113-126.

Nemeroff C. B., Hernandez D. E., Luttinger D., Kalivas P. W., Prange A. J., Jr. (1982) Interactions of neurotensin with brain dopamine systems. *Ann N Y Acad Sci* **400**: 330-344.

Nestler E. J. (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 24-32.

Ni B., Rosteck P. R., Jr., Nadi N. S., Paul S. M. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12): 5607-5611.

Niehaus J. L., Murali M., Kauer J. A. (2010) Drugs of abuse and stress impair LTP at inhibitory synapses in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* **32**(1): 108-117.

Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**(5950): 462-465.

Nugent F. S., Hwong A. R., Udaka Y., Kauer J. A. (2008) High-frequency afferent stimulation induces long-term potentiation of field potentials in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* **33**(7): 1704-1712.

Nugent F. S., Kauer J. A. (2008) LTP of GABAergic synapses in the ventral tegmental area and beyond. *J Physiol* **586**(6): 1487-1493.

Nugent F. S., Penick E. C., Kauer J. A. (2007) Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature* **446**(7139): 1086-1090.

Overton P. G., Richards C. D., Berry M. S., Clark D. (1999) Long-term potentiation at excitatory amino acid synapses on midbrain dopamine neurons. *Neuroreport* **10**(2): 221-226.

Pan B., Hillard C. J., Liu Q. S. (2008a) D2 dopamine receptor activation facilitates endocannabinoid-mediated long-term synaptic depression of GABAergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons via cAMP-protein kinase A signaling. *J Neurosci* **28**(52): 14018-14030.

Pan B., Hillard C. J., Liu Q. S. (2008b) Endocannabinoid signaling mediates cocaine-induced inhibitory synaptic plasticity in midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* **28**(6): 1385-1397.

Panayi F., Colussi-Mas J., Lambas-Senas L., Renaud B., Scarna H., Berod A. (2005) Endogenous neurotensin in the ventral tegmental area contributes to amphetamine behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology* **30**(5): 871-879.

Panayi F., Dorso E., Lambas-Senas L., Renaud B., Scarna H., Berod A. (2002) Chronic blockade of neurotensin receptors strongly reduces sensitized, but not acute, behavioral response to D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology* **26**(1): 64-74.

Pare D. (2004) Presynaptic induction and expression of NMDA-dependent LTP. *Trends in neurosciences* **27**(8): 440-441.

Pert C. B., Snyder S. H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**(77): 1011-1014.

Petersen C. M., Nielsen M. S., Nykjaer A., Jacobsen L., Tommerup N., Rasmussen H. H., Roigaard H., Gliemann J., Madsen P., Moestrup S. K. (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry* **272**(6): 3599-3605.

Pierce R. C., Bell K., Duffy P., Kalivas P. W. (1996) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* **16**(4): 1550-1560.

Pinnock R. D. (1985) Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res* **338**(1): 151-154.

Piomelli D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews Neuroscience* **4**(11): 873-884.

Pitler T. A., Alger B. E. (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* **12**(10): 4122-4132.

Quirion R. (1983) Interactions between neurotensin and dopamine in the brain: an overview. *Peptides* **4**(5): 609-615.

Quirion R., Chiueh C. C., Everist H. D., Pert A. (1985) Comparative localization of neurotensin receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic terminals. *Brain Res* **327**(1-2): 385-389.

Remaury A., Vita N., Gendreau S., Jung M., Arnone M., Poncelet M., Culouscou J. M., Le Fur G., Soubrie P., Caput D., Shire D., Kopf M., Ferrara P. (2002) Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res* **953**(1-2): 63-72.

Richards J. K., Simms J. A., Steensland P., Taha S. A., Borgland S. L., Bonci A., Bartlett S. E. (2008) Inhibition of orexin-1/hypocretin-1 receptors inhibits yohimbine-induced reinstatement of ethanol and sucrose seeking in Long-Evans rats. *Psychopharmacology (Berl)* **199**(1): 109-117.

Riegel A. C., Lupica C. R. (2004) Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **24**(49): 11070-11078.

Robbe D., Bockaert J., Manzoni O. J. (2002) Metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent long-term depression in the nucleus accumbens is blocked in morphine withdrawn mice. *Eur J Neurosci* **16**(11): 2231-2235.

Robinson T. E., Berridge K. C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**(3): 247-291.

Robinson T. E., Berridge K. C. (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* **95 Suppl 2**: S91-117.

Robinson T. E., Berridge K. C. (2008) Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **363**(1507): 3137-3146.

Robinson T. E., Gorny G., Mitton E., Kolb B. (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* **39**(3): 257-266.

Robinson T. E., Kolb B. (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* **17**(21): 8491-8497.

Robinson T. E., Kolb B. (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* **11**(5): 1598-1604.

Rocha B. A., Fumagalli F., Gainetdinov R. R., Jones S. R., Ator R., Giros B., Miller G. W., Caron M. G. (1998) Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* **1**(2): 132-137.

Romppe P., Perron S. (2000) Evidence for a role of endogenous neurotensin in the initiation of amphetamine sensitization. *Neuropharmacology* **39**(10): 1880-1892.

Rompere P. P. (1997) Repeated activation of neurotensin receptors sensitizes to the stimulant effect of amphetamine. *European journal of pharmacology* **328**(2-3): 131-134.

Rostene W., Azzi M., Boudin H., Lepee I., Souaze F., Mendez-Ubach M., Betancur C., Gully D. (1997) Use of nonpeptide antagonists to explore the physiological roles of neurotensin. Focus on brain neurotensin/dopamine interactions. *Ann N Y Acad Sci* **814**: 125-141.

Russo S. J., Dietz D. M., Dumitriu D., Morrison J. H., Malenka R. C., Nestler E. J. (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in neurosciences* **33**(6): 267-276.

Saal D., Dong Y., Bonci A., Malenka R. C. (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* **37**(4): 577-582.

Salamone J. D., Correa M., Mingote S. M., Weber S. M. (2005) Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Current opinion in pharmacology* **5**(1): 34-41.

Sarret P., Perron A., Stroh T., Beaudet A. (2003) Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* **461**(4): 520-538.

Satoh K., Fibiger H. C. (1986) Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. *The Journal of comparative neurology* **253**(3): 277-302.

Sawamoto K., Nakao N., Kobayashi K., Matsushita N., Takahashi H., Kakishita K., Yamamoto A., Yoshizaki T., Terashima T., Murakami F., Itakura T., Okano H. (2001) Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6423-6428.

Schafer M. K., Varoqui H., Defamie N., Weihe E., Erickson J. D. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *The Journal of biological chemistry* **277**(52): 50734-50748.

Schenk S., Partridge B. (1997) Effects of acute and repeated administration of N-methyl-D-aspartate (NMDA) into the ventral tegmental area: locomotor activating effects of NMDA and cocaine. *Brain Res* **769**(2): 225-232.

Schilstrom B., Yaka R., Argilli E., Suvarna N., Schumann J., Chen B. T., Carman M., Singh V., Mailliard W. S., Ron D., Bonci A. (2006) Cocaine enhances NMDA receptor-mediated currents in ventral tegmental area cells via dopamine D5 receptor-dependent redistribution of NMDA receptors. *J Neurosci* **26**(33): 8549-8558.

Schlicker E., Kathmann M. (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**(11): 565-572.

Scoville W. B., Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **20**(1): 11-21.

Sigurdsson T., Doyere V., Cain C. K., LeDoux J. E. (2007) Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* **52**(1): 215-227.

Singla S., Kreitzer A. C., Malenka R. C. (2007) Mechanisms for synapse specificity during striatal long-term depression. *J Neurosci* **27**(19): 5260-5264.

Slanina K. A., Roberto M., Schweitzer P. (2005) Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology* **49**(5): 660-668.

Smart T. G. (1997) Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation. *Current opinion in neurobiology* **7**(3): 358-367.

Song I., Huganir R. L. (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* **25**(11): 578-588.

Sora I., Wichems C., Takahashi N., Li X. F., Zeng Z., Revay R., Lesch K. P., Murphy D. L., Uhl G. R. (1998) Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7699-7704.

Soria G., Mendizabal V., Tourino C., Robledo P., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R., Valverde O. (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* **30**(9): 1670-1680.

St-Gelais F., Jomphe C., Trudeau L. E. (2006) The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* **31**(4): 229-245.

St-Gelais F., Legault M., Bourque M. J., Rompre P. P., Trudeau L. E. (2004) Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* **24**(10): 2566-2574.

Steffensen S. C., Svingos A. L., Pickel V. M., Henriksen S. J. (1998) Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **18**(19): 8003-8015.

Stella N., Schweitzer P., Piomelli D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**(6644): 773-778.

Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications* **215**(1): 89-97.

Sulzer D., Chen T. K., Lau Y. Y., Kristensen H., Rayport S., Ewing A. (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci* **15**(5 Pt 2): 4102-4108.

Szabo B., Siemes S., Wallmichrath I. (2002) Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci* **15**(12): 2057-2061.

Takahashi K. A., Linden D. J. (2000) Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* **83**(3): 1167-1180.

Takahashi T., Forsythe I. D., Tsujimoto T., Barnes-Davies M., Onodera K. (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* **274**(5287): 594-597.

Tanaka K., Masu M., Nakanishi S. (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* **4**(6): 847-854.

Tanganelli S., O'Connor W. T., Ferraro L., Bianchi C., Beani L., Ungerstedt U., Fuxe K. (1994) Facilitation of GABA release by neurotensin is associated with a reduction of dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* **60**(3): 649-657.

Terranova J. P., Michaud J. C., Le Fur G., Soubrie P. (1995) Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **352**(5): 576-579.

Terwilliger R. Z., Beitner-Johnson D., Sevarino K. A., Crain S. M., Nestler E. J. (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res* **548**(1-2): 100-110.

Thibault D., Albert P. R., Pineyro G., Trudeau L. E. (2011) Neurotensin triggers dopamine D2 receptor desensitization through a protein kinase C and beta-arrestin1-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* **286**(11): 9174-9184.

Thomas M. J., Beurrier C., Bonci A., Malenka R. C. (2001) Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci* **4**(12): 1217-1223.

Trudeau L. E. (2000) Neurotensin regulates intracellular calcium in ventral tegmental area astrocytes: evidence for the involvement of multiple receptors. *Neuroscience* **97**(2): 293-302.

Uhl G. R., Goodman R. R., Snyder S. H. (1979) Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res* **167**(1): 77-91.

Ungerstedt U. (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* **367**: 1-48.

Ungless M. A., Whistler J. L., Malenka R. C., Bonci A. (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* **411**(6837): 583-587.

Vezina P., Queen A. L. (2000) Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3): 184-191.

Villeneuve P., Feliciangeli S., Croissandeau G., Seidah N. G., Mbikay M., Kitabgi P., Beaudet A. (2002) Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J Neurochem* **82**(4): 783-793.

Villeneuve P., Lafortune L., Seidah N. G., Kitabgi P., Beaudet A. (2000a) Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain. *The Journal of comparative neurology* **424**(3): 461-475.

Villeneuve P., Seidah N. G., Beaudet A. (2000b) Immunohistochemical evidence for the implication of PC1 in the processing of proneurotensin in rat brain. *Neuroreport* **11**(16): 3443-3447.

Vincent J. P., Mazella J., Kitabgi P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* **20**(7): 302-309.

Vita N., Laurent P., Lefort S., Chalon P., Dumont X., Kaghad M., Gully D., Le Fur G., Ferrara P., Caput D. (1993) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS letters* **317**(1-2): 139-142.

Walker N., Lepee-Lorgeoux I., Fournier J., Betancur C., Rostene W., Ferrara P., Caput D. (1998) Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive

neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain research Molecular brain research* **57**(2): 193-200.

Wanat M. J., Hopf F. W., Stuber G. D., Phillips P. E., Bonci A. (2008) Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of Ih. *J Physiol* **586**(8): 2157-2170.

Watkins J. C., Davies J., Evans R. H., Francis A. A., Jones A. W. (1981) Pharmacology of receptors for excitatory amino acids. *Advances in biochemical psychopharmacology* **27**: 263-273.

Wise R. A. (1988) The neurobiology of craving: implications for the understanding and treatment of addiction. *Journal of abnormal psychology* **97**(2): 118-132.

Wise R. A., Bozarth M. A. (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological review* **94**(4): 469-492.

Wiskerke J., Pattij T., Schoffelmeer A. N., De Vries T. J. (2008) The role of CB1 receptors in psychostimulant addiction. *Addiction biology* **13**(2): 225-238.

Wolf M. E. (2006). Addiction. In: Siegel GJ (ed). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 7th edn. Elsevier Academic Press: New York, pp 911-926.

Woll P. J., Rozengurt E. (1989) Multiple neuropeptides mobilise calcium in small cell lung cancer: effects of vasopressin, bradykinin, cholecystokinin, galanin and neurotensin. *Biochemical and biophysical research communications* **164**(1): 66-73.

Wu T., Li A., Wang H. L. (1995) Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res* **683**(2): 242-250.

Wu X., French E. D. (2000) Effects of chronic delta9-tetrahydrocannabinol on rat midbrain dopamine neurons: an electrophysiological assessment. *Neuropharmacology* **39**(3): 391-398.

Yamasaki M., Hashimoto K., Kano M. (2006) Miniature synaptic events elicited by presynaptic Ca²⁺ rise are selectively suppressed by cannabinoid receptor activation in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* **26**(1): 86-95.

Ye J. H., Zhang J., Xiao C., Kong J. Q. (2006) Patch-clamp studies in the CNS illustrate a simple new method for obtaining viable neurons in rat brain slices: glycerol replacement of NaCl protects CNS neurons. *J Neurosci Methods* **158**(2): 251-259.

Yin H. H., Adermark L., Lovinger D. M. (2008) Neurotensin reduces glutamatergic transmission in the dorsolateral striatum via retrograde endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* **54**(1): 79-86.

Young W. S., 3rd, Kuhar M. J. (1981) Neurotensin receptor localization by light microscopic autoradiography in rat brain. *Brain Res* **206**(2): 273-285.

Zachariou V., Sgambato-Faure V., Sasaki T., Svenningsson P., Berton O., Fienberg A. A., Nairn A. C., Greengard P., Nestler E. J. (2006) Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology* **31**(3): 555-562.

Zahm D. S., Grosu S., Williams E. A., Qin S., Berod A. (2001) Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience* **104**(3): 841-851.

Zhang W., Linden D. J. (2003) The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nature reviews Neuroscience* **4**(11): 885-900.

Zweifel L. S., Argilli E., Bonci A., Palmiter R. D. (2008) Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron* **59**(3): 486-496.

