

Université de Montréal

Implication de collatérales axonales locales dans la libération de dopamine dans le mésencéphale

Par

Jana Kano

Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en Neurosciences

Novembre 2022

© Jana Kano, 2022

Ce mémoire intitulé

**Implication de collatérales axonales locales dans la libération de dopamine dans le
mésencéphale**

Présenté par

Jana Kano

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Graziella Di Cristo
Président-rapporteur

Louis-Éric Trudeau
Directeur de recherche

Raphaël Trouillon
Membre du jury

Résumé

Les neurones dopaminergiques (DAergiques) libèrent non seulement de la DA à partir de leurs terminaisons axonales, mais également dans le mésencéphale au niveau de la substance noire (SN) et l'aire tegmentaire ventrale (ATV). À cet endroit, un mécanisme de libération somatodendritique (STD) de DA a été proposé et impliquerait des senseurs calciques différents de ceux retrouvés du côté axonal. Au niveau axonal, la synaptotagmine 1 (Syt1) est une protéine essentielle à la libération rapide de DA. Toutefois, des études de notre laboratoire sur des knockout conditionnels (cKO) de Syt1 dans les neurones DA démontrent une diminution substantielle de la libération de DA au niveau axonal, mais aussi dans le mésencéphale.

Une première hypothèse expliquant cette diminution dans le mésencéphale serait que Syt1 est impliquée dans la libération STD. Cependant, nous observons par microscopie à super-résolution que Syt1 ne se retrouve pas dans le compartiment STD des neurones DAergiques. Une autre possibilité serait la présence de collatérales axonales DAergiques dans le mésencéphale. Par imagerie confocale et électronique, nous observons que le mésencéphale contient plusieurs varicosités axonales asynaptiques et quelques varicosités axonales synaptiques. Enfin, nous avons évalué la plasticité des collatérales axonales DAergiques dans un modèle de lésion partielle des neurones DAergiques induite par la 6-OHDA. Malgré la perte de plus de 40% des neurones DA, la libération de DA dans la SN persiste 14 jours après lésion et s'accompagne d'une augmentation de l'expression axonale de Syt1, suggérant qu'un mécanisme de compensation axonale contribue à la résilience de la libération de DA.

Mots-clés : Neurones dopaminergiques, Mésencéphale, Collatérales axonales, Libération somatodendritique, Transmission volumique, 6-hydroxydopamine, Synaptotagmine 1.

Abstract

Dopaminergic (DA) neurons not only exhibit a classic vesicular release from their axons in the striatum, but they also release DA in the midbrain in the substantia nigra (SN) and ventral tegmental area (VTA). In this region, somatodendritic (STD) release occurs and it requires different calcium sensors than those found in the axons. Of interest, synaptotagmin 1 (Syt1) has been shown to be implicated in fast DA release in the axons. However, recent research in our lab shows that in mice with conditional knockout (cKO) of Syt1 in DA neurons, there is a substantial decrease of DA release not only in the striatum, but also in the midbrain.

Our first hypothesis is that Syt1 is directly involved in STD release. With super-resolution microscopy, we concluded that Syt1 is not localized in the STD compartment of DA neurons. This brings us to our second hypothesis, where local DA axon collaterals contribute to DA release in the midbrain. Through confocal and electron microscopy, we observed that the midbrain contains asynaptic varicosities as well as local DA synapses.

In light of these results, we explored the contribution of axonal release to the resilience of SN DA release in a partial 6-OHDA lesion model. We observed that, following a loss of more than 40% of DA neurons, DA release in the SNc persists 14 days after lesion and that this is accompanied by an increase in Syt1 expression in DA axons which suggest that local axonal release is increased to compensate for DA loss.

Keywords : Dopaminergic neurons, Midbrain, Axon collaterals, Somatodendritic release, Volumic transmission, 6-hydroxydopamine, Synaptotagmin 1.

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	7
Liste des figures.....	8
Liste des sigles et abréviations	9
Remerciements	11
Chapitre 1 – Introduction.....	12
1.1. Noyaux et voies	13
1.1.1. Aire tegmentaire ventrale (ATV).....	14
1.1.2. Substance noire.....	17
1.1.3. Hétérogénéité des neurones DAergiques.....	22
1.2. La libération de la dopamine	23
1.2.1. La libération axonale	23
1.2.2. Libération somatodendritique.....	30
1.2.3. Les synaptotagmines.....	37
1.3. La maladie de Parkinson (MP)	42
1.3.1. Vulnérabilité sélective dans la MP	43
1.3.2. L’hypothèse de la mort rétrograde.....	46
Chapitre 2 – Données récentes et objectifs.....	49
Chapitre 3 – Dopamine neuron axon collaterals with axonal-like varicosities are abundant in both the ventral tegmental area and the substantia nigra pars compacta: implications for the detection of somatodendritic dopamine release (Article).....	51

3.1.	Abstract.....	54
3.2.	Introduction	56
3.3.	Results	59
3.3.1.	Syt1 is not detected in the STD compartment of DA neurons	59
3.3.2.	A subset of varicosities in the midbrain are similar in size to striatal terminals	62
3.3.3.	Synaptic and asynaptic DA varicosities innervate the midbrain	68
3.3.4.	STD release is resilient to 6-OHDA lesions	71
3.3.5.	Syt1 expression is increased in axonal varicosities in the SNc after the lesion	75
3.4.	Discussion.....	78
3.5.	Experimental procedures	84
3.6.	References	93
3.7.	Supplementary figure	117
Chapitre 4 – Discussion et conclusion.....		118
Bibliographie		123
Annexe - Développement d'une technique de détection de la libération spontanée		147
	Contexte.....	147
	Méthode.....	148
	Résultats.....	150

Liste des tableaux

Table 1: Ultrastructural features of eYFP-labeled axon varicosities in the midbrain	71
---	----

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Représentation des noyaux DAergiques et de leurs projections.	14
Figure 2: Schématisation des zones de relâche dans les varicosités d'axones DAergiques.	22
Figure 3 : Schématisation de la transmission volumique et synaptique de la DA.	29

Article

Figure 1: Syt1 does not colocalize with TH and VMAT2 in the STD compartment.	61
Figure 2: Axons in the midbrain, MFB and striatum all exhibit similar small varicosities.	64
Figure 3: Syt1-positive varicosities are present in the midbrain, MFB and striatum.	65
Figure 4: Decrease of Syt1-positive varicosities in Syt1 ^{-/-} mice in the striatum and the MFB.	67
Figure 5: Synaptic and asynaptic axonal varicosities are found in both the SNc and VTA of mice.	70
Figure 6: STD DA release is more resilient than axonal release in a model of Parkinson's disease related axonal dying-back.	74
Figure 7: Syt1 expression is increased in eYFP-positive axons 2 weeks post-lesion.	77
Figure S1: Primary DA neurons form axonal varicosities along the total length of their axons.	117

Annexe

Figure 1: Fréquence des pics d'intensité fluorescents de GRAB _{DA} en fonction de la drogue perfusée.	153
Figure 2: Propagation du signal à travers différents prolongements.	155

Liste des sigles et abréviations

5-HT: Sérotonine

6-OHDA: 6-hydroxydopamine

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate

ATV: Aire tegmentaire ventrale

BDA: Biotine dextran amine

cKO : *Knock-out* conditionnel

D1R: Récepteur D1

D2R: Récepteur D2

DA: Dopamine

DAT: Transporteur à DA

GPe: Globus pallidus externe

GPi: Globus pallidus interne

LC: Locus coeruleus

MAP2: *Microtubule associated protein 2*

MCC : *Manders' correlation coefficient*

MFB: *Medial forebrain bundle*

MP: Maladie de Parkinson

MPTP: 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MSN: *Medium spiny neurons*

NA: Noradrénaline

NAc: Noyau accumbens

NMDA: N-méthyl-D-aspartique

PCC : Pearson's correlation coefficient

PPTg: noyau pédonculopontin

ROS: Dérivés Réactifs de 'oxygène

RP: *Reserve pool*

RRF: *Retrorubral field*

RRP: *Ready releasable pool*

SNAP-25: *Synaptosomal associated protein-25*

SNARE: Récepteur des protéines SNAP

SNe: Substantia nigra *pars compacta*

SNr: Substantia nigra *pars reticulata*

STN: Noyau sous-thalamique

Syt: Synaptotagmine

TH: Tyrosine hydroxylase

TTX: Tétrodotoxine

VAMP: *Vesicle-associated membrane protein*

VGLUT2: Transporteur vésiculaire à glutamate 2

VMAT2: *Vesicular monoamine transporter 2*

WT : *Wild Type*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Louis-Éric Trudeau, qui a su m'encadrer tout au long de ma maîtrise et de mon stage d'été. Son grand savoir, sa disponibilité et son aide ont contribué à enrichir mes compétences scientifiques.

Je remercie aussi Graziella Di Cristo et Raphaël Trouillon pour avoir accepté de faire partie de mon jury d'évaluation de ce mémoire.

Mes remerciements à tous les membres du laboratoire Trudeau, passés et présents, qui m'ont supporté au quotidien durant ma maîtrise et avec lesquels j'ai partagé de moments mémorables et parfois de frustrations. Merci surtout aux agents de laboratoire, Nicolas Giguère et Marie-Josée Bourque, qui m'ont permis d'œuvrer dans les meilleures conditions possibles grâce à leur conseils judicieux. Marie, je ne sais pas comment j'aurais passé à travers ces dernières années sans tes histoires et anecdotes en quantité infinie qui ont rendu mes journées un peu moins longues.

Je remercie également Martin Parent et les membres de son laboratoire pour leur collaboration et pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leur laboratoire.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui, malgré le fait que ce sujet ne leur est pas familier, m'ont supporté dans tout ce que j'ai entrepris. Je suis particulièrement redevable à Bruce qui m'a supporté tout au long de cette aventure, même durant les moments les plus difficiles.

Chapitre 1 – Introduction

Quelque fois appelée “hormone du bonheur”, la dopamine (DA) est un neurotransmetteur d’un grand intérêt dans le monde de la recherche à cause de son implication dans plusieurs fonctions cérébrales et maladies du cerveau. Cependant, durant les dix premières années suivant sa découverte, la DA n’était considérée que comme un précurseur de l’adrénaline et de la noradrénaline (NA). Grâce aux avancements techniques et aux poussées scientifiques, on reconnaît aujourd’hui son rôle central dans la motivation et le contrôle du mouvement et son implication dans certaines maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson (MP).

Au début des années cinquante, on observe la présence de DA dans divers tissus et ce malgré les limites techniques de détection. Il faudra attendre 1958, pour que le chercheur suédois Arvid Carlsson découvre le rôle physiologique majeur de la DA dans le cerveau, grâce à la spectrophotométrie, permettant de quantifier la DA en mesurant son absorbance, et diverses approches pharmacologiques. En effet, Carlsson observe que l’injection de la réserpine chez les lapins, une drogue qui conduit à la déplétion de réserves de catécholamines, s’accompagne non seulement d’une diminution des niveaux de sérotonine, mais également d’autres catécholamines. Carlsson explore ensuite l’effet de la L-DOPA, un précurseur de la NA. Il observe que l’administration de la L-DOPA permet d’inverser les effets délétères sur la motricité engendrés par la réserpine, non pas à cause d’une augmentation des niveaux de NA, mais plutôt de la DA (Carlsson et al., 1957). Ces résultats légitiment le rôle fonctionnel de la DA dans le cerveau. En parallèle, en 1959, Bertler et Rosengren, du laboratoire Carlsson, ainsi que leur collaborateur au Japon, Isamu Sano, découvrent que la plupart de la DA se retrouve dans le striatum, une région du cerveau qui ne contient que très peu de NA. Sa localisation dans les ganglions de base démontre, pour la première fois, que la DA serait en elle-même un neurotransmetteur.

Ces débuts modestes ne reflètent pas l'ampleur des rôles de la DA dans de nombreuses fonctions incluant la motivation et la cognition. Dans l'espace de seulement quelques années, la DA a pris une place importante dans la recherche et depuis, le nombre d'ouvrages qui étudient la richesse des fonctions de la DA ne fait qu'augmenter en raison de son omniprésence dans le système nerveux. Dans les chapitres suivants, nous explorerons la complexité de ce système et tenterons de clarifier certains principes sur la neurotransmission dopaminergique dans le but de mieux comprendre son importance dans diverses fonctions cérébrales.

1.1. Noyaux et voies

En 1964, Dahlström et Fuxe, utilisant la nouvelle technique d'histofluorescence par la méthode de Falk-Hillarp, décrivent pour la première fois la localisation des noyaux de neurones à catécholamines dans le cerveau de rats (Dahlström & Fuxe, 1964). Par la suite, le développement de méthodes d'immunohistochimie a permis la détection d'enzymes de synthèse des catécholamines, conduisant ainsi à la distinction des neurones contenant ces différents neurotransmetteurs. Parmi eux, la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme clé dans la biosynthèse des catécholamines. Ces approches ont notamment permis de distinguer neuf noyaux à catécholamines dans le cerveau qu'ils ont nommés A1 à A14, du plus caudal au plus rostral. On y retrouve trois noyaux majeurs qui contiennent des neurones DAergiques : A8 pour l'aire rétro-rubrale (RRF), A9 pour la substance noire *pars compacta* (SNc) et A10 pour l'aire tegmentaire ventrale (ATV). Il est important de spécifier ici que la taxonomie A8 à A10 fait uniquement référence aux neurones à DA et que l'ATV, la SNc et le RRF contiennent à la fois les neurones à DA ainsi que les inputs d'autres types de neurones. Les axones qui émergent des

noyaux DAergiques du mésencéphale sont acheminés vers diverses régions du cerveau par le faisceau télencéphalique médian (MFB) pour exercer leurs nombreuses fonctions sur le cerveau.

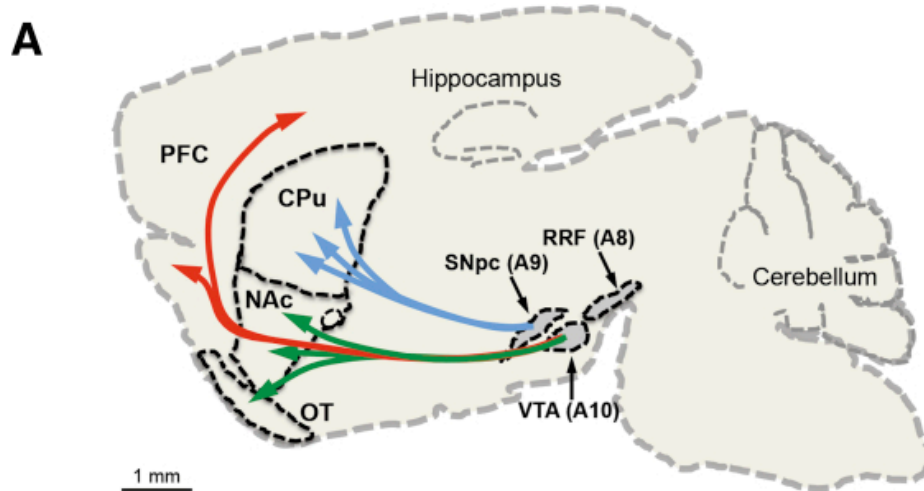


Figure 1: Représentation des noyaux DAergiques et de leurs projections.

Les neurones de la SNc (A9) projettent au striatum dorsal (en bleu), l'ATV (A10) au noyau accumbens (NAc) et au tubercule olfactif (en vert). Source : Luo & Huang, 2016. Reproduction avec permission.

1.1.1. Aire tegmentaire ventrale (ATV)

L'ATV est impliquée dans diverses fonctions cognitives telles que la motivation, la récompense, le renforcement positif et la mémoire. L'ATV est une structure considérée hétérogène, composée majoritairement de neurones DAergiques, et moindrement de neurones GABAergiques et glutamatergiques. Elle est à l'origine de deux voies de projection : la voie mésocorticale et la voie mésolimbique.

1.1.1.1. Voie mésocorticale et mésolimbique

Depuis l'ATV, certains neurones DAergiques projettent au cortex préfrontal pour former la voie mésocorticale. D'autres se dirigent vers la partie ventrale du striatum, nommée noyau accumbens (NAc), pour former la voie mésolimbique. Ces deux voies s'entremêlent et forment la voie mésocorticolimbique. On remarque que les rats apprennent rapidement à s'auto-administrer des stimulations électriques aux neurones DAergiques de l'ATV (Olds & Milner, 1954; Garris et al., 1999), certains se privant même de nourriture pour continuer à recevoir ces stimulations (Stutz et al., 1971). On attribue donc à l'ATV un rôle central dans la motivation. Il s'ensuit que cette voie soit aussi ciblée par les drogues d'abus. En effet, les drogues d'abus augmentent la relâche de DA dans l'ATV et dans les régions ciblées par l'ATV (Di Chiara & Imperato, 1988; Nestler, 2005). Les mécanismes diffèrent d'une drogue à l'autre, mais toutes ont pour effet d'augmenter la quantité de DA disponible dans le milieu extracellulaire du cerveau: les psychostimulants altèrent les mécanismes de recapture de la DA (Kuhr et al., 1985; Ritz et al., 1987), tandis que les opioïdes désinhibent la sécrétion de DA (Johnson & North, 1992; Matsui et al., 2014; Melis et al., 2000). Appuyant un lien entre le système DAergique et les drogues d'abus, plusieurs travaux ont montré que des sujets toxicomanes ont une transmission synaptique de DA altérée (Diana, 2011; Leyton, 2017; Stewart, 2008; Volkow et al., 2009).

1.1.1.2. Voies afférentes

La décharge des neurones de l'ATV est modulée par des afférences provenant de diverses régions du cerveau, tant inhibiteurs qu'excitateurs. De nombreux travaux ont porté sur les afférences glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques. L'activation des récepteurs glutamatergiques N-méthyl-D-aspartique (NMDA) et α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) sur les neurones de l'ATV augmente leur fréquence de décharge (Chergui et al., 1993; Georges & Aston-Jones, 2002; Johnson et al., 1992; Zweifel et al., 2009). Les inputs glutamatergiques proviennent de plusieurs régions du cortex, et notamment de l'amygdale, du noyau pédonculopontin (PPTg) et de l'ATV-même (Dobi et al., 2010; Morales & Root, 2014; Yamaguchi et al., 2007). Ce dernier envoie aussi des projections cholinergiques et est impliqué dans la modulation de la réponse conditionnée à une récompense (Yau et al., 2016). À l'opposé, on observe non seulement des interneurons GABAergiques qui inhibent l'activité des neurones dans l'ATV, mais également des afférences inhibitrices originaires du NAc et du pallidum ventral (PV) (Kalivas et al., 1993; Wu et al., 1996; Zahm & Heimer, 1990). Enfin, l'ATV est innervée par des projections noradrénergiques provenant du locus coeruleus (LC) (Liprando et al., 2004; Mejías-Aponte et al., 2009a; Simon et al., 1979). Ces inputs ont un rôle exciteur sur la libération de DA dans l'ATV (Grenhoff et al., 1993; Lategan et al., 1990; Russell et al., 1989; Tassin et al., 1979).

1.1.1.2.1. Collatérales axonales locales

En plus de ces voies afférentes, des données fragmentaires suggèrent que l'ATV possède des terminaisons locales DAergiques. En effet, une première étude publiée par Deutch et al. met en évidence la présence de varicosités axonales immunoréactives à la TH, c'est-à-dire de zones

actives de libération, dans l'ATV (Deutch et al., 1988a). Une étude subséquente par Bayer et Pickel, à l'aide de la microscopie électronique couplée à l'immunohistochimie, démontre la présence de terminaisons TH-positives dans l'ATV en apposition avec des neurones TH-positif (Bayer & Pickel, 1990a). Toutefois, puisque l'ATV reçoit aussi des inputs noradrénergiques qui contiennent aussi de la TH, on ne peut exclure que ces terminaisons TH-positives soient, du moins en partie, des terminaisons noradrénergiques provenant du LC. De nouvelles études seront donc clairement nécessaires pour plus directement mettre en évidence la présence de terminaisons DAergiques dans le mésencéphale ventral et déterminer leur contribution à la libération de DA dans l'ATV.

1.1.2. Substance noire

La substance noire (SN) est impliquée dans le contrôle du mouvement et de la motivation. Elle est sous-divisée en deux régions : la substance noire *pars compacta* (SNc), où l'on retrouve les corps cellulaires des neurones DAergiques, et la substance noire *pars reticulata* (SNr), composée de dendrites DAergiques et d'une population importante de neurones GABAergiques. Le terme « substance noire » provient du fait que cette région apparaît noire du fait de la densité élevée de neuromélanine, un pigment formé par l'oxydation de la DA qui s'accumule dans les corps cellulaires de la SNc.

1.1.2.1. Voie nigrostriée

La SN projette principalement à la portion dorsale du striatum pour former la voie nigrostriée. La SN fait partie du système des ganglions de la base, un ensemble de structures sous-corticales interconnectées qui contrôlent le mouvement. De ces structures on distingue le striatum dorsal, le globus pallidus interne (GPi) et externe (GPe), le noyau sous-thalamique (STN) et la SN. Les ganglions de la base forment une boucle avec le cortex par l'intermédiaire du thalamus, nommée la boucle thalamo-corticale (Alexander et al., 1990; Alexander & Crutcher, 1990). Les axones des neurones DAergiques de la SNc innervent le striatum dorsal et influencent l'excitabilité des neurones GABAergiques, appelés *medium spiny neurons* (MSN). On distingue deux types de MSNs : ceux exprimant le récepteur D2 (D2R) et ceux exprimant le récepteur D1 (D1R). Les MSNs exprimant D2R projettent au GPe, qui contient des neurones GABAergiques. Ce signal est ensuite acheminé au noyau sous-thalamique, qui contient des neurones glutamatergiques qui font ensuite synapse dans la SN. Ce circuit est nommé la « voie indirecte » et a un effet inhibiteur sur le contrôle du mouvement puisque la SN est un centre de contrôle inhibiteur sur le thalamus. La « voie directe », quant à elle, implique les MSNs exprimant D1R qui projettent au GPi, une structure qui contient, comme le GPe, des neurones GABAergiques. Ceux-ci inhibent directement la SN. La « voie directe » a donc un effet plutôt activateur du mouvement puisque le thalamus est désinhibé (Albin et al., 1995; Bahuguna et al., 2019). Les neurones de la SNc innervent les deux types de MSNs, chaque neurone innervent près de 75,000 MSNs du fait de leur arborisation axonale exceptionnelle (Matsuda et al., 2009a). Lorsque les terminaisons DAergiques de la SN dégèrent, les voies directe et indirecte sont perdues ce qui entraîne une désinhibition de la SN. En effet, la voie directe n'inhibe plus la SN et la voie indirecte n'inhibe plus le noyau sous-thalamique. C'est alors qu'on obtient une inhibition globale du thalamus, un phénomène qu'on retrouve dans la maladie de Parkinson.

1.1.2.2. Voies afférentes

La SN reçoit des terminaisons des ganglions de base, la plupart étant des inputs GABAergiques sauf ceux provenant du STN qui sont glutamatergiques (Rinvik & Ottersen, 1993). Certains auteurs incluent aussi le noyau pédonculopontin dans les ganglions de base, dont les efférences à la SN sont de nature glutamatergique et cholinergique (Futami et al., 1995; Takakusaki et al., 1996). Les neurones GABAergiques de la SNr exercent aussi une forte inhibition sur les neurones DAergiques de la SNc. Les inputs sont donc majoritairement GABAergiques dans la SN et font synapse soit sur les neurones DAergiques, soit sur les neurones GABAergiques locaux (Bolam & Smith, 1990).

D'autre part, les ganglions de la base reçoivent aussi une innervation importante de neurones sérotoninergiques (5-HT) provenant des noyaux médial et dorsal du raphé (Azmitia & Segal, 1978; Beier et al., 2015; Ogawa et al., 2014; Watabe-Uchida et al., 2012). L'interaction entre le système DAergique et le système sérotoninergique a été étudié pendant des décennies mais le rôle de la 5-HT dans la SN reste toutefois méconnu. Or, plusieurs études suggèrent que la 5-HT aurait un effet inhibiteur sur les neurones DAergiques et que la stimulation des récepteurs 5-HT dans la SN stimule seulement la libération locale plutôt que de propager le signal aux terminaisons axonales (Cobb & Abercrombie, 2003; Trent & Tepper, 1991).

1.1.2.2.1. Collatérales axonales locales

Tel que décrit plus tôt, la présence potentielle de collatérales axonales locales DAergiques dans l'ATV a été proposé. Quant à la SNc, la plupart des études antérieures, essentiellement

qualitatives, ont suggéré une absence de collatérales locales. À titre d'exemple, l'étude de Juraska et al. n'a rapporté aucune terminaison DAergique locale chez le rat à la suite d'un marquage des neurones par la méthode de Golgi (Juraska et al., 1977a). Une étude de Wassef et al. chez le rat a également suggéré l'absence de terminaisons TH-positives dans cette région (Wassef et al., 1981a). Cependant, cette étude a porté sur la SNr, où l'on retrouve principalement les dendrites des neurones DAergiques, et non pas sur la SNc, d'où émergent les axones. Une autre étude faisant appel à un marquage viral des neurones DA a aussi suggéré l'absence de collatérales locales (Matsuda et al., 2009a). Ces conclusions ont cependant été tirées à partir de l'évaluation de seulement huit neurones marqués dans la SNc.

À l'opposé, une étude effectuée encore ici chez le rat a suggéré la présence de collatérales axonales dans la SNc par injection de la biotine dextran amine (BDA), un traceur antérograde, bien que ceci n'a été observé que dans moins de 10% des neurones étudiés (Prensa & Parent, 2001). Fait intéressant, ces auteurs ont noté que l'arborisation de ces collatérales locales était plutôt « impressionnante » et potentiellement assez importante pour exercer un effet sur cette région. Cependant, il reste à déterminer si ces axones relâchent réellement de la DA, soit de manière fonctionnelle ou anatomique, par exemple, par la présence de vésicules synaptiques.

Ces recherches ont toutes tenté de déterminer la présence d'axones DAergiques qui terminent dans la SNc. Toutefois, on remarque que cette région contient des axones dits « de passage », c'est-à-dire des axones qui se dirigent vers des régions éloignées du cerveau. Ces études antérieures ont-elles négligé de considérer la possibilité que les neurones DAergiques libèrent leur neurotransmetteur tout au long de leur axone au niveau de leurs varicosités. Ces dernières sont des renflements de l'axone où on retrouve les protéines impliquées dans la libération de la DA. Il ne serait donc pas déraisonnable de penser que ces axones de passage pourraient tout aussi bien libérer

de la DA dans la SNc, même s'ils ne terminent pas dans cette région. Il serait donc d'intérêt d'examiner le contenu des varicosités axonales des neurones DAergiques dans le mésencéphale pour déterminer si elles contiennent des zones actives de relâche.

La présence de collatérales axonales chez les rongeurs ne serait pas anecdotique puisqu'on retrouve des collatérales axonales dans la SNc dans d'autres organismes, entre autres chez le chat, les primates et les humains (Preston et al., 1981; Yelnik et al., 1987). Dans l'étude chez le chat, les neurones de la SNc ont été marqués à la peroxydase de raifort et seuls les neurones qui répondaient à une stimulation antidromique dans le striatum ou le MFB étaient inclus dans l'étude. Les auteurs notent que trois des dix neurones étudiés dans cette région émettaient des collatérales locales avant ou après avoir émergé de la SN (Preston et al., 1981). Bien que le marquage utilisé n'était pas spécifique aux neurones DAergiques, les projections axonales de ces neurones au striatum nous laisse présumer qu'il s'agissait de neurones DAergiques. L'étude chez les primates et les humains aussi utilisé aussi une technique manquant de spécificité, soit la méthode d'imprégnation de Golgi. Or, ils ont tenté de distinguer entre les petites neurones locaux et les larges neurones qui projettent leur axone sur de longues distances. Ces derniers contenaient parfois des collatérales locales et les auteurs ont noté que leur arborisation était plus importante chez les humains comparativement aux primates (Yelnik et al., 1987).

Des études fonctionnelles ont aussi tenté de démystifier la contribution de la libération axonale dans le mésencéphale. Il faudrait d'abord mentionner que les neurones DAergiques relâchent leur neurotransmetteur aussi par leur dendrites et soma, communément appelé la libération somatodendritique (STD). À cet effet, on observe dans la SNc une libération de DA plus faible que celle dans l'ATV (Rice et al., 1994, 1997a). Ceci a mené à l'hypothèse que l'ATV contiendrait des collatérales axonales qui innervent et augmentent la libération de STD de DA, à l'opposé de

la SNc où seulement la libération STD contribuerait à la DA détectée. Cependant, il est également nécessaire de tenir compte du fait que la recapture de la DA dans la SN est plus élevée que dans l'ATV (Rice et al., 1997a) et que l'ATV contient plus de neurones DAergiques que la SNc (German & Manaye, 1993). L'origine de la plus grande libération de DA dans l'ATV par rapport à la SNc reste donc à clarifier.

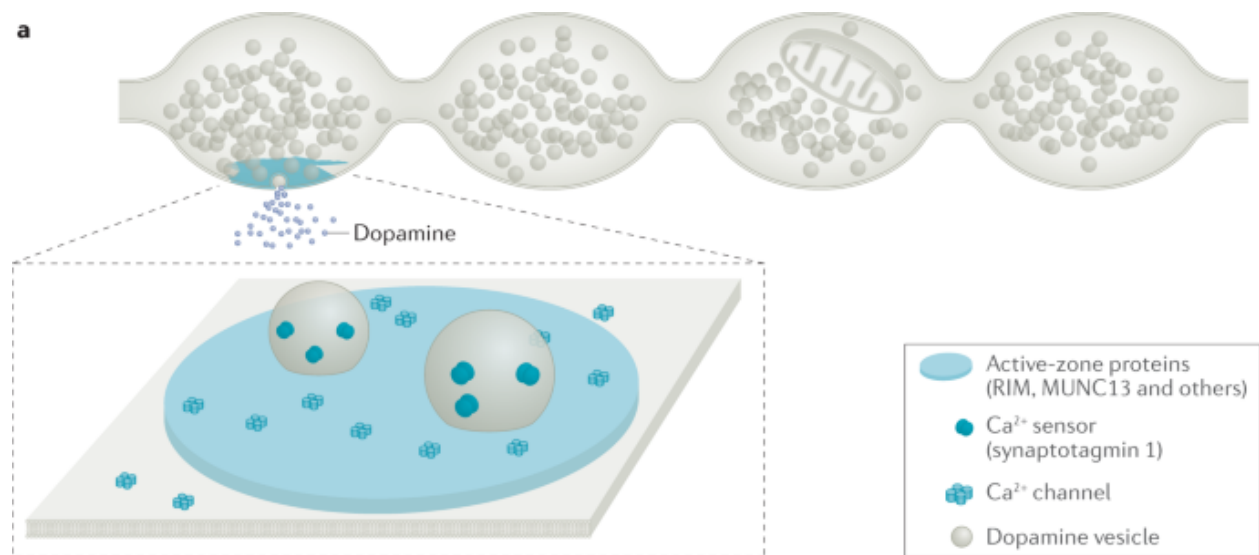


Figure 2: Schématisation des zones de relâche dans les varicosités d'axones DAergiques.

Organisation cellulaire (en haut) et moléculaire (en bas) des zones de relâche. Source : Liu et al., 2021. Reproduction avec permission.

1.1.3. Hétérogénéité des neurones DAergiques

La description précédente du système DAergique est un résumé simplifié des voies de projections. Mais en réalité, un nombre croissant de travaux révèlent qu'il existe une importante hétérogénéité des neurones DAergiques, tant dans l'ATV que la SNc. On retrouve par exemple des neurones DAergiques de l'ATV qui projettent au striatum dorsal ainsi que certains neurones de la SNc projettent au NAc (Poulin et al., 2018). Cette hétérogénéité se retrouve également dans l'identité neurochimique des neurones DAergiques, avec certains neurones ayant la capacité de libérer du GABA ou du glutamate comme co-transmetteur (Dal Bo et al., 2004; Joyce & Rayport, 2000; Stuber et al., 2010; Sulzer et al., 1998; Tritsch et al., 2012, 2016). La co-transmission du glutamate a été révélé, entre autres, par la présence du transporteur vésiculaire à glutamate 2 (VGluT2) dans les neurones DAergiques (Dal Bo et al., 2004). L'expression de VGluT2 dans les neurones DAergiques diffère selon les sous-régions de l'ATV et de la SN. En effet, seuls les neurones de la partie ventromédiale de l'ATV qui projettent à la coquille médiale du NAc expriment VGluT2. Dans la SN, ce sont les neurones latéraux qui projettent à la portion caudale du striatum dorsal (dit striatum latéral) qui expriment VGluT2 (Poulin et al., 2018).

1.2. La libération de la dopamine

1.2.1. La libération axonale

La libération de neurotransmetteurs est un processus finement régulé par un complexe de protéines axonales pour permettre la transmission rapide du signal. La relâche est déclenchée suite à la propagation d'un signal électrique et est dépendante du calcium. Katz décrit que les neurotransmetteurs sont relâchés en petites bouffées appelés *quantum*, plutôt que de façon

continue (Katz, 1969). Ces derniers sont les amas de vésicules où sont stockés les neurotransmetteurs (Heuser et al., 1979).

D'abord, ces vésicules sont acheminées aux terminaisons grâce aux microtubules à la zone active, une région spécialisée de la membrane présynaptique où se concentrent les protéines de fusion vésiculaire. Arrivées à la zone active, les synapsines se lient aux vésicules pour les stocker dans ce qu'on appelle un amas de réserve (*reserve pool* ou RP). Les vésicules se détachent de la synapsine en réponse à un potentiel d'action pour ensuite faire partie d'un amas de vésicules compétentes pour la relâche (*ready releasable pool* ou RRP). La fusion des vésicules du RRP à la zone active se fait par la formation du complexe SNARE (*SNAP Receptor* ou récepteur des protéines SNAP). Une première étape d'arrimage (ou *docking*) permet aux vésicules de s'aligner sur la membrane de la zone active grâce à leur interaction avec les protéines rab. S'ensuit l'amorçage (ou *priming*) des vésicules, une étape importante dans la fusion de celles-ci. C'est à cette étape que le complexe SNARE se forme. Il est composé des v-SNARE, qui sont les protéines SNARE des vésicules, et t-SNARE, les protéines SNARE membranaires. Dans les v-SNARE, on retrouve la synaptobrevine (ou VAMP, *vesicle-associated membrane protein*), tandis que les t-SNARE sont composés de syntaxine et SNAP-25 (*synaptosomal associated protein-25*) (Kaeser & Regehr, 2014). Ces deux groupes s'assemblent pour former un complexe macromoléculaire appelé trans-SNARE. C'est à cette étape qu'interviennent les protéines régulatrices telles que les RIMs, Munc13, ELKS et Bassoon, des protéines d'échafaudage qui participent au recrutement des vésicules (Aravamudan et al., 1999; Garner et al., 2000; Mittelstaedt et al., 2010). Ces dernières ont toutes été reportées dans les neurones DAergiques et participent à la relâche du neurotransmetteur (Daniel et al., 2009; Ducrot et al., 2021; C. Liu et al., 2018b; Uchigashima et al., 2016). De plus, on y retrouve les protéines SNARE synaptobrevine-2 et SNAP-25, démontré

par l'utilisation de toxines botuliniques qui clivent ces protéines de fusion vésiculaire (Bergquist et al., 2002; G. D. Fortin et al., 2006b).

Enfin, le contenu des vésicules se relâche dans le milieu extracellulaire grâce à leur fusion à la membrane axonale en réponse à un potentiel d'action. Ce dernier permet l'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage pour augmenter la concentration intracellulaire de calcium. Le calcium se lie aux protéines de la famille des synaptotagmines (Syt) qui agissent comme senseur calcique de l'exocytose. La Syt change de conformation et se lie au complexe trans-SNARE et, à l'aide de cofacteurs, permet la fusion des phospholipides, pour ultimement permettre la libération des neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire.

Après exocytose, la DA est recapturé par le transporteur à DA (DAT). Ce dernier joue un rôle clé dans le cycle de la libération, sans quoi le milieu deviendrait hyper-dopaminergique et les réserves de DA seraient rapidement épuisées (Giros et al., 1996).

Par ailleurs, les vésicules synaptiques sont rapidement recyclées et réapprovisionnées en DA par le transporteur actif VMAT2 (*vesicular monoamine transporter*). Le mécanisme principal de recyclage des vésicules est celui médié par la clathrine, un mécanisme de recyclage lent (Chanaday et al., 2019; Soykan et al., 2016). Ceci est lorsque la vésicule se fusionne complètement avec la membrane présynaptique (Heuser et al., 1979). En parallèle, lorsque la fusion est incomplète et que seul un pore de fusion est formé, il y a un mode de recyclage plus rapide nommé *kiss-and-run* qui ne nécessite pas de clathrine (Fesce et al., 1994).

1.2.1.1. Différents types de relâche de DA

D'abord, il est important de distinguer entre les deux types d'activité électrique qu'on retrouve chez les neurones DAergiques : une activité tonique et une en rafale (dite *burst firing*). L'activité tonique est à basse fréquence (entre 1 à 5 Hz) et est médiée par l'activité spontanée *pacemaker* des neurones. La deuxième est caractérisée par des décharges en bouffée à haute fréquence (plus de 15 Hz) (C. Liu et al., 2021).

Conséquemment, deux types de relâche sont retrouvées dans les neurones DAergiques, soit la relâche phasique et la relâche tonique. La relâche phasique est engendrée par l'activation simultanée de plusieurs sites de libération, induisant une relâche importante de la DA qui diffuse ensuite dans le milieu extracellulaire, caractérisant alors la transmission volumique. Les termes de relâche phasique et en rafale (*burst firing*) sont souvent utilisés de manière interchangeable. Or, la relâche phasique réfère au recrutement de plusieurs sites de libération, tandis que les décharges en rafale font références à l'activité électrique d'un neurone (C. Liu et al., 2021).

Dans la relâche tonique on retrouve d'abord la libération dite « synchrone », où un potentiel d'action active directement la relâche de la DA. Cette relâche est possible grâce aux canaux calciques qui n'ouvrent que très brièvement ainsi qu'à la cinétique d'action rapide des protéines d'exocytose qui permettent l'assemblage et le désassemblage rapide des complexes synaptiques (Bischofberger et al., 2002; Llinás et al., 1981). Cependant, ce ne sont pas toutes les vésicules synaptiques qui relâchent en réponse à un potentiel d'action. En effet, certaines vésicules ne se libèrent pas directement après un stimulus, mais plutôt quelques temps après des stimulations à haute fréquence. C'est ce qu'on appelle la libération asynchrone. Elle dépendrait, en partie, de senseurs calciques de la famille synaptotagmine avec des cinétiques lentes, tels que l'isoforme synaptotagmine 7 (Maximov et al., 2008; Sugita et al., 2001; Wen et al., 2010).

Enfin, on retrouve la libération tonique de DA où des vésicules se fusionnent à la membrane de manière spontanée, sans stimulus. Cette forme de relâche non régulée est moins bien comprise, mais elle a été retrouvée dans de nombreux types de neurones. Plusieurs études suggèrent que celle-ci dépend d'une forme non-canonique des protéines SNARE (Ramirez & Kavalali, 2012). Il est donc possible que ces différentes formes de libération de DA dépendent de différentes isoformes de protéines composant le complexe SNARE, notamment l'isoforme Syt présente sur la vésicule. En effet, il existe différents isoformes de Syt qui contribuent soit à la relâche synchrone, asynchrone ou spontanée de DA. Ceux-ci seront abordés plus en détail à la section 3.3.

1.2.1.2. Transmission volumique

La représentation classique d'un axone est l'image d'un bouton synaptique qui projette sur une épine dendritique, les deux séparés par quelques microns pour former la fente synaptique. Or, on observe que la plupart de la DA est libérée à partir de terminaisons axonales qui ne sont pas en contact directe avec une densité postsynaptique. C'est ce qu'on appelle la transmission volumique. Ce concept vient d'abord d'études sur le système noradrénergique où on retrouve que la majorité des varicosités axonales n'ont pas de partenaire synaptique. Ils postulent que ces varicosités libèrent leur neurotransmetteur dans le milieu extracellulaire et diffuse vers des récepteurs extracellulaires localisés à une certaine distance (Descarries et al., 1977). On observe ce même phénomène dans le système DAergique puisqu'on retrouve aussi des varicosités dites «non synaptiques» ou «asynaptiques» dans le striatum qui représentent en fait la majorité des varicosités des neurones DA dans cette région du cerveau et sont donc bien plus nombreuses que celles dites «synaptique» (Descarries et al., 1996).

L'hypothèse de transmission volumique est appuyée par des données sur la localisation des D1R et D2R. En effet, on observe qu'une majorité des D1R et D2R sont extrasynaptiques, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas post-synaptiques à des terminaisons afférentes (Caillé et al., 1996a; Ducrot et al., 2021; Sesack et al., 1994; Smiley et al., 1994; Yung et al., 1995). Par ailleurs, ces récepteurs sont couplés à des protéines G dont la signalisation est plus de deux fois plus lente que celle des récepteurs ionotropes, démontrant d'autant plus que la transmission de l'information dans le système DAergique n'est pas rapide mais plutôt lente et diffuse, ce qui est la nature de la transmission volumique (Missale et al., 1998).

Les données fonctionnelles supportent aussi le phénomène de transmission volumique. Une revue exhaustive par Rice et Cragg tente de modéliser la sphère d'influence du DAT, c'est-à-dire le niveau auquel le DAT limite la diffusion de la DA dans le milieu extracellulaire. En se basant sur des études de diffusion et de recapture dans le striatum et la SN, ils ont constaté que la recapture par le DAT est plus lente que la vitesse de diffusion du DA. Ainsi, la DA peut diffuser jusqu'à 7-8 μm du site de libération pour agir sur des récepteurs à distance (S. J. Cragg & Rice, 2004; Rice & Cragg, 2008).

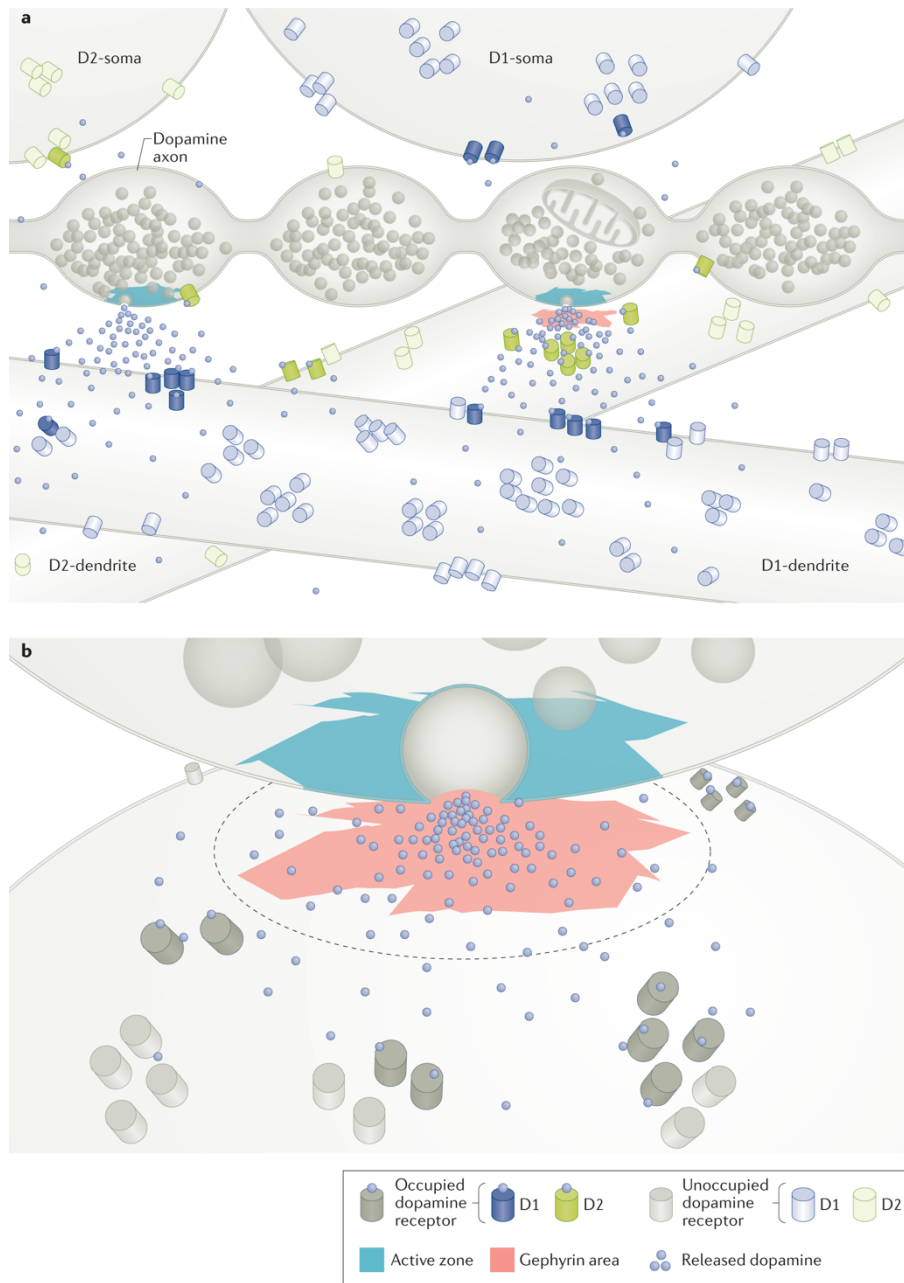


Figure 3 : Schématisation de la transmission volumique et synaptique de la DA.

(a) La DA est relâchée de manière synaptique et non synaptique, les deux étant détectés par les récepteurs D1 et D2. (b) Haute magnification d'une varicosité synaptique. Les récepteurs sont

distribués en amas sur la membrane post-synaptique. Source : Liu et al., 2021. Reproduction avec permission.

Une question importante est de savoir si la majorité ou seulement un sous-ensemble des varicosités axonales des neurones DAergiques sont actives et libèrent de la DA. Cette question est présentement non résolue. D'une part, la machinerie nécessaire pour l'exocytose de DA pourrait être absente d'une partie des terminaisons. À titre d'exemple, la protéine Syt1 est retrouvée dans approximativement 70% des varicosités axonales des neurones DA in vitro (Ducrot et al., 2021). Cependant, les protéines de zone active RIM, Bassoon et Munc13 ne sont détectables par immunomarquage que dans une sous-population de varicosités DAergiques (Banerjee et al., 2022; Ducrot et al., 2021; C. Liu et al., 2018b, 2021). Au niveau fonctionnel, alors qu'une étude effectuée avec le FM1-43, un marqueur fluorescent du cycle vésiculaire, a identifié une majorité de varicosités actives (Ducrot et al., 2021), une autre étude effectuée avec un analogue fluorescent de la DA a conclu que seulement 20% des varicosités DAergiques peuvent relâcher leurs neurotransmetteurs (Pereira et al., 2016). Des études complémentaires avec de nouvelles approches incluant l'utilisation de nouveaux senseurs de DA encodés génétiquement seraient nécessaires pour clarifier la situation.

1.2.2. Libération somatodendritique

Les neurones DAergiques ont la capacité de relâcher leur neurotransmetteur non seulement à partir de leurs axones, mais aussi à partir de leur corps cellulaire et dendrites. La libération de DA de ces deux dernières régions est communément appelée libération STD. Ce sont

d'abord les chercheurs Björklund et Lindvall qui ont observé la présence de DA dans les dendrites et corps cellulaires dans la SNc de rats, initiant la recherche sur la libération STD (Björklund & Lindvall, 1975). Peu après, Geffen et al. (1975) et Glowinski et collaborateurs (Cheramy et al., 1981; Geffen et al., 1976; Nieoullon et al., 1977) ont démontré que les neurones DAergiques libèrent leur neurotransmetteur au niveau du compartiment STD par la mesure de la libération de ³H-DA dans des tranches de mésencéphale et par des études in vivo par la technique de « push-pull canula » chez le chat.

La libération STD jouerait un rôle dans la régulation de la fréquence des décharges des neurones DAergiques au niveau de leurs terminaisons axonales dans le striatum ventral et dorsal en activant les récepteurs D2 (Beckstead et al., 2004a; Gentet & Williams, 2007; Pucak & Grace, 1994; Santiago & Westerink, 1991; Zhou et al., 2009). De plus, l'activation des récepteurs D2 produit aussi une autoinhibition locale de la libération STD (S. J. Cragg & Greenfield, 1997). En outre, l'activation des récepteurs D1 dans la SNr module le contrôle moteur en augmentant la libération du GABA (Miyazaki & Lacey, 1998; Radnikow & Misgeld, 1998; Zhou et al., 2009).

1.2.2.1. *Techniques de détection de la libération STD*

Aujourd'hui, on peut étudier la libération STD avec de nouvelles techniques tel que la microdialyse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui vient remplacer la technique de *push-pull cannula* (Westerink & Justice, 1991). L'avantage de l'HPLC est sa sensibilité et spécificité élevée qui permet de distinguer entre les différentes monoamines du milieu extracellulaire. Cependant, sa résolution spatiale et temporelle est faible et elle est donc inadéquate pour l'étude des mécanismes rapides de l'exocytose (Chefer et al., 2009; S. J. Cragg &

Rice, 2005). Une autre technique est celle de l'électrochimie qui vient apporter une haute sensibilité temporelle et spatiale, notamment la méthode de voltammétrie cyclique et l'ampérométrie. Ces méthodes utilisent une fibre de carbone sur laquelle on applique soit un voltage constant dans le cas de l'ampérométrie, soit des rampes de voltages dans la voltammétrie cyclique, pour produire l'oxydation et la réduction de composés électroactifs comme la DA. On peut ensuite mesurer les courants faradiques qui sont produits et quantifier la quantité de neurotransmetteur sécrétée. Ces techniques ont une haute résolution temporelle permettant la détection de libération quantique dans le cas de l'ampérométrie (Jaffe et al., 1998; Kim et al., 2008). Jusqu'à récemment, elles ne pouvaient détecter que la libération évoquée mais, avec certaines adaptations, la voltammétrie cyclique peut aussi mesurer la libération spontanée (Yee et al., 2019).

1.2.2.2. *Transmission volumique*

Tel que dans le striatum, plusieurs études suggèrent que la DA dans le mésencéphale soit libérée dans le milieu extracellulaire de manière non-synaptique. En effet, il a été rapporté que les contacts dendro-dendritiques sont rares dans la SNc et l'ATV et même absents dans la SNr, une région riche en dendrites (Groves & Linder, 1983; Wassef et al., 1981a; Wilson et al., 1977). De plus, le DAT des dendrites et des corps cellulaires est largement extrasynaptique mais à proximité de terminaisons glutamatergiques (Nirenberg et al., 1996; Yung et al., 1995). La libération STD serait donc majoritairement par transmission volumique. Une étude démontre même que, dans le mésencéphale, la concentration de DA est assez élevée jusqu'à 20 μm de sa source pour stimuler les récepteurs D1 et D2 (S. J. Cragg et al., 2001).

En contraste, une étude a tenté de reproduire les courants D2-IPSC (*inhibitory postsynaptic current*), qui sont produits après l'activation des récepteurs D2, mesurés par l'application de DA exogène. Ils ont utilisé la méthode *outside-out*, une configuration de patch excisé où le récepteur est excisé et sa face extracellulaire est exposée à diverses substances. Cependant, ils ont observé que ces courants requièrent une forte concentration de DA exogène pour produire une réponse similaire à celle évoquée de manière endogène par la libération STD (Ford et al., 2009a). En effet, Les D2-IPSC nécessitant des niveaux de DA dans l'ordre du micromolaire, les concentrations nanomolaires présentes à distance des sites de libération ne sont pas suffisantes pour les stimuler (Courtney et al., 2012a; S. J. Cragg & Rice, 2004; Rice & Cragg, 2008). Ces études suggèrent donc que l'activation de récepteurs D2 serait plutôt synaptique ou, du moins, péri-synaptique. Une autre hypothèse stipule que les courants D2-IPSC proviendraient d'une signalisation autocrine où le neurone DAergique stimule ses propres récepteurs D2, plutôt que par des contacts dendro-dendritiques (Lacey et al., 1987; Rice & Patel, 2015). Il faudrait aussi noter que ces études sur les courants D2-IPSC considèrent que seul la libération STD contribue au DA extracellulaire dans le mésencéphale. Or, les axones locaux pourraient aussi libérer de la DA et augmenter sa concentration extracellulaire, permettant donc d'atteindre les hauts niveaux de DA nécessaires aux courants D2-IPSC mesurés.

1.2.2.3. Mécanismes de libération STD

L'étude de Björklund et Lindvall, effectuée par la méthode d'acide glyoxylique, a montré que suite à l'application de la réserpine, un bloqueur de VMAT2, le signal fluorescent émit par la DA dans les dendrites est perdu (Björklund & Lindvall, 1975). Cette observation appuie

l'hypothèse du stockage vésiculaire de la DA dans les dendrites des neurones DAergiques. Depuis lors, plusieurs études ont tenté de mieux caractériser les mécanismes élémentaires de la libération STD de DA. Or, il s'est avéré difficile d'observer des vésicules de type synaptique, telles que celles observées dans les axones. Certaines études en reportent peu (Bayer & Pickel, 1990a; Groves & Linder, 1983; Nirenberg et al., 1996; Wilson et al., 1977), tandis que d'autres n'en observent pas (Mercer et al., 1979; Reubi & Sandri, 1979).

Certaines études ont plutôt proposé que la DA serait stockée dans le réticulum endoplasmique et ses tubulovésicules, ces dernières étant des saccules du réticulum endoplasmique lisse (Cuello & Kelly, 1977; Groves & Linder, 1983; Hattori et al., 1979; Mercer et al., 1979; Parizek et al., 1971; Wassef et al., 1981a). En appui avec cette hypothèse, VMAT2 a été observé sur les tubulovésicules, ce qui leur permettrait de capturer et stocker la DA cytosolique (Nirenberg et al., 1996; Witkovsky et al., 2009). Il est donc possible que les deux types de stockage, soit vésicules et tubulovésicules, se retrouvent dans le compartiment STD (Groves & Linder, 1983).

Cependant, le mécanisme moléculaire de libération STD de la DA n'est toujours pas complètement caractérisé. Une première hypothèse propose que la DA se libère au niveau du DAT par transport inversé. Dans des conditions normales, le DAT utilise le gradient transmembranaire du Na⁺ et Cl⁻ pour recapturer la DA (N.-H. Chen et al., 2004). Bien que les niveaux cytoplasmiques de DA ne soient pas assez élevés pour inverser le sens du flux de la DA, il est possible que la DA s'échappe des tubulovésicules, augmentant ses niveaux intracellulaires (Leviel, 2001; Rice & Patel, 2015b; Sulzer et al., 1995). Cependant, ceci ne serait pas le mécanisme primaire de la relâche STD, compte tenu du fait que l'inhibition du DAT mène à l'augmentation des niveaux extracellulaires de DA plutôt que de les diminuer (Beckstead et al., 2004a; B. T. Chen & Rice, 2001; S. J. Cragg et al., 1997; Delignat-Lavaud et al., 2021).

Or, malgré les contradictions, le mécanisme accepté par la plupart des chercheurs est celui d'exocytose. En effet, on décrit que la libération STD est inhibée par l'application de toxines botuliniques, ces dernières inhibant la formation du complexe SNARE (Bergquist et al., 2002; G. D. Fortin et al., 2006b). Cependant, certains résultats, bien que fragmentaires, suggèrent que le compartiment STD est dépourvu de certaines protéines retrouvées dans le complexe SNARE des axones, telle que la synaptobrevine-1 et la syntaxine 1a (Witkovsky et al., 2009). À l'inverse, on retrouve tout de même les protéines SNAP-25 et syntaxine 3b dans le corps cellulaire des neurones DAergiques (Mendez et al., 2011; Witkovsky et al., 2009). Enfin, on retrouve aussi des différences dans les isoformes de synaptotagmine entre les deux régions, celles-ci étant abordées dans la section 3.3. En somme, la libération STD dépendrait d'une organisation moléculaire différente de celle retrouvée dans les axones pour permettre la fusion des vésicules synaptiques.

1.2.2.4. Dépendance envers le calcium intracellulaire

La libération STD dépend non seulement de l'activité électrique des neurones DAergiques, mais aussi de l'entrée de calcium, comme pour la libération axonale. Or, la dépendance envers le calcium de la libération STD semble être moins élevée que celle de la libération axonale. En effet, la libération de la DA dans la SNc persiste même à des concentrations submillimolaires de calcium extracellulaire, des niveaux auxquelles la libération axonale est abolie (B. T. Chen & Rice, 2001; G. D. Fortin et al., 2006b; Hoffman & Gerhardt, 1999; Mendez et al., 2011). Il a été proposé que cette différence soient due en partie au fait que la libération STD de DA ne dépendrait pas uniquement de l'entrée de calcium, mais aussi de la libération de calcium à partir des stocks

intracellulaires, ce qui représenterait une forme de système d'amplification du signal (Ludwig et al., 2002).

C'est sur ce principe que se sont basées certaines études pour suggérer, de façon fonctionnelle, la présence de collatérales axonales dans l'ATV. En effet, si on regarde d'abord la dépendance envers le calcium de la libération axonale dans le striatum et le NAc, on retrouve que la libération est directement proportionnelle aux niveaux de calcium extracellulaires, augmentant de manière exponentielle à partir 0.5mM de calcium. En contraste, la libération dans la SNc augmente légèrement jusqu'à saturation vers 0.5mM de calcium. L'ATV démontre aussi un profil similaire à celle de la SNc à de faibles concentrations de calcium. Cependant, à des concentrations plus élevées, la libération de DA augmente de manière similaire à celle mesurée dans le striatum et le NAc (B. T. Chen et al., 2011a). Ces données sont sujet à controverse, puisqu'il a été démontré que la libération STD et axonale chez la souris ont une dépendance similaire au calcium (Delignat-Lavaud et al., 2022a; Ford et al., 2010). On pourrait attribuer ces résultats contradictoires à des différences entre les espèces (Courtney et al., 2012a).

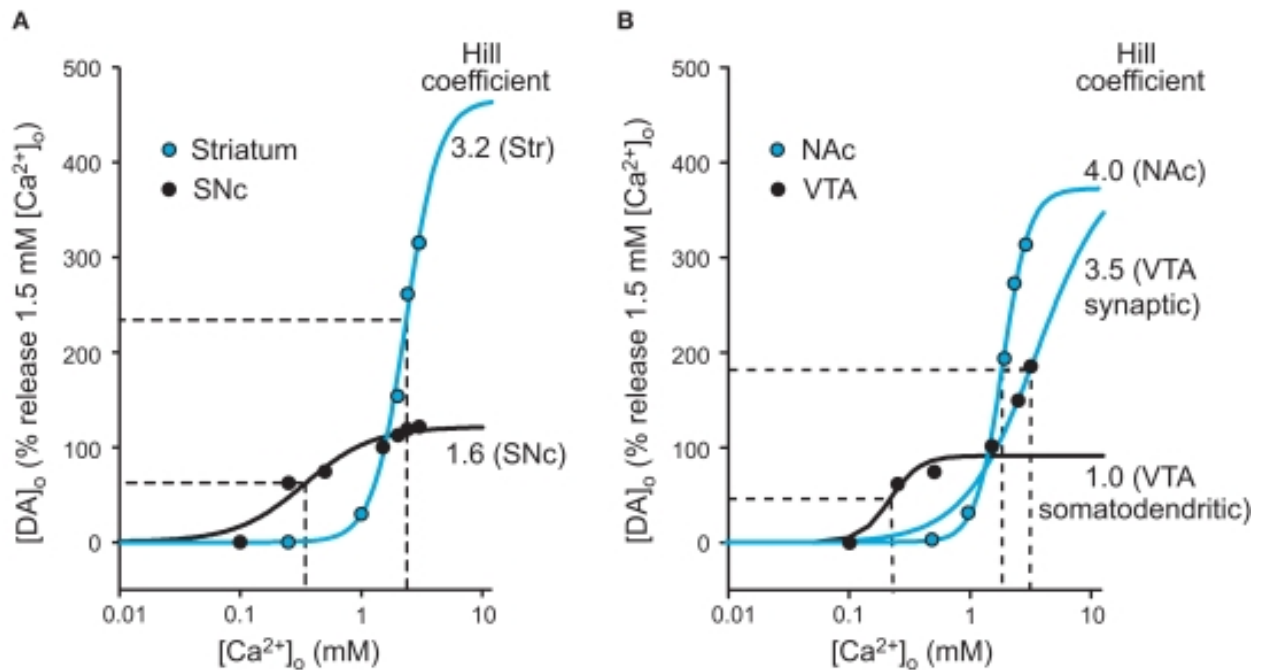


Figure 4 : Analyse de Hill des courbes de dépendance envers le calcium dans le striatum et le mésencéphale.

Courbes de la [DA] extracellulaire chez le cobaye en réponse à une stimulation unitaire dans le striatum et la SNc (en A) et dans le NAc et l'ATV (en B) normalisée par rapport aux pics de relâche à 1.5mM de [Ca²⁺] extracellulaire. La pente calculée pour chaque région est inscrite à droite de la courbe respective. B. Deux courbes de Hill ont été générés pour l'ATV, démontrant la coexistence de la relâche axonale et STD dans cette région. Source : Chen et al. (2011). Reproduction avec permission.

1.2.3. Les synaptotagmines

Les différences entre les sensibilités au calcium entre le compartiment STD et les axones pourraient potentiellement être expliquées par la présence dans ces deux compartiments de différents isoformes de synaptotagmines (Syt). Certains isoformes des Syt sont des senseurs calciques qui facilitent la fusion du complexe SNARE lors de l'exocytose. Cette protéine, qui se retrouvent sur les vésicules synaptiques, contiennent un domaine extracellulaire pour se lier au calcium, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire (Chapman, 2002; Südhof, 2002). On retrouve 17 isoformes de Syt grâce à l'épissage alternatif, certaines n'ayant pas tous les trois domaines. En effet, seulement 8 de ces isoformes contiennent le domaine extracellulaire C2, composé de deux domaines en tandem C2A et C2B, leur permettant de se lier au calcium. Les autres auraient des rôles variés dans l'exocytose, le trafic vésiculaire et l'endocytose (C. Chen & Jonas, 2017). Jusqu'à maintenant, des travaux suggèrent que les isoformes qui jouent un rôle dans l'exocytose de la DA sont la synaptotagmine 1 (Syt1), 4 (Syt4) et 7 (Syt7).

1.2.3.1. Synaptotagmine 4

Du côté STD, on retrouve l'isoforme Syt4. Cet isoforme est plutôt intrigant du fait que, bien qu'il contienne le domaine C2A, il ne peut se lier au calcium à cause d'une substitution d'acide aminé (Dai et al., 2004; Fukuda et al., 1996; von Poser et al., 1997). Syt4 est cependant capable de lier le complexe SNARE sans la présence de calcium (Chapman et al., 1998; C.-T. Wang et al., 2003). À cause de sa mutation, on soupçonne que Syt4 serait un régulateur négatif de l'exocytose. En effet, une surexpression de Syt4 diminue la libération évoquée chez la drosophile (Littleton et al., 1999). On retrouve un phénotype semblable dans des cellules PC12 où une surexpression de Syt4 diminue la fréquence de libération et une augmentation de la durée

d'évènement *kiss-and-run*. À l'opposé, on observe que Syt4 peut aussi agir comme régulateur positif de l'exocytose. Une première étude démontre que, suite à une mutation dans le domaine de liaison au calcium dans les Syt1, Syt4 est capable de substituer pour l'isoforme altérée (I. M. Robinson et al., 2002). Les auteurs concluent que, bien que Syt4 ne contient pas le domaine C2A pour se lier au calcium, il peut tout de même promouvoir la libération. Plusieurs études subséquentes ont confirmé ce rôle positif de Syt4 dans la libération calcium-dépendante. De plus, il a été montré que Syt4 est impliqué dans la relâche calcium-dépendante de glutamate dans les astrocytes (Q. Zhang et al., 2004). Cette même étude a démontré aussi que le domaine C2B intact des Syt4 agit comme senseur calcique. En effet, ils ont observé que la réexpression de Syt4 dans des astrocytes déficients en Syt4 rétablit la libération de glutamate, tandis que l'expression d'un Syt4 dont le domaine C2B est muté n'a eu aucun effet. Enfin, dans la glande pituitaire postérieure de la souris, Syt4 peut avoir un effet soit négatif soit positif sur la libération en fonction de la concentration en calcium, ce qui suggère que la fonction de Syt4 soit modulée par les conditions physiologiques (Z. Zhang et al., 2009).

La localisation subcellulaire de Syt4 diffère selon les études, probablement à cause des différents anticorps utilisés et du fait que leur spécificité n'a pas été démontré. Or, Syt4 ne semble pas co-localiser avec Syt1 sur les vésicules synaptiques même si les deux protéines semblent agir ensemble dans la relâche (Ibata et al., 2000, 2002). Cependant, une étude a démontré que Syt4 est localisé sur des vésicules contenant de le BDNF au niveau des axones et des dendrites de neurones d'hippocampe chez la souris (Dean et al., 2009). Enfin, on reporte aussi que cet isoforme se retrouve sur les vésicules à corps denses de cellules PC12 (Fukuda et al., 2003).

Dans les neurones DAergiques, Syt4 est présent dans le compartiment STD et absent des terminaisons axonales. En effet, la localisation subcellulaire est limitée au compartiment STD et

une diminution de l'expression de Syt4 par siARN diminue seulement la relâche STD (Delignat-Lavaud et al., 2022; Mendez et al., 2011).

1.2.3.2. *Synaptotagmine 7*

Les fonctions de Syt7 sont diverses compte tenu son expression ubiquitaire dans le corps (Li et al., 1995). On retrouve plusieurs études contradictoires sur la localisation subcellulaire de cet isoforme. Certains reportent que la Syt7 est exprimée sur la surface des vésicules à corps dense de cellules PC12 (Bendahmane et al., 2018; Fukuda et al., 2004; Rao et al., 2014; P. Wang et al., 2005; Z. Zhang et al., 2011). D'autres localisent la Syt7 sur la membrane plasmique des terminaisons axonales de neurones d'hippocampe (Sugita et al., 2001; Vevea et al., 2021; Virmani et al., 2003). En effet, la spectrométrie en masse démontre que Syt7 n'est pas exprimé sur les vésicules synaptiques des neurones de rats (Takamori et al., 2006). Or, on pourrait attribuer ces résultats contradictoires à des différences liées au type cellulaire.

Les premières études fonctionnelles ont démontré qu'une surexpression de ce gène entraîne une augmentation dans le recyclage des vésicules synaptiques, démontrant un lien avec l'exocytose. Or, une étude subséquente sur le KO de Syt7 ne produit aucun effet sur les synapses de neurones GABAergiques (Maximov et al., 2008). Cependant, leur abondance au niveau des terminaisons, leur haute affinité au calcium et leur cinétique lente pointent tous vers une implication dans la relâche asynchrone (Bhalla et al., 2005; Hui et al., 2005). Compatible avec cette possibilité, l'impact d'un KO de Syt7 n'est seulement observable qu'après des stimulations répétées, et ce, seulement après l'élimination de la composante synchrone de la relâche (Bacaj et al., 2013). Par ailleurs, Syt7 contribue à la facilitation de la relâche de neurotransmetteurs où une

deuxième stimulation rapprochée dans le temps augmenterait la relâche induite par une première stimulation (C. Chen et al., 2017; Jackman et al., 2016). Syt7 permettrait donc de renforcer la relâche synchrone médiée par d'autres synaptotagmines.

Une caractéristique intéressante de Syt7 est son affinité au calcium. On retrouve que cet isoforme peut déclencher la libération à des niveaux très faibles de calcium extracellulaires, soit à des niveaux 1000 fois moindre ceux de Syt1. La libération STD nécessitant très peu de calcium, Syt7 serait une candidate potentielle comme senseur calcique dans ce type de libération (B. T. Chen et al., 2011a; B. T. Chen & Rice, 2001). C'est ainsi que Mendez et al. (2011) ont investigué l'implication de Syt7 dans la libération STD en utilisant des milieux de culture à concentrations faibles en calcium, favorisant ainsi la détection de la libération STD. Dans ces conditions, ils ont observé qu'une diminution de l'expression de Syt7 par siARN diminue la libération STD démontrant son implication fonctionnelle dans la libération STD (Delignat-Lavaud et al., 2022b; Mendez et al., 2011).

1.2.3.3. Synaptotagmine 1

Syt1 est une des isoformes les plus étudiée pour son rôle dans l'exocytose rapide. On a d'abord soupçonné que Syt1 joue un rôle clé de senseur calcique dans la fusion des vésicules synaptiques à cause du fait qu'elle est l'isoforme le plus exprimée dans les neurones, représentant près de 7% de la quantité totale de protéine vésiculaire (Brose et al., 1992; Chapman & Jahn, 1994). Cet isoforme a une affinité moindre au calcium comparativement aux isoformes impliquées dans la libération asynchrone ou spontanée, tels Syt7 et Syt4, et une cinétique de désassemblage rapide (Li et al., 1995; Sugita et al., 2001). Syt1 est donc la candidate idéale pour la libération

rapide synchrone puisque seuls de larges influx de calcium induits par un potentiel d'action permettent d'activer Syt1. En effet, on observe qu'un KO de Syt1 chez la souris abolit la libération évoquée de glutamate au niveau des synapses de neurones d'hippocampe tout en préservant la libération asynchrone et spontanée (Geppert et al., 1994). Son activité dépendrait de la liaison au calcium sur ses 5 sites de liaison (Fernández-Chacón et al., 2001; Ubach et al., 1998). Par ailleurs, Syt1 inhibe la relâche spontanée miniature (ou *spontaneous miniature vesicle release*) en se liant au complexe SNARE, limitant la fusion du complexe. La fusion de la vésicule synaptique ne se fait que lorsque le calcium se lie au Syt1 (Broadie et al., 1994; Chicka et al., 2008; H. Liu et al., 2009). Syt1 se lierait donc au complexe SNARE en absence de calcium, mais nécessiterait sa présence pour activer l'ouverture de port de fusion (Sudhof, 2004). Enfin, le rôle de Syt1 dans l'exocytose demeure dans les terminaisons axonales présynaptiques (Dean et al., 2012; DiAntonio & Schwarz, 1994; Geppert et al., 1994). En effet, dans les neurones DAergiques, Syt1 serait seulement impliquée dans la libération axonale synchrone (Banerjee et al., 2020; Delignat-Lavaud et al., 2021; Mendez et al., 2011).

1.3. La maladie de Parkinson (MP)

En lien avec leurs multiples fonctions, la dégénérescence et dérégulation des neurones DAergiques entraîne plusieurs maladies neurodégénératives. Certains des principaux symptômes moteurs de la MP sont causés par la perte des neurones DAergiques de la SNc et les perturbations de la circuiterie des ganglions de la base qui en résulte. On peut retrouver les premières descriptions des symptômes moteurs de cette maladie neurodégénérative dans l'essai de James Parkinson *An essay on the Shaking Palsy* en 1817. Depuis cette date, on a découvert que cette

maladie est non seulement caractérisée par des symptômes moteurs (bradykinésie, tremblements au repos, rigidité) mais aussi par des symptômes non-moteurs (troubles du sommeil, cognitifs et sensitifs). L'hypothèse d'un rôle important de la perte des neurones DAergiques de la SNc dans les symptômes moteurs repose en grande partie sur les recherches pionnières d'Édouard Brissaud (Paris) et, plus tard, de Constantin Trétiakoff (Paris), Arvid Carlsson (Stockhom), Oleh Hornykiewicz (Vienne) et André Barbeau (Montréal) qui démontrent l'importance et le rôle central de la DA dans la MP.

1.3.1. Vulnérabilité sélective dans la MP

Les symptômes moteurs de la MP sont associés à une large perte de neurones DAergiques dans la SNc. Une perte de neurones semble également survenir dans d'autres régions dont le locus coeruleus, le noyau du raphé et l'hypothalamus, bien que la qualité des données appuyant ces conclusions soient inégales (Giguère, Burke Nanni, et al., 2018). On retrouve même la présence d'un marqueur spécifique de la maladie, les corps de Lewy, dans toutes ces régions. Les corps de Lewy sont des agrégats de protéines composés principalement d'alpha-synucléine. Cette dernière serait impliquée dans la relâche synaptique en interagissant avec le complexe SNARE (Burré et al., 2010; Chandra et al., 2005; D. L. Fortin et al., 2005). Le rôle de l'alpha-synucléine dans la MP n'est pas entièrement clarifié par la communauté scientifique, mais celle-ci jouerait un rôle dans la dégénérescence des neurones, puisque des mutations du gène d'alpha-synucléine sont étroitement liées au développement de la MP. Dans des modèles animaux, la surexpression de l'alpha-synucléine induit la mort des neurones DA de la SNc (Löw & Aebischer, 2012). Ces modèles incluent des souris transgéniques exprimant des niveaux plus élevés de l'alpha-

synucléine, ou alors l'utilisation de vecteurs viraux (Chesselet & Richter, 2011; Kirik et al., 2002; Oliveras-Salvá et al., 2013; Tofaris et al., 2006; Wakamatsu et al., 2008).

La dégénérescence étant limitée à certaines populations neuronales, on peut se questionner sur les caractéristiques communes à ces neurones qui leur confèrent une vulnérabilité sélective. Certains chercheurs attribuent la dégénérescence des neurones DAergiques à la toxicité de la DA (Filloux & Townsend, 1993; Fornstedt, 1990; Greenamyre & Hastings, 2004; Michel & Hefti, 1990; Tanaka et al., 1991; Zecca et al., 2003). L'oxydation de la DA peut produire des quinones, augmentant le stress oxydatif de la cellule. Mais ceci n'expliquerait pas pourquoi les neurones DAergiques de l'ATV sont moins affectés dans la MP comparativement à ceux de la SNc, ni pourquoi certains noyaux non DAergiques sont aussi touchés.

D'un autre côté, certains émettent l'hypothèse que cette dégénérescence serait en relation avec le fardeau énergétique associé à l'activité de type *pacemaker* des neurones DAergiques (Becker et al., 2008; Chan et al., 2007; Guzman et al., 2009, 2010). Or, les neurones de la SNc sont disproportionnellement affectés par la MP comparativement à ceux de l'ATV, même si les neurones de cette région ont aussi une activité *pacemaker* robuste (Johnson & North, 1992; Khaliq & Bean, 2010; Korotkova et al., 2003; Koyama et al., 2005; Neuhoff et al., 2002). La différence entre la sensibilité des deux régions à cette activité pourrait s'expliquer en partie par des différences dans les mécanismes de l'activité *pacemaker*. En effet, il a été observé que les neurones DAergiques de la SNc montrent une entrée plus importante de calcium que ceux de l'ATV et proposé que ces niveaux élevés de calcium pourraient contribuer à la vulnérabilité des neurones de la SNc à cause des hauts niveaux d'activité mitochondriale requis pour produire l'ATP nécessaire aux pompes à calcium membranaires et au stress oxydatif associé à cette activité mitochondriale (Chan et al., 2007; Khaliq & Bean, 2010). De plus, les neurones DAergiques de

l'ATV expriment plus de calbindine, un tampon calcique qui régule les niveaux de Ca^{2+} intracellulaires, que ceux de la SN (Doposo-Reyes et al., 2014).

Une autre hypothèse, conceptuellement reliée à la précédente, serait que la grande vulnérabilité des neurones DAergiques soit associée à taille exceptionnelle de leur arborisation axonale. Il a été proposé que ceci soit une source importante de demande énergétique et donc d'activité mitochondriale et de stress oxydatif (Bolam & Pissadaki, 2012; Giguère et al., 2019; Giguère, Pacelli, et al., 2018; Pacelli et al., 2015; Parent & Parent, 2006). En effet, l'arborisation axonale d'un seul neurone DAergique peut couvrir jusqu'à près de 6% du striatum dorsal (Gauthier et al., 1999; Matsuda et al., 2009a; Prensa & Parent, 2001). On note aussi une arborisation axonale importante chez les autres neurones touchés par la MP, tels que les neurones cholinergiques du noyau pédonculopontin et les neurones noradrénergiques du locus coeruleus, appuyant l'hypothèse que le fardeau énergétique relié à ces arborisations soit en cause (Braak et al., 2002, 2004). En appui à cette hypothèse, on observe que la diminution de l'arborisation axonale des neurones DAergiques diminue la vulnérabilité des neurones DAergiques de la SN et à l'inverse, l'augmentation de son arborisation augmente sa vulnérabilité (Giguère et al., 2019; Pacelli et al., 2015).

Un niveau de stress oxydatif élevé pourrait donc être un déclencheur majeur de la mort des neurones DAergiques et autres neurones vulnérables dans la MP. Ce phénomène découlerait de l'activité des mitochondries, qui produisent de l'ATP grâce à un gradient de protons formé par une chaîne de transport d'électrons. Ces électrons peuvent se lier à l'oxygène pour produire du H_2O . Or, la production de l'eau génère aussi des réactifs à l'oxygène (ROS), tels que les ions superoxyde et peroxyde. Plusieurs modèles animaux et cellulaires de la MP ciblent ce processus pour déstabiliser le gradient de protons et augmenter la production de ROS. Parmi eux, un modèle

couramment utilisé est celui de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). La 6-OHDA est soit injectée dans le striatum, le faisceau médian du télencéphale ou la SN. La 6-OHDA rentre dans le neurone par le DAT et augmente la production de ROS en inhibant le complexe I mitochondrial, induisant un stress oxydatif important et toxique (Y. Glinka et al., 1996; Y. Y. Glinka & Youdim, 1995; Kupsch et al., 2014). Le lien entre la dérégulation de la mitochondrie, la production massive de ROS et la mort neuronale est aussi mise en évidence par l'utilisation de la toxine 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) pour modéliser la MP. La MPTP est d'abord converti en MPP⁺ par des astrocytes, pour ensuite s'introduire dans les neurones DAergiques à travers le DAT. La MPP⁺ aurait un effet délétère sur les neurones en inhibant le complexe I mitochondrial, de même que la 6-OHDA, induisant l'accumulation de réactifs à l'oxygène (ROS). Ceci résulte en un stress oxydatif important dans la cellule et, ultimement, conduit à la mort neuronale (Nicklas et al., 1985; Tipton & Singer, 1993).

1.3.2. L'hypothèse de la mort rétrograde

Une hypothèse émergente dans la recherche sur la MP, connue sous le nom de *dying-back hypothesis* (ou hypothèse de la mort rétrograde), avance que la mort des neurones DAergiques commenceraient non pas dans le corps cellulaire des neurones, mais plutôt au niveau de leur axone. Le phénomène de la mort rétrograde est d'autant plus évident lorsqu'on considère que les symptômes moteurs de patients parkinsoniens n'apparaissent que lorsque plus de 70% des terminaisons DAergiques ont dégénéré (Bernheimer et al., 1973; Riederer & Wuketich, 1976). Oleh Hornykiewicz a d'abord proposé cette hypothèse lorsqu'il a observé que la perte de DA est plus élevée dans le striatum, où on retrouve les axones DAergiques, que dans la SN (Hornykiewicz,

1998). Il a appuyé son hypothèse sur le fait que la 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), une drogue utilisée comme modèle de la MP, rentre au niveau du DAT qui se retrouve sur les axones des neurones DAergiques pour induire la mort des neurones. On recense également des études qui démontrent que l'alpha-synucléine exerce d'abord un effet toxique sur les axones (Calo et al., 2016). Une étude a examiné l'accumulation de l'alpha-synucléine dans les neurones autonomes périphériques qui sont affectés dans la MP. Ils ont observé que la mort des axones distaux dans le tissu cardiaque et du ganglion sympathique précède celle des corps cellulaires (Orimo et al., 2008). Ceci a aussi été démontré dans un modèle de souris transgéniques exprimant une forme tronquée de l'alpha-synucléine où on observe une diminution importante de DA dans le striatum sans perte de neurones DAergiques (Tofaris et al., 2006).

Au niveau fonctionnel, on observe aussi une forte résilience de la libération STD de la DA dans des modèles animaux de la MP. Une étude réalisée par González-Rodríguez et al. (2021) a démontré que la libération STD est beaucoup plus résistante à une atteinte mitochondriale que ne l'est la libération axonale. L'étude a utilisé des souris ayant un KO conditionnel de *Ndufs2*, une sous-unité du complexe mitochondrial I, pour induire un stress oxydatif dans les neurones DAergiques, créant un phénotype parkinsonien. Ils ont constaté qu'à 30 jours postnatal, il y a abolition totale de la libération de DA dans le striatum, mais aucune différence significative dans la SN (González-Rodríguez et al., 2021a). Cette disparité entre les axones dans le striatum et les corps cellulaires des neurones DAergiques dans le mésencéphale est présentement inexplicée. Or, il serait d'intérêt d'évaluer la contribution de la libération axonale à la résilience de la libération dans le mésencéphale dans la MP. Une étude a observé qu'après une lésion 6-OHDA chez le rat, il y a un bourgeonnement axonale dans la SNc en réponse à la diminution importante de la

libération dans le striatum (Xavier et al., 1994). Ces collatérales axonales contribueraient donc à la libération de la DA dans le mésencéphale

Une revue de Burke et O'Malley met en évidence l'importance d'étudier la mort axonale dans un contexte de MP. Ils décrivent que la majorité des thérapies étudiées cherchent à faire survivre le corps cellulaire des neurones DAergiques ce qui, en bout de ligne, devrait aider à la survie de leurs axones. Cependant, qu'en serait-il si la mort commençait au niveau des axones et que, lorsque la dégénérescence atteint le soma, les dommages deviendraient irréversibles? Les neurones DAergiques ont une arborisation de taille particulièrement importante et il est donc d'autant plus évident que la perte d'axones entraînerait une grande déficience auprès des patients atteints de la MP (Burke & O'Malley, 2013).

Chapitre 2 – Données récentes et objectifs

Dans notre laboratoire, nous avons récemment étudié plus à fond la fonction de Syt1 dans les neurones DAergiques par une approche de KO conditionnel (Syt1 cKO). La démonstration antérieure de son implication dans la relâche axonale nous a amené à l'hypothèse que seule la libération axonale de DA serait affectée par le cKO de Syt1 dans les neurones DAergiques. Or, dans ces souris, en plus d'une baisse drastique (près de 95%) de la libération de DA au niveau axonal dans le striatum, la libération dans le mésencéphale a aussi été fortement réduite, soit une diminution de près de 68% dans l'ATV et de 65% dans la SN (Delignat-Lavaud et al., 2021). Nous proposons deux hypothèses pour expliquer ces résultats. Une première serait que Syt1 soit localisée en partie au niveau STD et jouerait donc un rôle direct dans la libération STD des neurones DAergiques. Cependant, aucune étude antérieure n'a montré de façon convaincante la présence de Syt1 au niveau dendritique ou somatique dans des neurones. Notre deuxième hypothèse serait donc que des collatérales axonales locales des neurones DAergiques soient présentes dans la SN et l'ATV, contribuant ainsi à la libération de DA dans ces régions. Tel que mentionné précédemment, certaines études antérieures ont suggéré que l'ATV contienne des terminaisons axonales locales. Cependant, la plupart suggèrent que la SN serait dépourvue de telles terminaisons axonales et que seule la libération STD contribuerait à la relâche de DA. Or, ces études antérieures étaient principalement qualitatives ou indirectes. Il manque donc de données probantes sur la possibilité que des axones dits « de passage » pourraient aussi libérer de la DA par transmission volumique au niveau de leur varicosités.

Dans la présente série d'études, nous avons d'abord comme objectif d'évaluer plus directement la localisation subcellulaire de Syt1 dans les neurones DAergiques par plusieurs approches, dont la microscopie confocale à balayage et la microscopie à super-résolution (SR-

SIM). Nous avons évalué la colocalisation de Syt1 avec TH, pour marquer les neurones DAergiques, et avec VMAT2, qui est impliquée dans la libération STD et axonale. Les niveaux de colocalisation ont été déterminés pour le compartiment STD et axonal. Notre hypothèse était que, puisque la localisation de Syt1 semble être exclusivement au niveau axonal (Banerjee et al., 2020; Mendez et al., 2011), Syt1 devrait colocaliser avec TH et VMAT2 seulement au niveau des axones et que cette même colocalisation devrait être moindre, même nulle, du côté STD.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons testé l'hypothèse de la présence de collatérales axonales DAergiques dans la SN et l'ATV. Afin de tester cette hypothèse, nous avons injecté un adénovirus-associé (AAV) permettant d'exprimer la protéine fluorescente eYFP sélectivement dans les neurones DAergiques dans le mésencéphale. La présence de collatérales axonales a ensuite été évaluée par microscopie confocale et par une analyse de colocalisation de eYFP et Syt1, ainsi que par une analyse complémentaire par microscopie électronique à transmission. Notre objectif avec le marquage Syt1 était d'évaluer s'il y a présence de varicosités de type axonale et donc des sites potentiels de libération de DA dans les varicosités axonales des axones dites « de passage ». Notre hypothèse était que des collatérales axonales avec des varicosités positives pour Syt1 devraient se retrouver tant dans l'ATV que dans la SNc.

Enfin, dans une dernière série d'expériences, nous voulons caractériser l'implication de collatérales axonales dans la résilience de la libération STD de la SN dans un modèle de la MP. Notre hypothèse était que dans ce modèle, obtenu par une injection de 6-OHDA dans le striatum, la résilience de la libération de DA pourrait être en partie due à une adaptation des collatérales axonales locales des neurones DAergiques.

Chapitre 3 – Dopamine neuron axon collaterals with axonal-like varicosities are abundant in both the ventral tegmental area and the substantia nigra pars compacta: implications for the detection of somatodendritic dopamine release (Article)

L'article qui suit tente de démystifier la contribution de Syt1 à la libération de DA dans le mésencéphale en lien avec nos résultats obtenus sur les KO conditionnels de Syt1. On a d'abord étudié la localisation de Syt1 dans les neurones DAergiques pour déterminer si cet isoforme est impliqué dans la libération STD. Syt1 étant absent du compartiment STD, on a ensuite étudié la contribution de la libération axonale à la relâche de DA de le mésencéphale. À l'aide de la microscopie confocale et électronique, nous avons observé que le mésencéphale contient plusieurs varicosités similaires à ceux retrouvées dans le striatum et que certaines forment des synapses locales.

Ensuite, nous avons exploré la contribution de la libération axonale à la résilience de la libération mésencéphalique dans un contexte pathologique. En lien avec l'hypothèse de la mort rétrograde, nous avons observé que la libération de DA dans la SNc persiste plus longtemps que celle dans le striatum suite dans un modèle de lésion 6-OHDA. Nous avons ensuite démontré que cette résistance pourrait être attribuée à une augmentation de l'expression de Syt1 dans les axones DAergiques locaux.

Contribution des auteurs

Jana Kano : Conception et exécution des expériences reliées à la localisation de Syt1 par super-résolution et à la présence de collatérales axonales locales par microscopie confocale et électronique. Analyse de données et écriture du manuscrit.

Benoît Délignat-Lavaud : Exécution des expériences et analyse des données reliées aux enregistrements électrophysiologiques et écriture du manuscrit.

Constantin Delmas : Préparation de tissus pour l'imagerie en microscopie électronique.

Soraya Paquereau--Gaboreau : Imagerie liée à la compensation axonale dans le mésencéphale dans un contexte pathologique.

Alex Tchung : Scripts d'analyse de données.

Marie-Josée Bourque : Préparation de cultures cellulaires.

Martin Parent : Conception et exécution des expériences liées à la microscopie électronique.

Louis-Éric Trudeau : Conception, coordination et supervision du projet et écriture du manuscrit.

En préparation

Dopamine neuron axon collaterals with axonal-like varicosities are abundant in both the ventral tegmental area and the substantia nigra pars compacta: implications for the detection of somatodendritic dopamine release.

**Jana Kano^{1,2,3}, Benoît Délignat-Lavaud^{1,2,3}, Constantin Delmas⁴, Soraya Paquereau—
Gaboreau^{1,2,3}, Alex Tchung^{1,2,3}, Marie-Josée Bourque^{1,2,3}, Martin Parent⁴, Louis-Éric
Trudeau^{1,2,3}**

From ¹ Department of pharmacology and physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal,
² Department of neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, ³ Research Group on
Neural Signaling and Circuitry (SNC), ⁴ Center for Interdisciplinary Research on the Brain and
Learning (CIRCA), CERVO research center, Université Laval

3.1. Abstract

Accumulating evidence supports the hypothesis that in Parkinson's disease (PD) animal models, dopamine (DA) release detected in the cell body region in ventral tegmental area (VTA) and the substantia nigra *pars compacta* (SNc) is more resilient and is unaffected at early stages of the degenerative process. This form of DA release, typically called somatodendritic (STD) DA release, has been hypothesized to support basal ganglia circuit function and motor behaviors. It is thus critical to better understand its morphological and molecular underpinnings. Evaluating the contribution of the axonal exocytosis calcium sensor synaptotagmin 1 (Syt1) in DA release, we recently made the surprising observation that genetic deletion of this sensor in DA neurons not only abrogates axonal DA release, but also severely impairs DA release in the VTA and SNc. This raises the hypothesis that axonal DA release is more pervasive than previously thought in these two brain regions, or that Syt1 is also abundant in the STD compartment of these neurons and contributes to STD DA release. Here we aimed to clarify this controversy by further evaluating the abundance of local DA neuron axon collaterals in the VTA and SNc and the presence of Syt1 in the STD domain of DA neurons. We also examined the resilience of DA release and the expression of Syt1 in the mesencephalon in a 6-OHDA lesion model. A viral labeling approach was first used to sparsely label DA neuron and track its axonal and dendritic processes in the VTA, SNc and striatum. Using confocal and super-resolution imaging, we find that MAP2-negative axonal-like varicosities are abundant in both the VTA and SNc. While Syt1 was found to be abundant in striatal axon terminals and in a subset of DAergic axonal-like varicosities in the VTA and SNc, its presence in the STD domain was very low or undetectable, suggesting that most Syt1-dependent DA release in the mesencephalon is likely to originate from local DA neuron axon collaterals. Images obtained with transmission electron microscopy also support the presence in

the VTA and SNc of DAergic varicosities similar to those found in the striatum. After dorsal striatal 6-OHDA, we found that while DA release in the striatum was abolished at 1 and 14 days, DA release in the SNc was highly resilient with most of the release still detected at 14 days. Interestingly, Syt1 expression in the local axons of surviving SNc DA neurons was increased at this later time point, suggesting a possible involvement in compensatory mechanisms to sustain DA release. Together these findings suggest that DA release detected in both the VTA and SNc are likely to include a substantial axonal contribution and that DA release detected in these areas should be referred to as “mesencephalic DA release” so as not to imply a pure STD origin. Our work also suggests that release occurring from such local axon collaterals are likely to explain at least in part the high resilience of DA release at early stages of PD.

3.2. Introduction

Dopamine (DA) neurons of the mesencephalon play a key role in motor control, motivated behaviors and cognition (Schultz, 2007; Surmeier et al., 2014). It has been known for decades that DA neurons can release DA not only from axon terminals by a classical exocytosis mechanism (G. D. Fortin et al., 2006a; C. Liu & Kaeser, 2019), but also through their somatodendritic (STD) compartment, as demonstrated by electrochemical and electrophysiological approaches in the ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra *pars compacta* (SNc) (S. Cragg et al., 1997; Elverfors et al., 1997; Rice et al., 1997b; Beckstead et al., 2004b). DA released in these regions is believed to contribute, along with striatal DA release, to regulation of basal ganglia circuit function and to motor behaviors (Robertson & Robertson, 1989; Ann D. Crocker, 1997; Bergquist et al., 2003; Andersson et al., 2006).

Interestingly, DA release occurring in the VTA and SNc appears to be more resilient compared to striatal axonal DA release in animal models of Parkinson's disease. Previous work in rats measuring baseline DA release in the mesencephalon by microdialysis showed that DA release measured in this region is preserved for longer periods of time compared to axonal DA release following a 6-OHDA lesion (Hoffman et al., 1997; Sarre et al., 2004). Similarly, in a recently developed PD mouse model with a genetic disruption of mitochondrial complex I function, a progressive impairment of axonal DA release was observed, with levodopa-responsive parkinsonism only emerging later after the loss of DA release in the substantia nigra (González-Rodríguez et al., 2021b). Why this is the case is unknown. It is unclear if this is due to a preservation of activity-dependent STD DA release or to the contribution of DA release possibly occurring from local axon collaterals.

In this context, a re-evaluation of the morphological and molecular underpinnings of DA release occurring in the mesencephalon may be required. The term “somatodendritic” describes evoked DA release in the SNc and VTA, in which somata and dendrites intermingle. The mechanisms and regulation of STD DA release have been studied over the past decades primarily in the SNc, a region in which DA release has been thought to be exclusively somatodendritic, with no contribution of local axon collaterals (Juraska et al., 1977b; Wassef et al., 1981b; Matsuda et al., 2009b). Conversely, other studies have suggested that the VTA has sparse DAergic axon collaterals, as well as axons from the SNc (Deutch et al., 1988b; Bayer & Pickel, 1990b). However, these neuroanatomical studies were mostly qualitative and mostly based on tyrosine-hydroxylase (TH) immunolabelling, an approach that is not ideal considering that this protein is also found in noradrenergic neurons that are known to innervate the ventral mesencephalon, and especially the VTA (Jones & Moore, 1977; Collingridge et al., 1979; Mejías-Aponte et al., 2009b).

Recently, genetic deletion of the calcium sensor synaptotagmin-1 (Syt1) in DA neurons was demonstrated to abrogate phasic axonal DA release measured by fast scan cyclic voltammetry in striatal slices (Delignat-Lavaud et al., 2021). Unexpectedly, in these same conditional Syt1 KO^{DA} mice, electrically evoked DA release was also strongly reduced both in the VTA and SNc (by $\approx 68\%$ and 65% respectively). Arguing in favor of the implication of local axonal DA release in these two regions, mesencephalic DA release was unimpacted by Syt1 deletion when triggered using a somatodendrically express channelrhodopsin and tetrodotoxin to block any contribution of axonal release. Phasic release of DA release measured by D2 mediated currents in the SNc was also found to be abolished in RIM conditional KO^{DA} mice. Neither RIM nor Syt1 have previously been demonstrated to be present in the STD compartment of neurons (C. Liu et al., 2018a; Ducrot et al., 2020). As such, these results support the idea that the phasic DA release detected in both the

VTA and SNc derives from a mix of axonal and STD release. In contrast, somatodendrically expressed calcium sensors Syt4 and Syt7 were demonstrated to participate in STD DA release, both *in vitro* (Mendez et al., 2011) and *in vivo* (Delignat-Lavaud et al., 2022b), but their constitutive deletion only partially impaired DA release in both studies, suggesting the existence of another mechanism of release that could possibly come from the axonal compartment. A dual nature of released DA in the mesencephalon was also previously suggested based on an analysis of the calcium-dependency of DA release in VTA from guinea pigs (B. T. Chen et al., 2011b), although other work has provided support for similar calcium-dependency of DA release in the striatum and mesencephalon (Beckstead et al., 2004b, 2007; Ford et al., 2009b; Courtney et al., 2012b; Delignat-Lavaud et al., 2022b).

Because the available anatomical data suggesting that DA containing axonal varicosities exist within the SN and VTA are limited, we aimed here to specifically re-evaluate the existence of DA neuron axonal collaterals within the mesencephalon using a combination of sparse genetic labelling and confocal and electron microscopy. We also re-examined DA release occurring in the SNc after a striatal 6-OHDA lesion in order to determine whether expression of Syt1 in local DAergic axonal collaterals could be altered and thus implicated in the relative resilience of DA release in this brain region. This was particularly interesting in the context of previous work showing the existence of compensatory axonal sprouting in the mesencephalon after a partial 6-OHDA lesion (Xavier et al., 1994).

Our work suggests that the contribution of local DAergic axon collaterals may have been previously underestimated and that DAergic axonal plasticity in the mesencephalon may perhaps contribute to the resilience of DA release in the SNc at early stages of PD.

3.3. Results

3.3.1. Syt1 is not detected in the STD compartment of DA neurons

Previous results showed a robust decrease of DA release in the VTA and SNc after conditional Syt1 KO in DA neurons (Delignat-Lavaud et al., 2021). If this is due to a contribution of Syt1 to STD DA release, this protein should be detectable in the cell body and dendrites of DA neurons. We first reevaluated the subcellular localization of Syt1 in cultured mouse DA neurons using super-resolution structured illumination (SR-SIM) microscopy in Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice. In axon terminal fields, we observed a high level of colocalization of Syt1 and TH (Fig. 1A), as illustrated by a positive Pearson's correlation coefficient (PCC) (Fig. 1B). This colocalization was not observed in axonal fields of Syt1^{-/-} mice, confirming the specificity of the labelling. No similar colocalization was observed in the STD domain of DA neurons (Fig. 1A and B).

Vesicular compartments in the STD compartment of DA neurons contain the vesicular monoamine transporter VMAT2, which has been shown to be implicated in both axonal and STD DA release (Croft et al., 2005; Fon et al., 1997; Nirenberg et al., 1996; Y. M. Wang et al., 1997). As such, this protein thus represents a good marker of the release-competent vesicular pool of the STD compartment of DA neurons. We thus examined the localization of VMAT2 in the STD compartment of DA neurons and further searched for a possible localization of Syt1 and VMAT2 in the STD compartment of DA neurons. We first confirmed that at the subcellular level, VMAT2 was clearly detectable in the cell body and dendrites of cultured DA neurons (Fig. 1E). The colocalization of VMAT2 with TH in the STD compartment was lower levels than in the axonal varicosities (Fig. 1F), as expected because VMAT2 only occupies a small proportion of the surface area of the cell body of DA neurons, while it occupies a large fraction of the surface area of axon

terminals (Fig. 1D). In line with this interpretation, calculation of the M2 Manders coefficient, representing the overlap of VMAT2 on that of TH shows no significant difference between axons and the STD compartment (Fig. 1G), while the M1 Manders coefficient representing the overlap of TH on that of VMAT2 revealed a large difference between the two compartments (Fig. 1H). Similarly to the colocalization observed with TH, the colocalization of Syt1 and VMAT2 in the STD compartment was extremely low and not significantly different compared to that observed in DA neurons from Syt1^{-/-} mice (Fig. 1C and D). To the contrary, in axonal fields, a high level of colocalization between VMAT2 and Syt1 was observed (Figure 1C and D), and this was absent in DA neuron axons from Syt1^{-/-} mice, in keeping with the important role of Syt1 in axonal DA release. Globally, these results do not support the hypothesis of a strong presence of Syt1 in the cell body and dendrites of DA neurons and thus, argue against the hypothesis that STD DA release is dependent on Syt1. Rather, they support the idea that Syt1 in DA neurons is exclusively implicated in axonal neurotransmitter release.

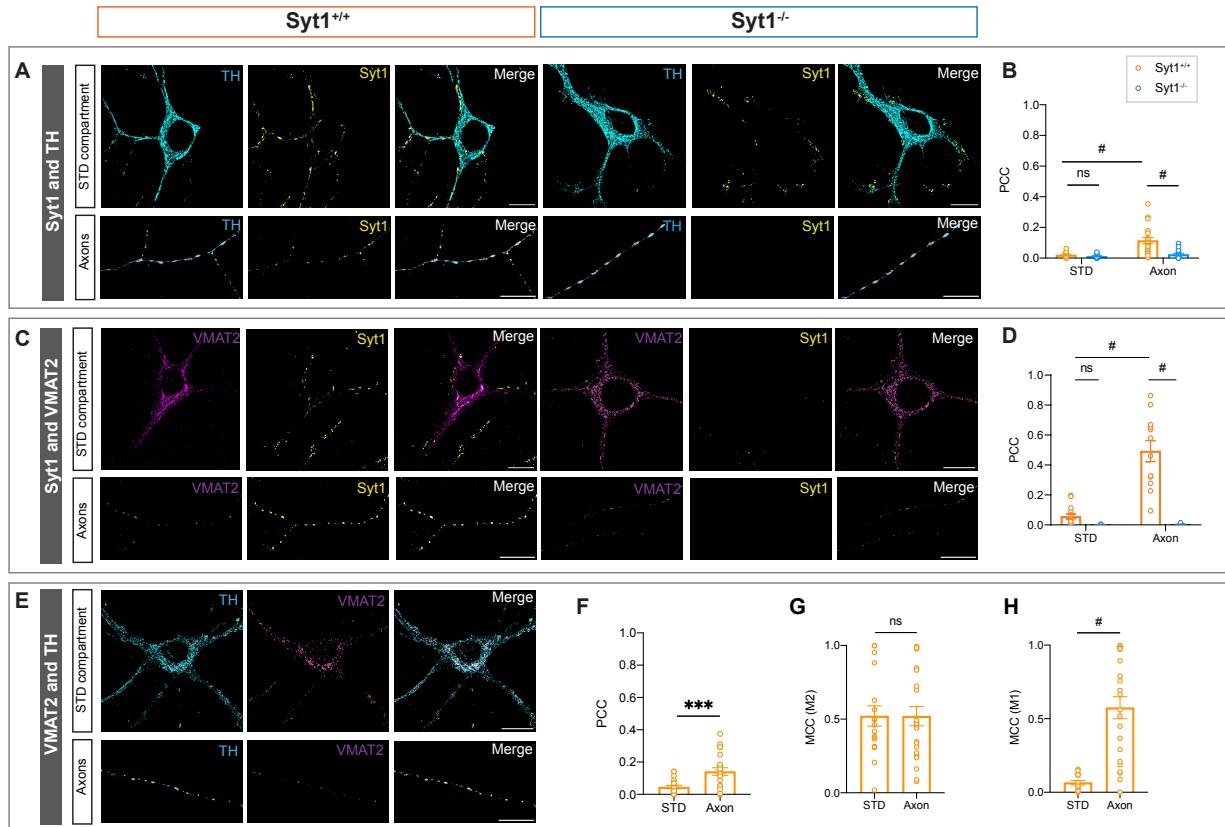


Figure 1: Syt1 does not colocalize with TH and VMAT2 in the STD compartment.

Photomicrographs illustrating Syt1 and TH (in A), Syt1 and VMAT2 (in C) and VMAT2 and TH (in E) colocalization in Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} cultured neurons. Upper panels show representative images of the STD compartment whereas the lower panels show axons of DA neurons (scale bar: 20 μ m). B, D and F show bar graphs representing the PCC of Syt1/TH, Syt1/VMAT2 and VMAT2/TH respectively. G and H show measured MCC in M1 and M2 respectively. M1 represents the proportion of VMAT2 that colocalizes with TH and M2 shows the proportion of TH signal which overlaps with VMAT2. N = 3 cultures. Error bars represent \pm SEM. The statistical analysis was carried out by a two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (ns, non-significant; ***p < 0.001; #p < 0.0001). PCC, Pearson's correlation coefficient; MCC, Manders' correlation coefficient.

3.3.2. A subset of varicosities in the midbrain are similar in size to striatal terminals

We next considered the hypothesis that the decrease in DA release in the midbrain after Syt1 cKO in DA neurons could be explained by loss of release from local DA neuron axon collaterals. Previous studies have provided some limited evidence for the presence of a small subset of local DA neuron axon terminals in the VTA, but these have been considered to be rare and not to be present in the SNc (Bayer & Pickel, 1990a; B. T. Chen et al., 2011a; Deutch et al., 1988a; Juraska et al., 1977a; Matsuda et al., 2009a; Wassef et al., 1981a). However, considering that DA neuron axons in culture establish axonal-like varicosities all along their length, including soon after its beginning (Supplementary Fig. 1, see also Ducrot et al., 2021), we hypothesized that the same may hold true in the intact brain and that DA neuron axons coursing through the VTA or SNc on their way to other structures may contain release sites for DA.

Because double-labelling for Syt1 and TH might be difficult to interpret because of the possible presence of noradrenergic axon terminals, we injected an AAV-flox-eYFP virus in the SNc or VTA of DAT^{IRES-Cre} mice to infect and highlight a subset of DA neuron axons and compare the characteristics of the varicosities they establish in the ventral midbrain and the striatum (Fig. 2A and B). We also investigated the possible presence of Syt1-positive axonal-like varicosities in the medial forebrain bundle (MFB) which contains the axons of midbrain DA neurons projecting to the striatum. We initially hypothesized that this region would be devoid of Syt1-positive release sites since it is thought to only contain projecting axons. Using immunolabelling for eYFP and Syt1 and point-scanning confocal microscopy, we observed that the SNc, VTA and MFB all contain an abundant population of axonal varicosity-like structures, similar to those found in the striatum where axonal DA release occurs (Fig. 2C).

We hypothesized that if some of the varicosities observed in the midbrain are DA release sites, they should be similar in size to those observed in the striatum. The distribution of the varicosity size shows 2 subpopulations: a group of small varicosities ($<1.07 \mu\text{m}^2$) and another with larger varicosities ($\geq 1.07 \mu\text{m}^2$) (Fig. 2D, E and F). The small varicosity population was the clearly predominant in the striatum (Fig. 2E and G), suggesting that they are likely to represent DA release sites. The SNc and VTA were similar in their profile of sizes and contained a lower proportion of small varicosities (Fig. 2G), suggesting that some of these are likely to represent structures other than axonal release sites. These results suggest that the SNc and VTA contain a similar profile of varicosity size, the smaller of which could represent possible DA release.

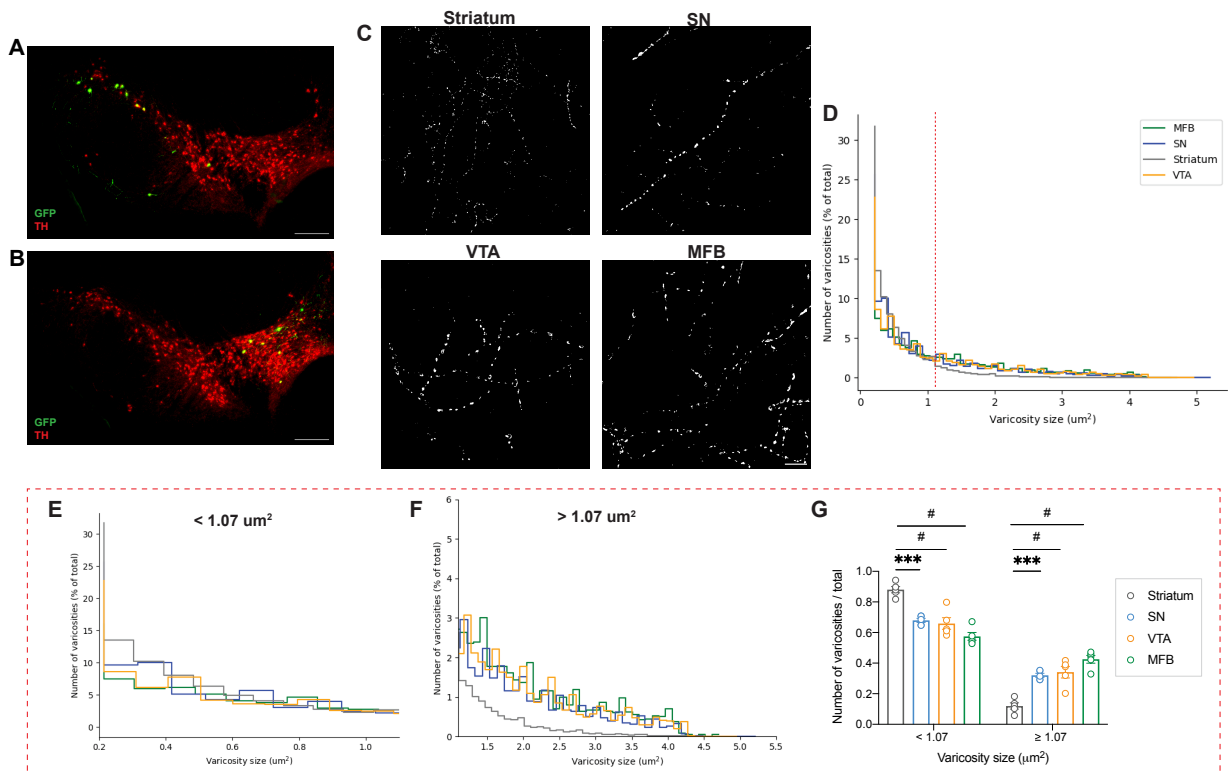


Figure 2: Axons in the midbrain, MFB and striatum all exhibit similar small varicosities.

Sparse AAV-flox-eYFP infection (A) the SNC and the VTA (B) (scale bar: 250 μm). (C) Representative images of varicosities observed in each region. Images shown are maximum z-projection of the GFP signal, which labeled the eYFP signal from viral injections (scale bar: 10 μm). (D) Bar graph representing the distribution of varicosity size in all four regions. The dashed line separates small from large varicosities. The distribution of varicosities smaller than 1.07 μm^2 is represented in (E) and the larger are represented in (F). (G) Quantitative analysis of varicosity size distribution normalized on the total number of varicosities analyzed. N = 5 brains/group. Error bars represent \pm SEM. The statistical analysis was carried out by a two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (**p < 0.001; #p < 0.0001).

We thus examined the colocalization of eYFP and Syt1 in all these regions. Because many eYFP-positive structures could represent transversely cut dendrites, we first excluded dendrites by labeling for the microtubule associated protein 2 (MAP2), which is specific to dendrites and neuronal somas. As expected, MAP2-positive fibers were more abundant in the SNc and VTA, where dendrites are present, compared to the striatum, where they have most of their terminals (Fig. 3B). However, the eYFP/MAP2 colocalization was also high in the striatum, mostly likely due to false-positive colocalization due to the resolution limits of light microscopy and the high density of dendrites from local interneurons. Unsurprisingly, we found that Syt1 and eYFP were highly colocalized in the striatum, at the axon terminal level (Fig. 3C). In the SNc, VTA, and MFB, Syt1 and eYFP were also colocalized in many small MAP2-negative structures (Fig. 3A), but to a much lower extent compared to the striatum (Fig. 3B), suggesting that a subset represents putative axonal-like varicosities.

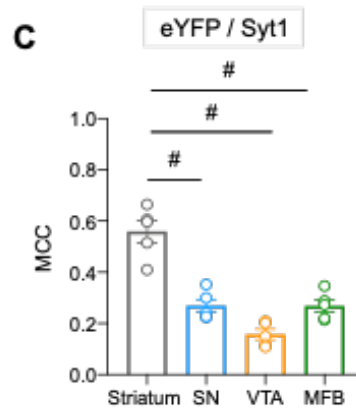
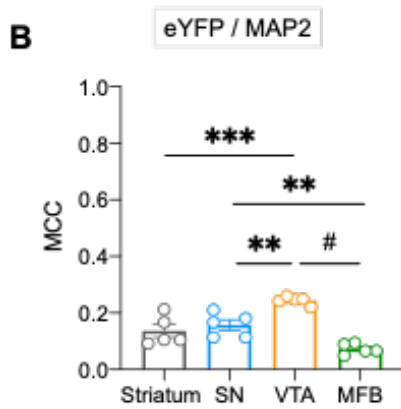
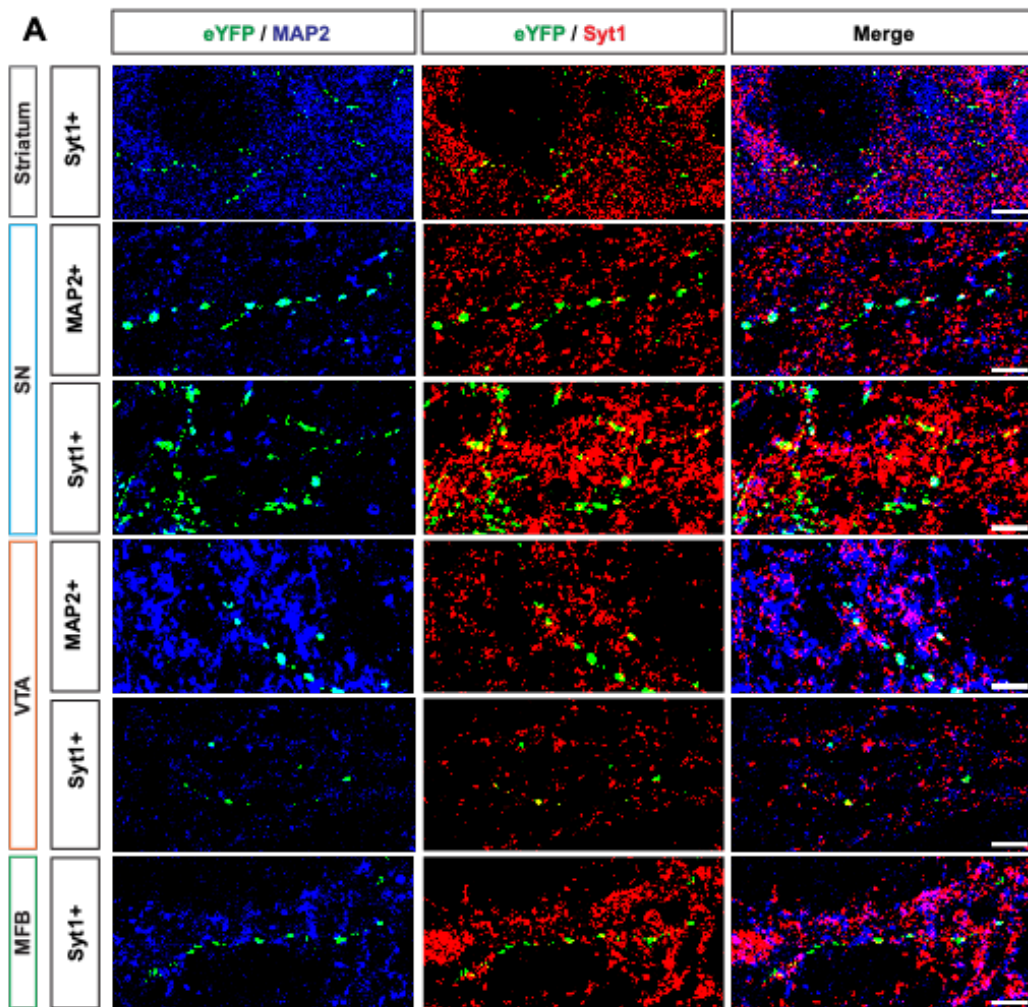


Figure 3: Syt1-positive varicosities are present in the midbrain, MFB and striatum.

(A) Representative images of MAP2- and Syt1-positive fibers in the striatum, SNc, VTA and MFB. Images are taken from 1 focal plane. (B,C) MCC of eYFP/MAP2 and eYFP/Syt1 colocalization respectively in all four regions (scale bar: 10 μ m). N = 5 brains/group. Error bars represent \pm SEM. The statistical analysis was carried out by a one-way ANOVA (**p < 0.01; ***p < 0.001; #p < 0.0001). MCC, Manders' correlation coefficient.

Considering the very high density of Syt1-positive axon terminals in all brain structures including the striatum and the mesencephalon, it is to be expected that at the standard limits of light microscopy resolution, some of the detected colocalization represents false positive overlap. To estimate the extent of this error in our confocal imaging experiments, we performed the same eYFP/Syt1 colocalization analysis in Syt1^{-/-} mice in which there should be no Syt1 colocalization in DA neuron varicosities due to selective deletion of the Syt1 gene in DA neurons, as validated recently (Delignat-Lavaud et al., 2021). Although a significant decrease in the Manders M1 colocalization coefficient was observed in striatal slices and MFB slices from the KO mice (Fig. 4A and B), thus confirming the selective presence of Syt1 in axon varicosities in these two areas, this decrease was only partial, suggesting that with the limited spatial resolution of standard point-scanning confocal microscopy technique used and the high density of Syt1-positive release sites, there is a sizable level of false overlap. This suggests that the optical resolution with this technique is unable to accurately distinguish the Syt1 present in DA neuron varicosities from that present in terminals from afferent neurons. In the VTA and SNc, no decrease in M1 coefficient was observed

when comparing the sections from Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice (Fig. 4A and B), thus showing that this approach is insufficient to demonstrate conclusively the presence of Syt1 in axonal-like structures.

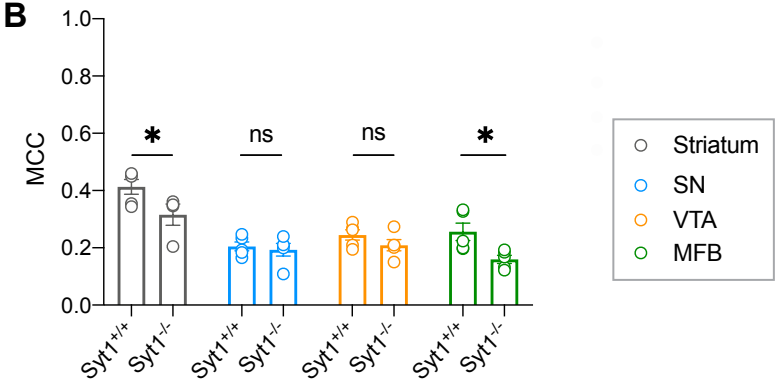
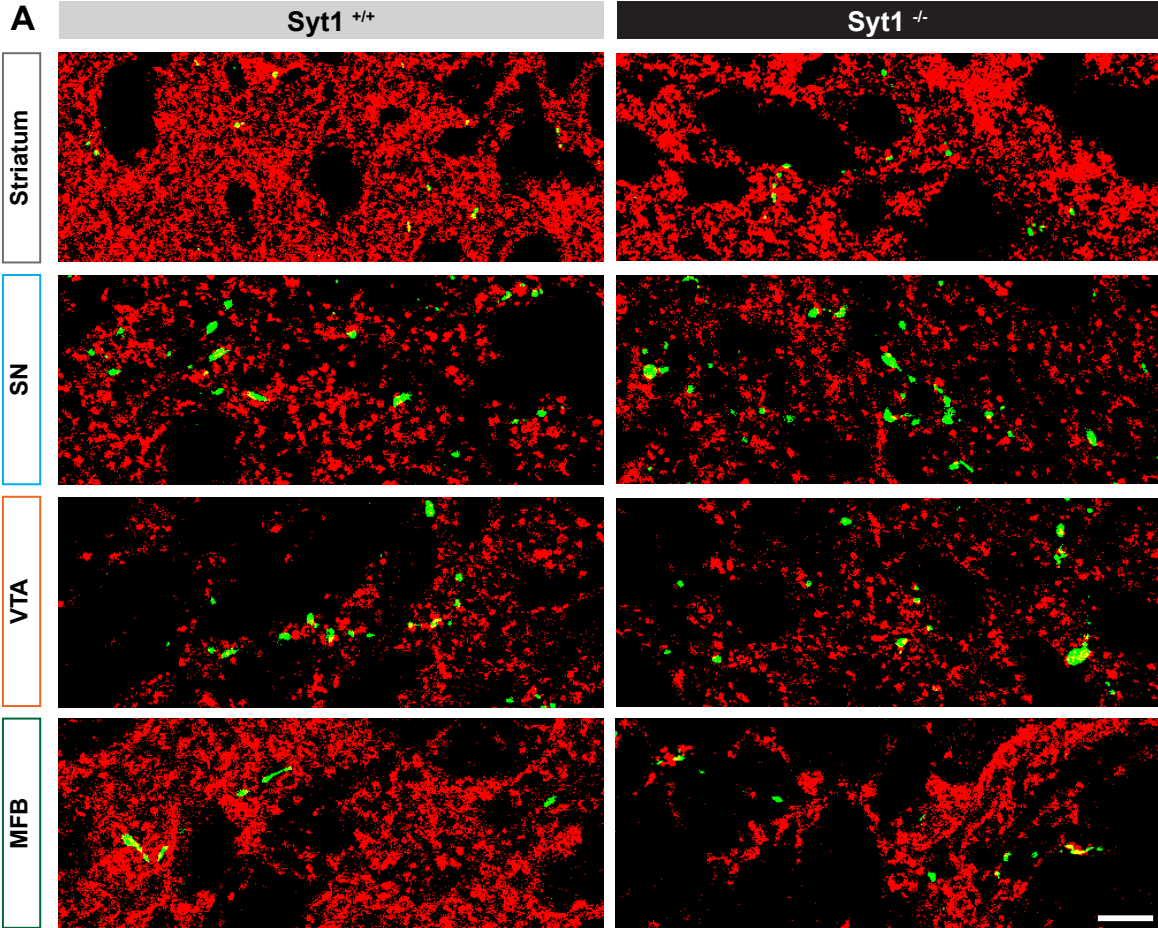


Figure 4: Decrease of Syt1-positive varicosities in Syt1^{-/-} mice in the striatum and the MFB.

(A) Representative images of Syt1-positive varicosities in all four regions in Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice (scale bar: 10 μm). (B) MCC of Syt and eYFP colocalization in all four regions of Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice. N = 5 brains/group. Error bars represent \pm SEM. The statistical analysis was carried out by a two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (ns, non-significant; *p < 0.05). MCC, Manders' correlation coefficient.

3.3.3. Synaptic and asynaptic DA varicosities innervate the midbrain

With the same Cre-dependent eYFP injections, we next used transmission electron microscopy (TEM) to determine more conclusively if axonal structures that have the potential to release DA are present within the VTA and SNc. The viral infections made it certain that only processes originating from DA neurons are labeled with an anti-GFP staining. We examined the VTA and SNc of DAT^{IRES-Cre} injected mice and observed axonal varicosities containing vesicles in both the SNc and in the VTA (Fig. 5A and B). The large majority of these axonal varicosities can be described as asynaptic release sites since they do not have a clearly identifiable junctional complex i.e. a membrane differentiation with a pre- and/or post-synaptic density. The average area of these asynaptic varicosities ($0.881\mu\text{m}^2 \pm 0.116$ in the VTA and $1.212\mu\text{m}^2 \pm 0.146$ in the SNc) was comparable in both regions. These values are very similar to the size of the small varicosities detected with confocal microscopy ($1.07\mu\text{m}^2$, Fig. 2). Their long axis, short axis and diameter are also similar in both regions (Table 1).

We also observed a smaller subset of eYFP-positive terminals with a synaptic structure both in the VTA and the SNc (Fig. 5A and B). They made synaptic contact mostly with dendrites (13 in the SNc and 29 in the VTA), but also cell bodies (1 in the SNc) and axons (2 in the SNc and

5 in the VTA), some of which were also eYFP-positive (Fig. 5B). Other than the presence of a junctional complex, their morphometric characteristics were similar to those of asynaptic varicosities, both in the VTA and SNc (Table 1). Synaptic varicosities accounted for 12.23% and 10.06% of varicosities imaged in the VTA and SNc respectively (Table 1). It is possible that YFP-immunopositive varicosities identified as asynaptic contain a synaptic terminal on another plane since only single planes were examined in this study. Thus, the calculated incidence of synaptic terminals only represents an estimate. These results demonstrate that the ventral mesencephalon contains many axonal varicosities which are likely to contribute to local DA release.

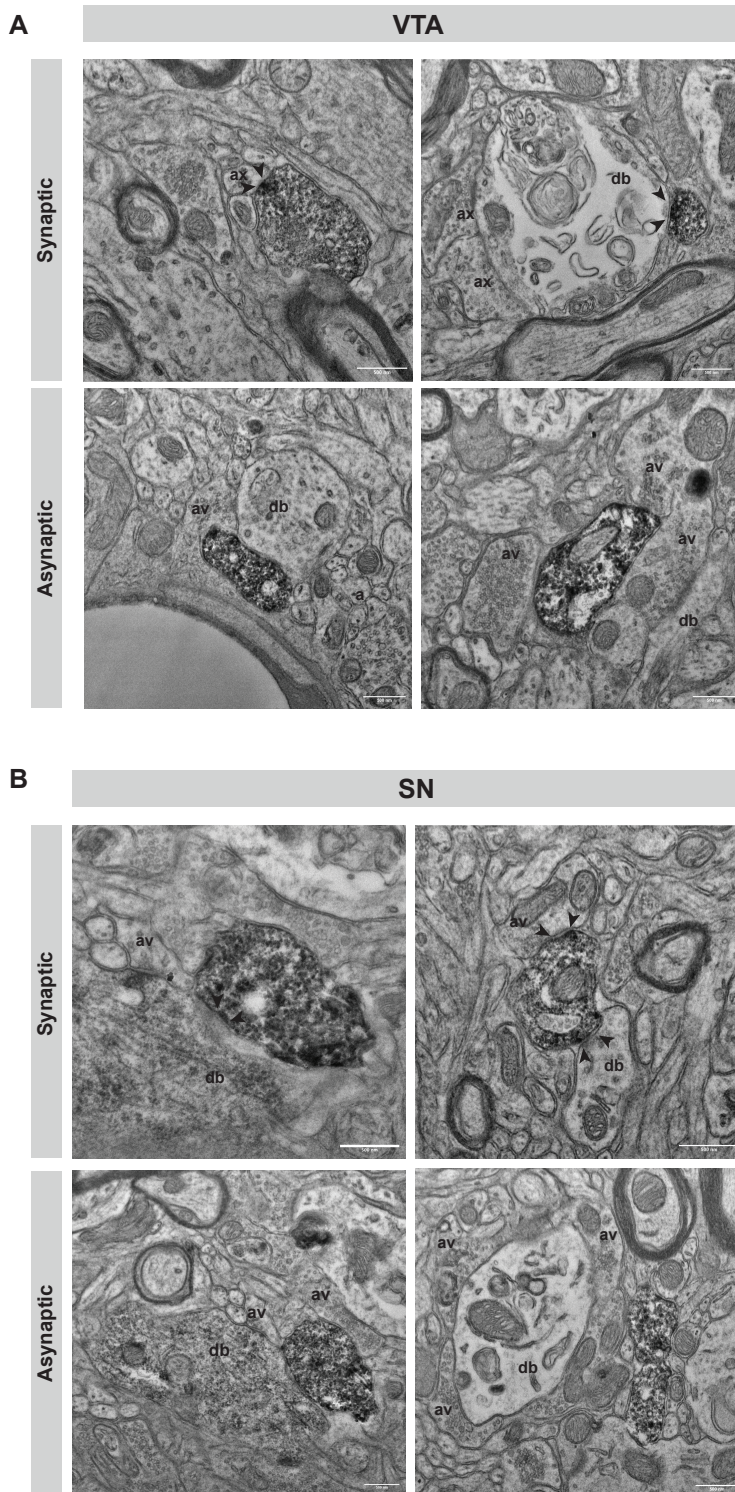


Figure 5: Synaptic and asynaptic axonal varicosities are found in both the SNc and VTA of mice.

Electron micrographs of asynaptic and synaptic eYFP-positive varicosities in the VTA (A) and SNc (B). eYFP-positive axon varicosities establish synapses (between arrows) with dendritic bodies (db) or unlabeled axonal varicosities (ax). Other elements of the microenvironment can also be identified, such as small unmyelinated axons (a) surrounding the labeled axon varicosity (scale bar: 500 nm).

Table 1: Ultrastructural features of eYFP-labeled axon varicosities in the midbrain

		# of labelled varicosities	Area	Long axis	Short axis	Diameter
SNc	Synaptic	16 (from 3 mice)	1.208 ± 0.4	1.626 ± 0.507	0.874 ± 0.181	1.250 ± 0.303
	Asynaptic	143 (from 5 mice)	1.212 ± 0.146	1.726 ± 0.205	0.851 ± 0.048	1.288 ± 0.112
VTA	Synaptic	34 (from 4 mice)	1.257 ± 0.141	1.505 ± 0.131	0.967 ± 0.001	1.236 ± 0.065
	Asynaptic	244 (from 5 mice)	0.881 ± 0.116	1.301 ± 0.084	0.788 ± 0.050	1.044 ± 0.065

3.3.4. STD release is resilient to 6-OHDA lesions

With DA terminals being present in the SNc, it is possible that at early stages of PD, release from such sites may contribute to the higher resilience of DA release in the mesencephalon. To begin examining this, we used the intrastriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model, often used to model PD-relevant adaptations of the DA system. Interestingly, previous work performed in the rat showed that extracellular DA levels in the SNc, as determined by *in vivo* microdialysis, are not altered several weeks after a 6-OHDA lesion in the medial forebrain bundle (MFB), while a major loss of DA content was seen in the striatum (Sarre et al., 2004). Here we used a protocol adapted

from Stott and Barker (Stott and Barker, 2014), who observed that within hours, intra-striatal 6-OHDA (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2 μL) can impact TH⁺ fibers in the striatum, while the impact at the STD compartment is delayed for several days post-surgery, even if approximately 50% of DA neurons degenerate by 12 days. We unilaterally injected saline or 6-OHDA (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2 μL) in the dorsal striatum of 6-7-week-old DAT^{IRE5-Cre} mice and measured DA release in the dorsal striatum and SNc by FSCV 24h or 14 days after the injection (Fig. 6A).

At 14 days, about 40% of SNc DA neurons have degenerated (Fig. 6B and C). This is comparable, although slightly lower compared to the level of degeneration previously reported with this model (~50%) (Stott and Barker, 2014). However, their stereological counting was based on a TH staining and, since TH expression is downregulated after 6-OHDA lesion (Bowenkamp et al., 1996; Sauer & Oertel, 1994), this can lead to an overestimation of neurodegeneration. Here, we used a tdTomato staining in DAT^{IRE5-Cre}; Ai9 mice, therefore allowing a more accurate count of surviving DA neurons.

We found at 1-day post-injection a >99% decrease of electrically evoked DA overflow was detected in the dorsal striatum at recording sites close to the 6-OHDA injection, confirming the robust and acute effect of 6-OHDA on DA axonal fibers in this model (Fig. 6D). This abolition of axonal DA release was also maintained after 14 days. Intriguingly, a small decrease of evoked axonal DA overflow was also detected in the contralateral striatum at day-1, something that was not observed in saline-injected control mice. As expected, there was otherwise no impact of the injection itself on DA overflow, as seen in all saline treated animals (Fig. 6E and G).

In sharp contrast, 1 day after 6-OHDA, STD DA release at the level of the SNc was not reduced, but rather significantly higher in the 6-OHDA lesioned hemisphere compared to the contralateral side (Fig. 6F). At 14 days, only a tendency of a decrease of DA release in the lesioned-

SNC, was observed compared to the contralateral side (Fig. 6F), a change that was not significant. There were no significant changes in DA release in the VTA region at 1 or 14 days after 6-OHDA (Fig. 6F), in line with the fact that this model only affects the nigro-striatal pathway. Altogether these data indicate that while axonal release in the striatum is very sensitive to the toxic effects of a single 6-OHDA injection, DA release measured in the SNC is strikingly more resilient.

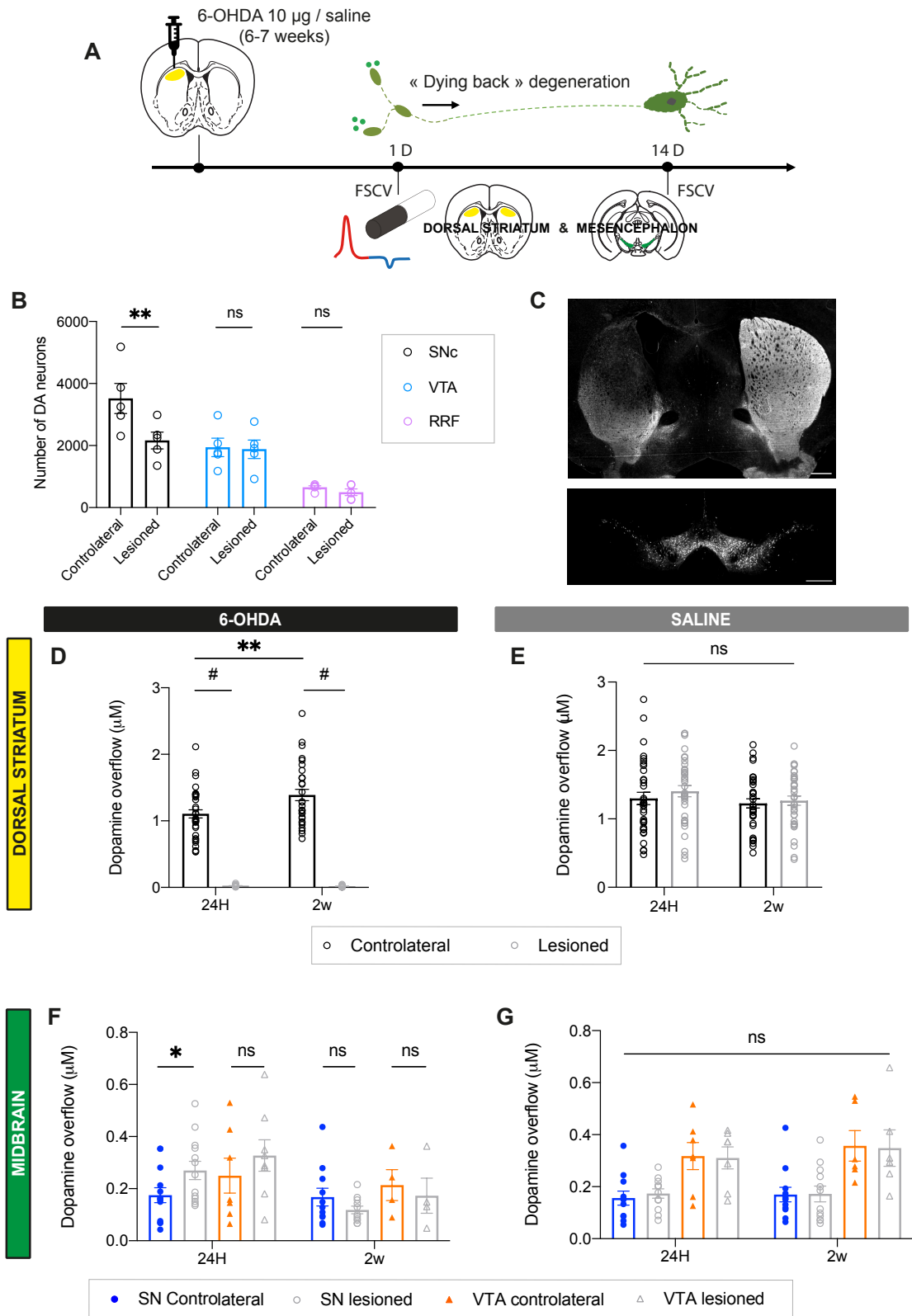


Figure 6: STD DA release is more resilient than axonal release in a model of Parkinson's disease related axonal dying-back.

(A) Protocol used for 6-OHDA experiments. Single doses of 2 μ l at 5 μ g/ μ l (10 μ g) of 6-OHDA were injected in 6-7 weeks old mice in the dorsal striatum. FSCV experiments were conducted 1 day (1D) or 14 days (14D) after the injections and DA overflow was measured in striatal and mesencephalic slices. (B) Stereological counts of RFP-positive neurons were obtained from DAT^{IRE5-Cre}; Ai9 mice. Lesioned and contralateral hemispheres were compared within the SNc, VTA and RRF. N = 5 brains/group. (C) RFP staining in dorsal striatum (above) and midbrain (below) of 6-OHDA treated mice (scale bar: 500 μ m). (D and E) Average [DA]_o peaks (μ M) obtained in the dorsal striatum of 6-OHDA treated (D) and saline-treated (E) mice. For 6-OHDA injected mice, N = 12 slices/6 mice at day-1 and N= 10 slices/5 mice at day-14. For saline injected mice, N= 12 slices/6 mice for each time point. (F and G) Average [DA]_o peaks (μ M) obtained in the mesencephalon of 6-OHDA treated (F) and saline-treated mice (G). N = 13 slices/6 mice at day-1 and N = 10 slices/5 mice at day-14. Each recording performed in the striatum was obtained in aCSF with an average of 3 recording sites per hemisphere and single pulse stimulation (400 μ A, 1 ms). Each recording performed in the SN/VTA was obtained in aCSF + 5 μ M nomifensine/sulpiride with pulse-train stimulation (30 pulses, 10 Hz, 400 μ A). Error bars represent \pm SEM. The statistical analysis was carried out using a t-test (contralateral vs ipsilateral sides) (ns, non-significant; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; #, p < 0.0001). 24H, 24 hours post-lesion; 2w, 2 weeks post-lesion.

3.3.5. Syt1 expression is increased in axonal varicosities in the SNc after the lesion

We next tested the hypothesis that if the resilience of DA release in the SNc in this model is linked to adaptation in DA neuron axon collaterals, an increase in the abundance of such axonal varicosities or a change in the level of expression of Syt1 in these fibers should be detected. In support of this hypothesis, a previous study showed that a 6-OHDA lesion in postnatal day 3 rats (P3) induced robust DA neuron axonal sprouting in the SNc (Xavier et al., 1994). To examine this, we simultaneously injected 6-OHDA (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2 μL) or saline in the dorsal striatum and the Cre-dependent eYFP-AAV previously described into the ipsilateral SNc of 6- to 7-week-old mice and measured the area covered by the fibers of infected neurons 14 days after the lesion. We measured the total area covered by eYFP-positive/MAP2-negative fibers and normalized this value on the total number of infected neurons to obtain the average area covered by one neuron in the SNc. We did not observe any significant change to this value after 6-OHDA lesion (Fig. 7B), suggesting that plasticity was not associated with increased total growth of these axonal collaterals. However, the extent of the colocalization of eYFP-positive axonal fibers and Syt1 was significantly increased in the 6-OHDA group (Figure 7B). Although as showed previously, quantification of eYFP/Syt1 colocalization cannot be used to directly quantify DA neuron axonal varicosities, the increase in this M1 value to a level that almost reaches the level of colocalization observed in the striatum (Fig. 7C and 3C), argues for a strong upregulation of Syt1 expression in these axonal varicosities. This finding supports the possibility that after partial loss of DA neurons, the surviving neurons increase their Syt1 expression to compensate for axonal degeneration in the striatum and sustain local DA release in the SNc.

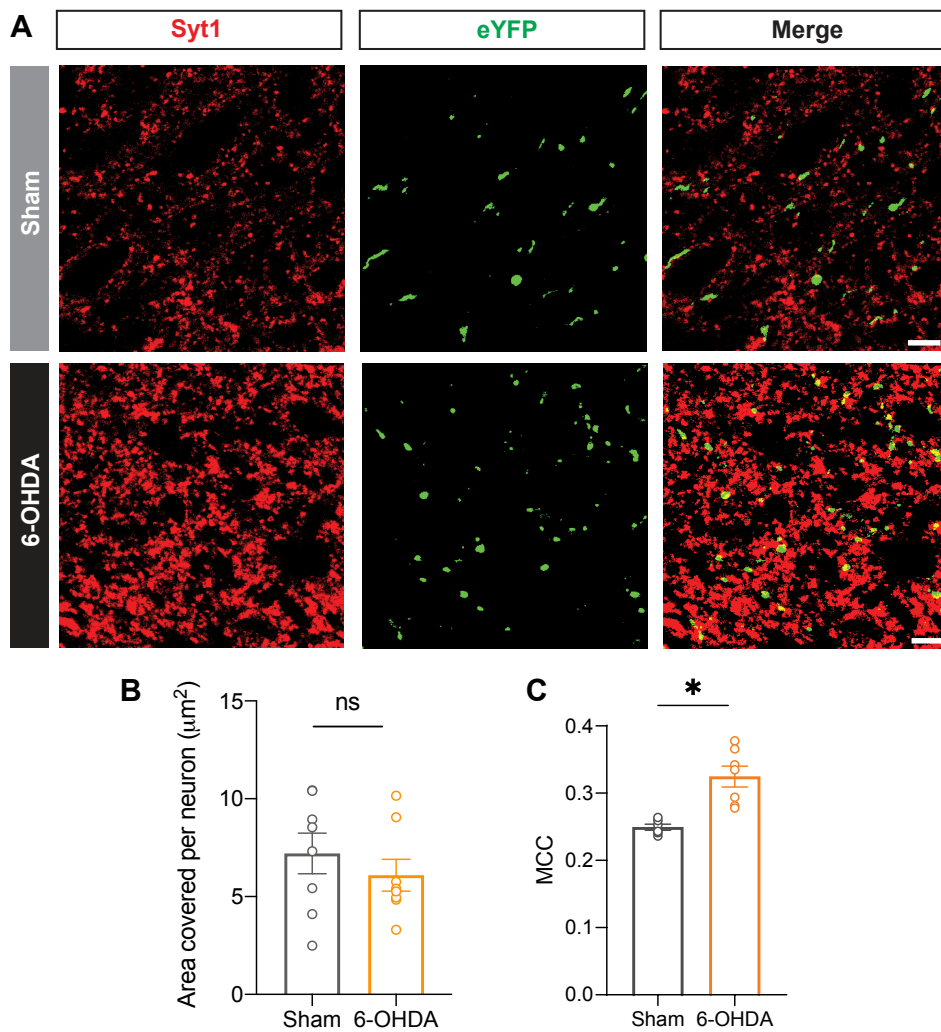


Figure 7: Syt1 expression is increased in eYFP-positive axons 2 weeks post-lesion.

(A) Representative images of Syt1 expression in the SNc of Sham and 6-OHDA injected $\text{DAT}^{\text{IRES-Cre}}$; Ai9 mice (scale bar: 10 μm). (B) Quantitative analysis of the area covered by each neuron in the SNc of Sham and 6-OHDA injected mice. (C) MCC of Syt1 and eYFP in both conditions. $N = 7$ brains/group. Error bars represent \pm SEM. The statistical analysis was carried out by a t-test (ns, non-significant; $*p < 0.05$). MCC, Manders' correlation coefficient.

3.4. Discussion

Since the discovery of STD DA release in the 1970s, a large literature has explored its mechanisms, roles and plasticity in the normal brain and in disease models. Nonetheless, at the present time, its molecular mechanisms are still ill-defined. However, recent work has suggested that synaptotagmin isoforms 4 and 7 play an important role in this form of release (Delignat-Lavaud et al., 2022b; Mendez et al., 2011). In other work on the mechanisms of axonal DA release, two independent studies demonstrated a capital role of Syt1 (Banerjee et al., 2020; Delignat-Lavaud et al., 2021). Considering that since its discovery and cloning in 1981 (Matthew et al., 1981; Perin et al., 1990), all previous work on Syt1 has supported an exclusively axonal localization of this protein, a surprising observation from one of these studies was the finding that conditional deletion of Syt1 from DA neurons also leads to a substantial decrease in activity-dependent DA release in both the VTA and SNc (Delignat-Lavaud et al., 2021). In the present study, we aimed to shed light into this observation by examining more closely the subcellular localization of Syt1 in DA neurons and by testing the hypothesis that DA neurons form release sites along the path of their axons in the VTA and SNc. We also we explored a possible plasticity of such local axon collaterals in a 6-OHDA lesion model mimicking plasticity associated with cell loss in PD. We found that little if any Syt1 can be found in the STD domain of mesencephalic DA neurons. Using viral labelling of subsets of DA neurons, we also identified an abundance of axonal-like varicosities in the VTA and SNc and confirmed using electron microscopy that some of these have the morphological characteristics of axon terminals, most of which of the asynaptic type. We also discovered an increase in the apparent levels of Syt1 in such axonal varicosities 2-weeks after 6-OHDA.

Our most striking observation is the broad presence of DAergic axonal-like varicosities in both the VTA and SNc. Our findings for the VTA are compatible with and extend two previous anatomical studies who suggested the possible presence of local DA neuron terminals in this structure (Bayer & Pickel, 1990b, Deutch et al., 1988b). Our conclusion that such fibers could contribute to local DA release in the VTA is also in keeping with cyclic voltammetry data evaluating the calcium-dependency of DA release in this region and arguing for a mixed STD and axonal origin (Chen et al., 2011). However, these previous anatomical studies relied on the use of TH immunolabelling, which, as previously mentioned, can also label TH-positive noradrenergic neuron terminals (Jones & Moore, 1977; Collingridge et al., 1979; Mejías-Aponte et al., 2009b). Fewer previous studies specifically examined the possible presence of DA neuron axon terminals in the SNc. It has been widely considered that the SNc of rodents is devoid of DAergic axon terminals (B. T. Chen et al., 2011a; Juraska et al., 1977a; Matsuda et al., 2009a; Wassef et al., 1981). However, one study showed that the SNc of rats contains DA neuron terminals but that only a small subset of neurons establishes collaterals in this region (Prensa & Parent, 2001). Whether such collaterals in the SNc are functional was not previously examined.

Our present findings showing that such axonal varicosities are broadly found in the VTA and SNc, but also in the MFB axonal track, suggests the novel hypothesis that perhaps DA neurons (and possible other long-range projection modulatory neurons) establish release sites for neurotransmitters throughout the full extent of their axonal arbor. Although more work will be required to test this hypothesis rigorously, our previous observation that DA neurons in culture establish Syt1-positive axonal-like varicosities all along their axonal domain supports this hypothesis (Ducrot et al., 2021).

In the present studies, we used Syt1 immunolabelling to identify axonal varicosities with the potential to release DA. Because Syt1 is required for axonal DA release (Banerjee et al., 2020; Delignat-Lavaud et al., 2021) and because previous work showed that Syt1 is typically found at axonal release sites in conjunction with the usual complement of SNARE proteins required for exocytotic release of neurotransmitters, it is very likely that axonal varicosities positive for Syt1 represent release sites. This was demonstrated in a previous study with primary mouse DA neurons (ref). The colocalization of Syt1 and eYFP was the highest in the striatum, where DA neurons have most of their release sites. This colocalization was decreased, as expected, in striatal sections from Syt1^{-/-} mice. However, eYFP/Syt1 colocalization levels in the midbrain were not reduced in sections from Syt1^{-/-} mice, revealing that with the more modest density of DA neuron release sites in these areas and the large density of afferent terminals coming from other projection regions, the false colocalization prevents a robust quantification of presence of Syt1 in DA neuron terminals in the VTA and SNc.

Nonetheless, two observations support the hypothesis that these eYFP-positive/MAP2-negative varicosities represent actual DA release sites. First, the size of the majority of these varicosities in the midbrain is similar ($<1.07 \mu\text{m}^2$) to those present in the striatum. The smaller subset of varicosities of larger size could potentially represent MAP2-negative dendritic segments or larger, functionally different varicosities. Second, our ultrastructural observations revealed that axonal varicosities containing vesicles were readily detected in both the SNc and VTA of mice. These mostly asynaptic axonal varicosities could thus contribute to volume or diffuse transmission of DA in the mesencephalon (Agnati et al., 1995; Rice & Cragg, 2008), in addition to STD DA release. In the striatum, D1 and D2 receptors are mostly located outside of synapses (Caillé et al.,

1996b; Ducrot et al., 2021; Uchigashima et al., 2016; Yung et al., 1995), in keeping with this mode of transmission.

Interestingly, we found that a smaller subset (13.93% in the VTA and 13.28% in the SNc) of DAergic axonal varicosities in the ventral midbrain were synaptic in structure. They formed synaptic junctions mainly with dendrites, but also with somas and axons. Some even formed terminals with other eYFP labeled neurons. Such terminals could perhaps explain the relatively fast kinetics of D2 DA receptor-mediated inhibitory synaptic currents that can be detected in DA neurons after electrical or optical stimulation of other local DA neurons (Ford et al., 2009a, 2010). Further studies will be required to compare the abundance of synaptic-like DA terminals in different subdivisions of the midbrain.

Our observation of the presence of axonal-like DAergic varicosities in the MFB is puzzling. The eYFP/Syt1 varicosities present there were mostly of the same size as those found in the striatum. DA release in the MFB has been previously indirectly suggested by previous some publications. One study showed that the DA transporter (DAT) is found on DA axons in this region (Bagalkot et al., 2021), indicating possible local DA reuptake. Another study observed terminals in the MFB that contain dense core vesicles (Sipe & Moore, 1977). Further work will be required to directly measure DA release in this area and evaluate its possible targets and functions.

These results prompted us to investigate the possible plasticity of Syt1 in DA neuron axonal release sites in the SNc in a pathological context. A major hypothesis of PD progression proposes that loss of function begins at the axon terminal level, only later progressing to loss of cell bodies (i.e. the dying back hypothesis of PD). We observed that while axonal DA release is very sensitive to the neurotoxic effect of 6-OHDA, as previously known, DA release in the SNc persists with no major decrement for up to 14 days after the lesion, thus reflecting its high level of resilience. This

observation agrees with previous data from microdialysis experiments measuring basal DA levels in the mesencephalon of 6-OHDA-lesioned rats (Xavier et al., 1994). Our finding of an increase in STD DA release in the SNc at 1 day after the lesion further suggests that at early stages of PD pathophysiology, the loss of axonal DA signaling in the dorsal striatum could lead to compensation in the SNc. A previous study showed that a 6-OHDA lesion in P3 rats leads to axonal sprouting in the SNc (Xavier et al., 1994). We therefore reasoned that we might detect an increase in the density of axonal-like varicosities in the SNc after the partial 6-OHDA lesion used here, or that this could potentially be accompanied by upregulation of Syt1 in these axons. However, we did not observe any such axonal sprouting at 14 days after the lesion, possibly because our experiments were conducted in mature mice, an age at which where DA neurons have been hypothesized to have a reduced capacity for compensatory axon growth compared to earlier stages of development (K. Liu et al., 2011). However, we found that at 14 days after the lesion, the level of colocalization of Syt1 and eYFP in the SNc was greatly increased, almost to levels found in the striatum. Although our detailed analysis of eYFP/Syt1 colocalization reveals the limitations of standard confocal microscopy when detecting proteins that are present in dense structures such as axon terminals, our findings strongly suggest that the levels of Syt1 increase in local DA axon terminals in the SNc after the lesion, a mechanism that could potentially contribute to the resilience of DA release in this area. Further work will be required to more fully validate this new model.

Altogether, our work highlights the need to reconsider the extent of the contribution of axonal DA release in the ventral mesencephalon to what has been broadly referred to as “somatodendritic DA release”. In light of the present findings, we hypothesize that the reason why activity-dependent DA release in the VTA and SNc is reduced by more than 50% in Syt^{-/-} mice (Delignat-Lavaud et al., 2021) is that loss of Syt1 removes the contribution of axonal DA release,

leaving only *bona fide* STD DA release. We suggest that because of such mixed origin of DA release in both the SNc and VTA, DA release in these brain areas should be referred to as “mesencephalic DA release”. Our works also sheds new light on the possible contribution of local axonal DA release in the mesencephalon both in normal physiology and pathological conditions. We hypothesize that axonal DA release in the ventral midbrain may contribute to basal ganglia circuitry regulation and that at early stages of PD, this form of release may help to maintain the functional integrity of motor circuits.

3.5. Experimental procedures

Animals

All procedures involving animals and their care were conducted in accordance with the Guide to care and use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care. The experimental protocols were approved by the animal ethics committees of the Université de Montréal. Housing was at a constant temperature (21°C) and humidity (60%), under a fixed 12h light/dark cycle and free access to food and water. Male and female mice were used for all experiments in this study.

DAT^{IRES-Cre};C57 mice

DAT^{IRES-Cre} mice (catalog #006660, The Jackson Laboratory, Bäckman et al., 2006) express Cre recombinase under the dopamine transporter (DAT) gene locus. Mice were crossed with C57BL6 to produce DAT^{IRES-Cre/+} mice, and thus carried only one allele of the Cre transgene.

Syt1^{lox/lox}

The Syt1-floxed mouse line (Syt1^{lox/lox}) was obtained from Dr. Schneggenburger who rederived the Syt1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} (EMMA, Monterotondo, Italy; EM06829; RRID:MGI_5450372) strain with a C57BL6 background carrying a constitutively expressing FLP gene in order to remove the Frt-flanked lacZ/neo insert (Kochubey et al., 2016). Selective deletion of the Syt1 alleles in DA neurons was obtained by crossing Syt1^{lox/lox} mice with B6.SJL-Slc6a3^{tm1.1(cre)Bkmm/J}; DAT^{IRES-Cre}. Syt1-floxed/DAT^{IRES-cre} mice were bred from heterozygous crosses to generate Syt1 conditional knockout in DA neurons (cKO^{DA}), heterozygotes and wild-type animals, referred in the manuscript as Syt1^{-/-}, Syt1^{+/-} and Syt1^{+/+} respectively. Primers for

genotyping were as follows: Syt1^{lox} forward: GATTCATGATGTCACCTGAATCCTATGC and Syt1^{lox} reverse CTGGCAAGTAGCTTAGTGAGTC.

DAT^{IRE5-Cre}; Ai9 mice

DAT^{IRE5-Cre/Cre} animals (catalog #006660, The Jackson Laboratory, Bäckman et al., 2006) were crossed with Ai9^{loxP/loxP} mice (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J, catalog #007905, The Jackson Laboratory), thus producing mice with one allele of each transgene (DAT^{IRE5-Cre/+}; Ai9^{loxP/+}) and allowing conditional expression of the red fluorescent protein tdTomato in DA neurons.

Primary neuron cultures

Primary midbrain neurons (20 000 cells/ml) were prepared from postnatal day 0-3 (P0-P3) Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice as previously described (Fasano et al., 2008). Dissociated neurons microdissected from the midbrain were seeded at a density of 20 000 cells/ml on a monolayer of cortical astrocytes grown on collagen/poly-L-lysine-coated glass coverslips. Cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂ and maintained in 2/3 of NeurobasalTM-A enriched with 1 % penicillin/streptomycin, 1 % GlutamaxTM-1, 2 % B-27 supplement and 5 % fetal bovine serum (Invitrogen) plus 1/3 of minimum essential medium (MEM) enriched with 1 % penicillin/streptomycin, 1 % GlutamaxTM-1, 20 mM Glucose, 1mM sodium pyruvate and 100 µl MITO+ serum-extender. Cells were fixed at 14 DIV with 4% paraformaldehyde (PFA) for subsequent immunofluorescence.

Stereotaxic injections

For both DAT^{IRESc^{re}} and Syt1^{lox/lox} mice, a Cre-dependant eYFP adeno-associated virus (rAAV2/Ef1a-DIO-eYFP, UNC GTC Vector Core) was injected in the SNc or the VTA. Six- to eight-week-old mice were anesthetized with isoflurane (Aerrane, Baxter) and mounted on a stereotaxic frame (Stoelting). The following coordinates were used: AP -3.0 mm; DV -4.2 mm; ML -1.5mm for SNc injections and AP -2.9 mm; DV -4.2 mm; ML -0.4 mm for VTA injections. For 6-OHDA experiments, the protocol used was as previously described with minor adjustments (Giguère et al., 2019). Saline or 6-OHDA (5 µg/µL; 2 µL in total, at a rate of 0.5 µL/min, Sigma, Canada) was injected unilaterally in the dorsal striatum of DAT^{IRESc^{re}}; Ai9 mice: AP +1.0 mm; ML +1.5 mm; DV -2.8 mm. Brains were used for FSCV experiments 1 or 14 days after the injection. Additionally, for axonal sprouting experiments, a Cre-dependant eYFP was injected unilaterally in the SNc with the same coordinates as previously described at the same time as the 6-OHDA lesion. All mice were transcardially perfused with 4% PFA at 14 days after injection for subsequent immunofluorescence.

Fast-scan cyclic voltammetry (FSCV)

The protocol used was as previously described (Delignat-Lavaud et al., 2022b). In short, acute brain slices from DAT^{IRESc^{re}}; Ai9 mice 1 or 14 days after 6-OHDA lesion were used for FSCV recordings. Coronal brain slices of striatum and midbrain of 300 µm thickness were placed in an ice-cold oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): NaCl (125), KCl (2.5), KH₂PO₄ (0.3), NaHCO₃ (26), glucose (10), CaCl₂ (2.4), MgSO₄ (1.3). A 7 µm diameter carbon-fiber electrode was placed into the tissue at approximately 100 µm below the surface as well as a bipolar electrode about 200 µm away from the carbon-fiber electrode. Carbon fibers were prepared as previously described (Martel et al., 2011). Before and after recording a

slice, the carbon-fiber electrode was calibrated with 1 μ M DA in aCSF and values obtained were used to determine the amount of DA released. The potential of the carbon-fibre electrode was scanned at a rate of 300 V/s according to a 10 ms triangular voltage wave (-400 to 1000 mV versus Ag/AgCl) with a 100 ms sampling interval, using a CV 203BU headstage preamplifier (Molecular Devices) and an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, USA). Data were acquired using a Digidata 1440a analog to digital converter board (Molecular Devices, USA) connected to a computer using Clampex (Molecular Devices, USA). Single pulses (400 μ A or 30 mW, 1 ms) or pulse trains (30 pulses at 10 Hz) were applied to the tissue to trigger action potentials and DA release.

Immunocytochemistry and immunohistochemistry

Primary neuron cultures at 14 DIV were fixed for 30 minutes with 4% PFA (in PBS, pH 7.4). Cells were then permeabilized with 0.1% Triton X- 100 for 20 minutes, and nonspecific binding sites were blocked with 10% bovine serum albumin for 10 minutes. Primary antibodies used were mouse anti-Syt1 (1:1000, #105 011, Synaptic Systems), rabbit anti-TH (1:2000, AB152(CH), Cedarlane), mouse anti-TH (1:2000, MAB318, Sigma-Aldrich) and rabbit anti-VMAT2 (1:2000, gift of Dr Gary Miller, Columbia University). These were subsequently detected using Alexa Fluor-488-conjugated, Alexa Fluor-546-conjugated and Alexa Fluor-647-conjugated (1:500, Invitrogen).

For viral eYFP injections and 6-OHDA lesions, mice were perfused with 4% PFA (in PBS, pH 7.4) and 40μ m brain sections were cut with a cryostat (Leica CM 1800; Leica Canada) and used for immunohistochemistry (IHC). Primary antibodies used were rabbit anti-GFP (1:1000, AB290-50, Cedarlane), chicken anti-GFP (1:2000, GFP-1020, Cedarlane), chicken anti-MAP2

(1:4000, AB5392, Abcam), mouse anti-Syt1 (1:500, 105 011, Cedarlane), rabbit anti-RFP (1:1000, 600-401-379, Cedarlane), and rabbit anti-TH (1:2000, AB152(CH), Cedarlane). Secondary antibodies used were Alexa Fluor-488-conjugated, Alexa Fluor-546-conjugated and Alexa Fluor-647-conjugated (1:500, Invitrogen).

For DAB staining, used for stereological counting, one out of every 6th slice was used of DAT^{IRE5-Cre}; Ai9 mice. Slices were washed with PBS and incubated for 10 minutes with 0.9% H₂O₂ and then incubated for 48h with a rabbit anti-RFP (1:1000, 600-401-379, Cedarlane) at 4°C. They were then incubated 12 hours with anti-rabbit biotin-SP-AffiniPure secondary antibody (111-065-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) at 4°C and 3h with horseradish peroxidase streptavidine (016-030-084, Cedarlane, USA). The DAB reaction was carried out for about 45s or until the signal intensity was considered sufficient and stopped with 0.1M acetate buffer. Slices were mounted on Superfrost/Plus slides and left to dry for 96h for cresyl violet staining. After isopropanol and xylene baths, slides were sealed with Permount medium (SP15-100, Fisher, USA) using glass coverslips.

Microscopy

For super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM), images were acquired using a Zeiss Elyra PS.1 super-resolution microscope with a 63x oil-immersion objective (NA 1.4). Image stacks of 0.110 μm were taken in 488 nm and 642 nm laser excitation with a grating of 5 rotations for better isotropic resolution enhancement. Reference z-stacks of Tetraspeck beads were also taken for channel alignment calibration. Images were then processed on *ZEN*, a Carl Zeiss LSM software, to apply the structured illumination reconstruction. Colocalization analyses were performed on ImageJ using the JACoP plugin. We first selected the neuron either with TH

or VMAT2 signal and removed the background for a more accurate colocalization analysis. A Pearson's correlation coefficient (PCC) was then calculated for that selection, using the same threshold for all pictures taken with the same conditions.

For point-scanning confocal imaging, images were acquired using an Olympus Fluoview FV1000 point-scanning confocal microscope (Olympus, Canada) with a 60x oil-immersion objective (NA 1.35). Z-stacks of 1 μm of 2 to 4 fields of view per slice were obtained of midbrain, striatum and MFB when eYFP signal was present. Images were taken using 488, 546 and 647 nm excitation lasers. The entire midbrain was imaged whereas the dorsal striatum was imaged at bregma 1.18, 0.7 and 0.14 and the MFB was at bregma -1.6. Colocalization analyses were performed on ImageJ using the JACoP plugin. A Manders' correlation coefficient (MCC) was calculated after removing cell bodies with particle detection. Half of the total brain slices were used to count eYFP infected DA neurons and the total number of infected cells was extrapolated.

For axonal arborization quantification, full midbrain scans were performed with a 20X dry objective (NA 0.40) on a Nikon Eclipse Ti2 inverted microscope equipped with a motorized stage and Prime 95B 25mm camera and fitted with an epi-fluorescence module. Images were taken with a GFP filter set (excitation 466nm, FWHM 40nm; emission 525nm, FWHM 50nm) and a RFP filter set (excitation 554nm, FWHM 23nm; emission 609nm, FWHM 54nm). Z-stacks of 5 planes of 12.5 μm were taken to get the full signal. An advanced denoising and rolling ball correction were applied on the images with the NIS elements software from Nikon to increase the signal-to-noise ratio. Analyses were performed on the maximum z-projections.

Stereological counting

RFP-immunoreactive DA neurons in the SN, VTA and RRF were counted in every sixth section using a 100× oil-immersion objective on a Leica DMRE stereomicroscope equipped with a motorized stage by a blinded observer. A 60 × 60 μm² counting frame was used in the Stereo Investigator sampling software with (MBF Bioscience) a 20 μm optical dissector (2 μm guard zones) and counting site intervals of 100 μm after a random start. Stereological estimates of the total number of RFP-IR neurons within ipsilateral corresponding structures were obtained.

Transmission electron microscopy (TEM)

Following an i.p. injection of ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg), mice were transcardially perfused with 50 ml of ice-cold sodium phosphate buffer saline (PBS; 0.1M; pH 7.4) followed by 150 mL of a mix composed of 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde diluted in PBS. Dissected brains were extracted and post-fixed overnight in 4% PFA at 4°C. Brains were cut with a vibrating blade microtome (model VT1200S; Leica, Germany) into 50 μm-thick transverse sections. From the 50 μm-thick sections, quadrangular pieces of tissue containing YFP axons and neurons were microdissected from the SNc or the VTA (-2.54 mm to -3.8 mm from bregma for the SNc and -2.92 mm to -3.88 mm from bregma for the VTA, according to the mouse brain atlas of Franklin & Paxinos 1st edition). Microdissected sections were then rinsed with PBS and pre-incubated for 1h in a solution containing 2% normal goat serum and 0.5% gelatin diluted in PBS. Sections were then incubated overnight at 4°C with a chicken primary GFP antibody (Chicken anti-GFP1020, Aveslab, 1/50,000). Sections were rinsed and incubated during 2h with a goat anti-chicken secondary antibody (Goat anti-Chicken, Vector, BA9010, 1/500). They were washed in PBS and incubated during 1 hour with a solution of a biotin-avidin complex coupled to a peroxidase (Jackson, catalogue no. 111-035-003). The peroxidase activity was revealed by

incubating sections for 4 minutes in a 0.025 % solution of 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich, catalogue no. D5637) diluted in Tris-saline buffer (TBS; 50 mM; pH 7.4), to which 0.005% of H₂O₂ was added. The reaction was stopped by multiple quick washes in TBS followed by phosphate buffer (PB; 50 mM; pH 7.4). At room temperature, sections were washed 3 times in double distilled (dd) H₂O and incubated for 1h in a solution composed of 1.5% potassium ferrocyanide and 2% osmium tetroxide (EMS) diluted in ddH₂O. After 3 rinses in ddH₂O, they were incubated for 20 minutes in a filtered solution of 1% thiocarbohydrazide (Ted Pella) diluted in ddH₂O. Sections were then rinsed 3 times and incubated in 2% osmium tetroxide. After rinses in ddH₂O, they were dehydrated in graded ethanol and propylene oxide and flat-embedded in Durcupan (catalogue no.44611-14; Fluka, Buchs, Switzerland) for 72h at 60°C. From the flat-embedded YFP-immunostained microdissected sections, trapezoidal pieces of tissue were cut from the SNc or VTA, glued on the tip of resin blocks and cut into 80 nm ultrathin sections with an ultramicrotome (model EM UC7, Leica).

Ultrathin sections were collected on bare 150-mesh copper grids and examined under a transmission electron microscope (Tecnai 12; Philips Electronic, Amsterdam, Netherlands) at 100 kV. Profiles of axon varicosities were readily identified as such by their synaptic vesicle content. Using an integrated digital camera (MegaView II; Olympus, Münster, Germany), YFP immunopositive axon varicosities were imaged randomly, at a working magnification of 9,000X, by acquiring an image of every such profile encountered, until 50 or more showing a full contour and distinct content were available for analysis, in each mouse. Axon varicosity profiles that were included for analysis had a short axis of more than 0.3 μ m.

YFP-immunostained varicosities were categorized as synaptic if they contained a junctional complex, which is defined as a straightening of the plasma membranes and widening of

the extracellular space. Synaptic varicosities were also characterized by the presence of synaptic vesicles and a pre- and/or postsynaptic density. Asynaptic terminals were identified when only synaptic vesicles were observed, without the presence of a junctional complex.

Statistics

Results are presented as mean \pm standard error of mean (SEM). The level of statistical significance was established at $p < 0.05$ in one- way ANOVAs and two- tailed t-tests performed with Prism 8 software (GraphPad, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.0001$).

3.6. References

- Agnati, L. F., Zoli, M., Strömberg, I., & Fuxe, K. (1995). Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, *69*(3), 711–726. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00308-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00308-6)
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1995). The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, *18*(2), 63–64.
- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, *13*(7), 266–271. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90107-1](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90107-1)
- Alexander, G. E., Crutcher, M. D., & DeLong, M. R. (1990). Basal ganglia-thalamocortical circuits: Parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. *Progress in Brain Research*, *85*, 119–146.
- Andersson, D. R., Nissbrandt, H., & Bergquist, F. (2006). Partial depletion of dopamine in substantia nigra impairs motor performance without altering striatal dopamine neurotransmission. *European Journal of Neuroscience*, *24*(2), 617–624. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04953.x>
- Ann D. Crocker. (1997). The Regulation of Motor Control: An Evaluation of the Role of Dopamine Receptors in the Substantia Nigra. *Reviews in the Neurosciences*, *8*(1), 55–76. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.1997.8.1.55>
- Aravamudan, B., Fergestad, T., Davis, W. S., Rodesch, C. K., & Broadie, K. (1999). Drosophila Unc-13 is essential for synaptic transmission. *Nature Neuroscience*, *2*(11), 965–971. <https://doi.org/10.1038/14764>
- Azmitia, E. C., & Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *179*(3), 641–667. <https://doi.org/10.1002/cne.901790311>
- B, K. (1969). The release of neural transmitter substances. *Liverpool University Press*, 5–39.
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2013). Synaptotagmin-1 and Synaptotagmin-7 Trigger Synchronous and Asynchronous Phases of Neurotransmitter Release. *Neuron*, *80*(4), 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.026>
- Bäckman, C. M., Malik, N., Zhang, Y., Shan, L., Grinberg, A., Hoffer, B. J., Westphal, H., & Tomac, A. C. (2006). Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *44*(8), 383–390. <https://doi.org/10.1002/dvg.20228>
- Bagalkot, T. R., Block, E. R., Bucchini, K., Balcita-Pedicino, J. J., Calderon, M., Sesack, S. R., & Sorkin, A. (2021). Dopamine Transporter Localization in Medial Forebrain Bundle Axons Indicates Its Long-Range Transport Primarily by Membrane Diffusion with a Limited Contribution of Vesicular Traffic on Retromer-Positive Compartments. *Journal of Neuroscience*, *41*(2), 234–250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0744-20.2020>

- Bahuguna, J., Weidel, P., & Morrison, A. (2019). Exploring the role of striatal D1 and D2 medium spiny neurons in action selection using a virtual robotic framework. *The European Journal of Neuroscience*, *49*(6), 737–753. <https://doi.org/10.1111/ejn.14021>
- Bai, J., He, F., Novikova, S. I., Undie, A. S., Dracheva, S., Haroutunian, V., & Lidow, M. S. (2004). Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biological Psychiatry*, *56*(6), 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.06.022>
- Banerjee, A., Imig, C., Balakrishnan, K., Kershberg, L., Lipstein, N., Uronen, R.-L., Wang, J., Cai, X., Benseler, F., Rhee, J. S., Cooper, B. H., Liu, C., Wojcik, S. M., Brose, N., & Kaeser, P. S. (2022). Molecular and functional architecture of striatal dopamine release sites. *Neuron*, *110*(2), 248-265.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.028>
- Banerjee, A., Lee, J., Nemcova, P., Liu, C., & Kaeser, P. S. (2020). Synaptotagmin-1 is the Ca²⁺ sensor for fast striatal dopamine release. *ELife*, *9*, e58359. <https://doi.org/10.7554/eLife.58359>
- Bayer, V. E., & Pickel, V. M. (1990). Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: Relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *10*(9), 2996–3013.
- Becker, C., Jick, S. S., & Meier, C. R. (2008). Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, *70*(16 Pt 2), 1438–1444. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000303818.38960.44>
- Beckstead, M. J., Ford, C. P., Phillips, P. E. M., & Williams, J. T. (2007). Presynaptic regulation of dendrodendritic dopamine transmission. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(6), 1479–1488. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05775.x>
- Beckstead, M. J., Grandy, D. K., Wickman, K., & Williams, J. T. (2004). Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron*, *42*(6), 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.019>
- Beier, K. T., Steinberg, E. E., DeLoach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X. J., Kremer, E. J., Malenka, R. C., & Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*, *162*(3), 622–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Bendahmane, M., Bohannon, K. P., Bradberry, M. M., Rao, T. C., Schmidtke, M. W., Abbineni, P. S., Chon, N. L., Tran, S., Lin, H., Chapman, E. R., Knight, J. D., & Anantharam, A. (2018). The synaptotagmin C2B domain calcium-binding loops modulate the rate of fusion pore expansion. *Molecular Biology of the Cell*, *29*(7), 834–845. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-11-0623>
- Bergquist, F., Niazi, H. S., & Nissbrandt, H. (2002). Evidence for different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. *Brain Research*, *950*(1–2), 245–253. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03047-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03047-0)

- Bergquist, F., Shahabi, H. N., & Nissbrandt, H. (2003). Somatodendritic dopamine release in rat substantia nigra influences motor performance on the accelerating rod. *Brain Research*, 973(1), 81–91.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., & Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the Neurological Sciences*, 20(4), 415–455. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(73\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(73)90175-5)
- Bhalla, A., Tucker, W. C., & Chapman, E. R. (2005). Synaptotagmin isoforms couple distinct ranges of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ concentration to SNARE-mediated membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4755–4764. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0277>
- Bischofberger, J., Geiger, J. R. P., & Jonas, P. (2002). Timing and efficacy of Ca²⁺ channel activation in hippocampal mossy fiber boutons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(24), 10593–10602.
- Björklund, A., & Lindvall, O. (1975). Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: Suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Research*, 83(3), 531–537. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90849-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90849-5)
- Bolam, J. P., & Pissadaki, E. K. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. *Movement Disorders*, 27(12), 1478–1483. <https://doi.org/10.1002/mds.25135>
- Bolam, J. P., & Smith, Y. (1990). The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Research*, 529(1–2), 57–78. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90811-o](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90811-o)
- Bowenkamp, K. E., David, D., Lapchak, P. L., Henry, M. A., Granholm, A. C., Hoffer, B. J., & Mahalik, T. J. (1996). 6-hydroxydopamine induces the loss of the dopaminergic phenotype in substantia nigra neurons of the rat. A possible mechanism for restoration of the nigrostriatal circuit mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Experimental Brain Research*, 111(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00229549>
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., & Rüb, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *Journal of Neurology*, 249 Suppl 3, III/1-5. <https://doi.org/10.1007/s00415-002-1301-4>
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Broadie, K., Bellen, H. J., DiAntonio, A., Littleton, J. T., & Schwarz, T. L. (1994). Absence of synaptotagmin disrupts excitation-secretion coupling during synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10727–10731. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10727>

- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C., & Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: A calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science (New York, N.Y.)*, *256*(5059), 1021–1025. <https://doi.org/10.1126/science.1589771>
- Burke, R. E., & O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *246*, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.011>
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, *329*(5999), 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>
- Caillé, I., Dumartin, B., & Bloch, B. (1996). Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Research*, *730*(1), 17–31. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00424-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00424-6)
- Calo, L., Wegrzynowicz, M., Santivañez-Perez, J., & Grazia Spillantini, M. (2016). Synaptic failure and α -synuclein. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *31*(2), 169–177. <https://doi.org/10.1002/mds.26479>
- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*, *180*(4596), 1200–1200. <https://doi.org/10.1038/1801200a0>
- Chan, C. S., Guzman, J. N., Ilijic, E., Mercer, J. N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G. E., & Surmeier, D. J. (2007). 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*, *447*(7148), 1081–1086. <https://doi.org/10.1038/nature05865>
- Chanaday, N. L., Cousin, M. A., Milosevic, I., Watanabe, S., & Morgan, J. R. (2019). The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, *39*(42), 8209–8216. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1158-19.2019>
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O. M., & Südhof, T. C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPA α in preventing neurodegeneration. *Cell*, *123*(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028>
- Chapman, E. R. (2002). Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *3*(7), 498–508. <https://doi.org/10.1038/nrm855>
- Chapman, E. R., Desai, R. C., Davis, A. F., & Tornehl, C. K. (1998). Delineation of the Oligomerization, AP-2 Binding, and Synprint Binding Region of the C2B Domain of Synaptotagmin*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(49), 32966–32972. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32966>
- Chapman, E. R., & Jahn, R. (1994). Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(8), 5735–5741.
- Chefer, V. I., Thompson, A. C., Zapata, A., & Shippenberg, T. S. (2009). Overview of Brain Microdialysis. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.]*, CHAPTER, Unit7.1. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0701s47>

- Chen, B. T., Patel, J. C., Moran, K. A., & Rice, M. E. (2011). Differential Calcium Dependence of Axonal Versus Somatodendritic Dopamine Release, with Characteristics of Both in the Ventral Tegmental Area. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00039>
- Chen, B. T., & Rice, M. E. (2001). Novel Ca²⁺ dependence and time course of somatodendritic dopamine release: Substantia nigra versus striatum. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7841–7847.
- Chen, C., & Jonas, P. (2017). Synaptotagmins: That's Why So Many. *Neuron*, 94(4), 694–696. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.011>
- Chen, C., Satterfield, R., Young, S. M., & Jonas, P. (2017). Triple Function of Synaptotagmin 7 Ensures Efficiency of High-Frequency Transmission at Central GABAergic Synapses. *Cell Reports*, 21(8), 2082–2089. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.122>
- Chen, N.-H., Reith, M. E. A., & Quick, M. W. (2004). Synaptic uptake and beyond: The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Archiv*, 447(5), 519–531. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1064-5>
- Cheramy, A., Leviel, V., & Glowinski, J. (1981). Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature*, 289(5798), 537–542. <https://doi.org/10.1038/289537a0>
- Chergui, K., Charléty, P. J., Akaoka, H., Saunier, C. F., Brunet, J. L., Buda, M., Svensson, T. H., & Chouvet, G. (1993). Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. *The European Journal of Neuroscience*, 5(2), 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00479.x>
- Chesselet, M.-F., & Richter, F. (2011). Modelling of Parkinson's disease in mice. *The Lancet. Neurology*, 10(12), 1108–1118. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70227-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70227-7)
- Chicka, M. C., Hui, E., Liu, H., & Chapman, E. R. (2008). Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca²⁺. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8), 827–835. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1463>
- Cobb, W. S., & Abercrombie, E. D. (2003). Differential regulation of somatodendritic and nerve terminal dopamine release by serotonergic innervation of substantia nigra. *Journal of Neurochemistry*, 84(3), 576–584. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01546.x>
- Collingridge, G. L., James, T. A., & MacLeod, N. K. (1979). Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra [proceedings]. *The Journal of Physiology*, 290(2), 44P.
- Courtney, N. A., Mamaligas, A. A., & Ford, C. P. (2012). Species Differences in Somatodendritic Dopamine Transmission Determine D2-Autoreceptor-Mediated Inhibition of Ventral Tegmental Area Neuron Firing. *The Journal of Neuroscience*, 32(39), 13520–13528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2745-12.2012>
- Cragg, S. J., & Greenfield, S. A. (1997). Differential Autoreceptor Control of Somatodendritic and Axon Terminal Dopamine Release in Substantia Nigra, Ventral Tegmental Area, and Striatum. *The Journal of Neuroscience*, 17(15), 5738–5746. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05738.1997>

- Cragg, S. J., Hawkey, C. R., & Greenfield, S. A. (1997). Comparison of Serotonin and Dopamine Release in Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area: Region and Species Differences. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2378–2386. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062378.x>
- Cragg, S. J., Nicholson, C., Kume-Kick, J., Tao, L., & Rice, M. E. (2001). Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *Journal of Neurophysiology*, 85(4), 1761–1771. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.4.1761>
- Cragg, S. J., & Rice, M. E. (2004). DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.011>
- Cragg, S. J., & Rice, M. E. (2005). Somatodendritic Dopamine Release in Midbrain. In M. Ludwig (Ed.), *Dendritic Neurotransmitter Release* (pp. 69–83). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-23696-1_5
- Cragg, S., Rice, M. E., & Greenfield, S. A. (1997). Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *Journal of Neurophysiology*, 77(2), 863–873. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.863>
- Croft, B. G., Fortin, G. D., Corera, A. T., Edwards, R. H., Beaudet, A., Trudeau, L.-E., & Fon, E. A. (2005). Normal biogenesis and cycling of empty synaptic vesicles in dopamine neurons of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 306–315. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0559>
- Cuello, A. C., & Kelly, J. S. (1977). Electron microscopic autoradiographic localization of [3H]-dopamine in the dendrites of the dopaminergic neurones of the rat substantia nigra in vivo [proceedings]. *British Journal of Pharmacology*, 59(3), 527P-528P.
- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7), 398–399. <https://doi.org/10.1007/BF02147990>
- Dai, H., Shin, O.-H., Machius, M., Tomchick, D. R., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2004). Structural basis for the evolutionary inactivation of Ca²⁺ binding to synaptotagmin 4. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(9), 844–849. <https://doi.org/10.1038/nsmb817>
- 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. *Journal of Neurochemistry*, 88(6), 1398–1405. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02277.x>
- Daniel, J. A., Galbraith, S., Iacovitti, L., Abdipranoto, A., & Vissel, B. (2009). Functional heterogeneity at dopamine release sites. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(46), 14670–14680. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1349-09.2009>
- Dean, C., Dunning, F. M., Liu, H., Bomba-Warczak, E., Martens, H., Bharat, V., Ahmed, S., & Chapman, E. R. (2012). Axonal and dendritic synaptotagmin isoforms revealed by a pHluorin-syt functional screen. *Molecular Biology of the Cell*, 23(9), 1715–1727. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-08-0707>

- Dean, C., Liu, H., Dunning, F. M., Chang, P. Y., Jackson, M. B., & Chapman, E. R. (2009). Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release. *Nature Neuroscience*, *12*(6), 767–776. <https://doi.org/10.1038/nn.2315>
- Delignat-Lavaud, B., Ducrot, C., Kouwenhoven, W., Feller, N., & Trudeau, L.-É. (2022). Implication of synaptotagmins 4 and 7 in activity-dependent somatodendritic dopamine release in the ventral midbrain. *Open Biology*, *12*(3), 210339. <https://doi.org/10.1098/rsob.210339>
- Delignat-Lavaud, B., Kano, J., Ducrot, C., Massé, I., Mukherjee, S., Giguère, N., Moquin, L., Lévesque, C., Nanni, S. B., Bourque, M.-J., Rosa-Neto, P., Lévesque, D., De Beaumont, L., & Trudeau, L.-É. (2021). The calcium sensor synaptotagmin-1 is critical for phasic axonal dopamine release in the striatum and mesencephalon, but is dispensable for basic motor behaviors in mice. *BioRxiv*, 2021.09.15.460511. <https://doi.org/10.1101/2021.09.15.460511>
- Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S., Bosler, O., & Doucet, G. (1996). Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: A quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *The Journal of Comparative Neurology*, *375*(2), 167–186. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961111\)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
- Descarries, L., Watkins, K. C., & Lapierre, Y. (1977). Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Research*, *133*(2), 197–222. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90759-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90759-4)
- Deutch, A. Y., Goldstein, M., Baldino, F., & Roth, R. H. (1988). Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *537*, 27–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb42095.x>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(14), 5274–5278.
- Diana, M. (2011). The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction and Its Potential Therapeutic Value. *Frontiers in Psychiatry*, *2*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2011.00064>
- DiAntonio, A., & Schwarz, T. L. (1994). The effect on synaptic physiology of synaptotagmin mutations in drosophila. *Neuron*, *12*(4), 909–920. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90342-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90342-5)
- Dobi, A., Margolis, E. B., Wang, H.-L., Harvey, B. K., & Morales, M. (2010). Glutamatergic and Nonglutamatergic Neurons of the Ventral Tegmental Area Establish Local Synaptic Contacts with Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *30*(1), 218–229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3884-09.2010>
- Dopeso-Reyes, I. G., Rico, A. J., Roda, E., Sierra, S., Pignataro, D., Lanz, M., Sucunza, D., Chang-Azancot, L., & Lanciego, J. L. (2014). Calbindin content and differential vulnerability of

- midbrain efferent dopaminergic neurons in macaques. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2014.00146>
- Ducrot, C., Bourque, M.-J., Delmas, C. V. L., Racine, A.-S., Bello, D. G., Delignat-Lavaud, B., Lycas, M. D., Fallon, A., Michaud-Tardif, C., Nanni, S. B., Herborg, F., Gether, U., Nanci, A., Takahashi, H., Parent, M., & Trudeau, L.-E. (2020). Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *BioRxiv*, 2020.05.11.088351. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088351>
- Ducrot, C., Bourque, M.-J., Delmas, C. V. L., Racine, A.-S., Guadarrama Bello, D., Delignat-Lavaud, B., Domenic Lycas, M., Fallon, A., Michaud-Tardif, C., Burke Nanni, S., Herborg, F., Gether, U., Nanci, A., Takahashi, H., Parent, M., & Trudeau, L.-E. (2021). Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(8), e21791. <https://doi.org/10.1096/fj.202100201RR>
- Elverfors, A., Jonason, J., Jonason, G., & Nissbrandt, H. (1997). Effects of drugs interfering with sodium channels and calcium channels on the release of endogenous dopamine from superfused substantia nigra slices. *Synapse (New York, N.Y.)*, 26(4), 359–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199708\)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199708)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5)
- Fasano, C., Thibault, D., & Trudeau, L.-E. (2008). Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Current Protocols in Neuroscience, Chapter 3*, Unit 3.21. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0321s44>
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., & Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824), 41–49. <https://doi.org/10.1038/35065004>
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F., & Meldolesi, J. (1994). Neurotransmitter release: Fusion or “kiss-and-run”? *Trends in Cell Biology*, 4(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90025-6)
- Filloux, F., & Townsend, J. J. (1993). Pre- and Postsynaptic Neurotoxic Effects of Dopamine Demonstrated by Intrastratial Injection. *Experimental Neurology*, 119(1), 79–88. <https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1008>
- Fon, E. A., Pothos, E. N., Sun, B. C., Killeen, N., Sulzer, D., & Edwards, R. H. (1997). Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron*, 19(6), 1271–1283. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80418-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80418-3)
- Ford, C. P., Gantz, S. C., Phillips, P. E. M., & Williams, J. T. (2010). Control of Extracellular Dopamine at Dendrite and Axon Terminals. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 6975–6983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1020-10.2010>
- Ford, C. P., Phillips, P. E. M., & Williams, J. T. (2009). The Time Course of Dopamine Transmission in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neuroscience*, 29(42), 13344–13352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3546-09.2009>

- Fornstedt, B. (1990). 5. Role of catechol autooxidation in the degeneration of dopamine neurons. *Acta Neurologica Scandinavica*, 82(S129), 12–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1990.tb02595.x>
- Fortin, D. L., Nemani, V. M., Voglmaier, S. M., Anthony, M. D., Ryan, T. A., & Edwards, R. H. (2005). Neural Activity Controls the Synaptic Accumulation of α -Synuclein. *The Journal of Neuroscience*, 25(47), 10913–10921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2922-05.2005>
- Fortin, G. D., Desrosiers, C. C., Yamaguchi, N., & Trudeau, L. E. (2006). Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *Journal of Neurochemistry*, 96(6), 1740–1749. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03699.x>
- Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., Saegusa, C., Kim, T., Loh, Y. P., & Yamamoto, A. (2003). Nerve growth factor-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3220–3226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208323200>
- Fukuda, M., Kanno, E., Satoh, M., Saegusa, C., & Yamamoto, A. (2004). Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52677–52684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409241200>
- Fukuda, M., Kojima, T., & Mikoshiba, K. (1996). Phospholipid composition dependence of Ca²⁺-dependent phospholipid binding to the C2A domain of synaptotagmin IV. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8430–8434. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8430>
- Futami, T., Takakusaki, K., & Kitai, S. T. (1995). Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunculopontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neuroscience Research*, 21(4), 331–342. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)00869-h](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)00869-h)
- Garner, C. C., Kindler, S., & Gundelfinger, E. D. (2000). Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 321–327. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00093-3)
- Gauthier, J., Parent, M., Lévesque, M., & Parent, A. (1999). The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Research*, 834(1–2), 228–232. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01573-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01573-5)
- Geffen, L. B., Jessell, T. M., Cuello, A. C., & Iversen, L. L. (1976). Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature*, 260(5548), 258–260. <https://doi.org/10.1038/260258a0>
- Gentet, L. J., & Williams, S. R. (2007). Dopamine Gates Action Potential Backpropagation in Midbrain Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27(8), 1892–1901. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5234-06.2007>
- Georges, F., & Aston-Jones, G. (2002). Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: A novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine

- neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(12), 5173–5187.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), 717–727. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90556-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90556-8)
- German, D. C., & Manaye, K. F. (1993). Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): Three-dimensional reconstruction in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 331(3), 297–309. <https://doi.org/10.1002/cne.903310302>
- Giguère, N., Burke Nanni, S., & Trudeau, L.-E. (2018). On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson’s Disease. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2018.00455>
- Giguère, N., Delignat-Lavaud, B., Herborg, F., Voisin, A., Li, Y., Jacquemet, V., Anand-Srivastava, M., Gether, U., Giros, B., & Trudeau, L.-É. (2019). Increased vulnerability of nigral dopamine neurons after expansion of their axonal arborization size through D2 dopamine receptor conditional knockout. *PLoS Genetics*, 15(8), e1008352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008352>
- Giguère, N., Pacelli, C., Saumure, C., Bourque, M.-J., Matheoud, D., Levesque, D., Slack, R. S., Park, D. S., & Trudeau, L.-É. (2018). Comparative analysis of Parkinson’s disease-associated genes in mice reveals altered survival and bioenergetics of Parkin-deficient dopamine neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(25), 9580–9593. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000499>
- 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. <https://doi.org/10.1038/379606a0>
- Glinka, Y., Tipton, K. F., & Youdim, M. B. (1996). Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry*, 66(5), 2004–2010. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66052004.x>
- Glinka, Y. Y., & Youdim, M. B. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology*, 292(3–4), 329–332. [https://doi.org/10.1016/0926-6917\(95\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0926-6917(95)90040-3)
- González-Rodríguez, P., Zampese, E., Stout, K. A., Guzman, J. N., Ilijic, E., Yang, B., Tkatch, T., Stavarache, M. A., Wokosin, D. L., Gao, L., Kaplitt, M. G., López-Barneo, J., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2021). Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature*, 599(7886), 650–656. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04059-0>
- Greenamyre, J. T., & Hastings, T. G. (2004). Biomedicine. Parkinson’s—Divergent causes, convergent mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1120–1122. <https://doi.org/10.1126/science.1098966>
- Grenhoff, J., Nisell, M., Ferré, S., Aston-Jones, G., & Svensson, T. H. (1993). Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus

- in the rat. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 93(1), 11–25. <https://doi.org/10.1007/BF01244934>
- Groves, P. M., & Linder, J. C. (1983). Dendro-dendritic synapses in substantia nigra: Descriptions based on analysis of serial sections. *Experimental Brain Research*, 49(2), 209–217. <https://doi.org/10.1007/BF00238581>
- Guzman, J. N., Sánchez-Padilla, J., Chan, C. S., & Surmeier, D. J. (2009). Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 29(35), 11011–11019. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2519-09.2009>
- Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468(7324), 696–700. <https://doi.org/10.1038/nature09536>
- Hattori, T., McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1979). Dendro axonic neurotransmission. II. Morphological sites for the synthesis, binding and release of neurotransmitters in dopaminergic dendrites in the substantia nigra and cholinergic dendrites in the neostriatum. *Brain Research*, 170(1), 71–83. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90941-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90941-7)
- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L., & Evans, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *Journal of Cell Biology*, 81(2), 275–300. <https://doi.org/10.1083/jcb.81.2.275>
- Hoffman, A. F., & Gerhardt, G. A. (1999). Differences in pharmacological properties of dopamine release between the substantia nigra and striatum: An in vivo electrochemical study. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(1), 455–463.
- Hoffman, A. F., van Horne, C. G., Eken, S., Hoffer, B. J., & Gerhardt, G. A. (1997). In Vivo Microdialysis Studies of Somatodendritic Dopamine Release in the Rat Substantia Nigra: Effects of Unilateral 6-OHDA Lesions and GDNF. *Experimental Neurology*, 147(1), 130–141. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6571>
- Hornykiewicz, O. (1998). Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology*, 51(2 Suppl 2), S2-9. https://doi.org/10.1212/wnl.51.2_suppl_2.s2
- Hui, E., Bai, J., Wang, P., Sugimori, M., Llinas, R. R., & Chapman, E. R. (2005). Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: Candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5210–5214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500941102>
- Huson, V., van Boven, M. A., Stuefer, A., Verhage, M., & Cornelisse, L. N. (2019). Synaptotagmin-1 enables frequency coding by suppressing asynchronous release in a temperature dependent manner. *Scientific Reports*, 9(1), 11341. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47487-9>
- Ibata, K., Fukuda, M., Hamada, T., Kabayama, H., & Mikoshiba, K. (2000). Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 518–526. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740518.x>
- Ibata, K., Hashikawa, T., Tsuboi, T., Terakawa, S., Liang, F., Mizutani, A., Fukuda, M., & Mikoshiba, K. (2002). Non-polarized distribution of synaptotagmin IV in neurons:

- Evidence that synaptotagmin IV is not a synaptic vesicle protein. *Neuroscience Research*, 43(4), 401–406. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00066-4)
- Jackman, S. L., Turecek, J., Belinsky, J. E., & Regehr, W. G. (2016). The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature*, 529(7584), 88–91. <https://doi.org/10.1038/nature16507>
- Jaffe, E. H., Marty, A., Schulte, A., & Chow, R. H. (1998). Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(10), 3548–3553.
- Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(2), 483–488.
- Johnson, S. W., Seutin, V., & North, R. A. (1992). Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: Role of electrogenic sodium pump. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5082), 665–667. <https://doi.org/10.1126/science.1329209>
- Jones, B. E., & Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Research*, 127(1), 23–53. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90378-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90378-X)
- Joyce, M. P., & Rayport, S. (2000). Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience*, 99(3), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00219-0)
- Juraska, J. M., Wilson, C. J., & Groves, P. M. (1977). The substantia nigra of the rat: A golgi study. *Journal of Comparative Neurology*, 172(4), 585–599. <https://doi.org/10.1002/cne.901720403>
- Kaesler, P. S., & Regehr, W. G. (2014). Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annual Review of Physiology*, 76, 333–363. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170338>
- Kalivas, P. W., Churchill, L., & Klitenick, M. A. (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 57(4), 1047–1060. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90048-k](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90048-k)
- Khaliq, Z. M., & Bean, B. P. (2010). Pacemaking in Dopaminergic Ventral Tegmental Area Neurons: Depolarizing Drive from Background and Voltage-Dependent Sodium Conductances. *The Journal of Neuroscience*, 30(21), 7401–7413. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0143-10.2010>
- Kim, Y., Park, M. K., & Chung, S. (2008). Voltage-operated Ca²⁺ channels regulate dopamine release from somata of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(4), 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.099>
- Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T. E., Muzyczka, N., Mandel, R. J., & Björklund, A. (2002). Parkinson-Like Neurodegeneration Induced by Targeted

- Overexpression of α -Synuclein in the Nigrostriatal System. *The Journal of Neuroscience*, 22(7), 2780–2791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02780.2002>
- Kochubey, O., Babai, N., & Schneggenburger, R. (2016). A Synaptotagmin Isoform Switch during the Development of an Identified CNS Synapse. *Neuron*, 90(5), 984–999. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.038>
- Kochubey, O., & Schneggenburger, R. (2011). Synaptotagmin increases the dynamic range of synapses by driving Ca^{2+} -evoked release and by clamping a near-linear remaining Ca^{2+} sensor. *Neuron*, 69(4), 736–748. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.013>
- Korotkova, T. M., Sergeeva, O. A., Eriksson, K. S., Haas, H. L., & Brown, R. E. (2003). Excitation of Ventral Tegmental Area Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons by Orexins/Hypocretins. *The Journal of Neuroscience*, 23(1), 7–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00007.2003>
- Koyama, S., Kanemitsu, Y., & Weight, F. F. (2005). Spontaneous activity and properties of two types of principal neurons from the ventral tegmental area of rat. *Journal of Neurophysiology*, 93(6), 3282–3293. <https://doi.org/10.1152/jn.00776.2004>
- Kuhr, G., Ewing, G., & Mark, R. (1985). *Amphetamine Attenuates the Stimulated Release of Dopamine in Vivo*. 232, 7.
- Kupsch, A., Schmidt, W., Gizatullina, Z., Debska-Vielhaber, G., Voges, J., Striggow, F., Panther, P., Schwegler, H., Heinze, H.-J., Vielhaber, S., & Gellerich, F. N. (2014). 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: Respirometric, histological, and behavioral analyses. *Journal of Neural Transmission*, 121(10), 1245–1257. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1185-3>
- Labouesse, M. A., Cola, R. B., & Patriarchi, T. (2020). GPCR-Based Dopamine Sensors-A Detailed Guide to Inform Sensor Choice for In vivo Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), E8048. <https://doi.org/10.3390/ijms21218048>
- Lacey, M. G., Mercuri, N. B., & North, R. A. (1987). Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *The Journal of Physiology*, 392, 397–416.
- Lategan, A. J., Marien, M. R., & Colpaert, F. C. (1990). Effects of locus coeruleus lesions on the release of endogenous dopamine in the rat nucleus accumbens and caudate nucleus as determined by intracerebral microdialysis. *Brain Research*, 523(1), 134–138. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91646-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91646-x)
- Lefevre, E. M., Pisansky, M. T., Toddes, C., Baruffaldi, F., Pravetoni, M., Tian, L., Kono, T. J. Y., & Rothwell, P. E. (2020). Interruption of continuous opioid exposure exacerbates drug-evoked adaptations in the mesolimbic dopamine system. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 45(11), 1781–1792. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0643-x>
- Leviel, V. (2001). The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochemistry International*, 38(2), 83–106. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00076-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00076-0)

- Leyton, M. (2017). Altered dopamine transmission as a familial risk trait for addictions. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *13*, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.11.011>
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G. W., Brose, N., & Südhof, T. C. (1995). Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature*, *375*(6532), 594–599. <https://doi.org/10.1038/375594a0>
- Liprando, L. A., Miner, L. H., Blakely, R. D., Lewis, D. A., & Sesack, S. R. (2004). Ultrastructural interactions between terminals expressing the norepinephrine transporter and dopamine neurons in the rat and monkey ventral tegmental area. *Synapse*, *52*(4), 233–244. <https://doi.org/10.1002/syn.20023>
- Littleton, J. T., Serano, T. L., Rubin, G. M., Ganetzky, B., & Chapman, E. R. (1999). Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV. *Nature*, *400*(6746), 757–760. <https://doi.org/10.1038/23462>
- Liu, C., Goel, P., & Kaeser, P. S. (2021). Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, *22*(6), 345–358. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00455-7>
- Liu, C., & Kaeser, P. S. (2019). Mechanisms and regulation of dopamine release. *Current Opinion in Neurobiology*, *57*, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.01.001>
- Liu, C., Kershberg, L., Wang, J., Schneeberger, S., & Kaeser, P. S. (2018). Dopamine Secretion Is Mediated by Sparse Active Zone-like Release Sites. *Cell*, *172*(4), 706–718.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.008>
- Liu, H., Dean, C., Arthur, C. P., Dong, M., & Chapman, E. R. (2009). Autapses and Networks of Hippocampal Neurons Exhibit Distinct Synaptic Transmission Phenotypes in the Absence of Synaptotagmin I. *Journal of Neuroscience*, *29*(23), 7395–7403. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1341-09.2009>
- Liu, K., Tedeschi, A., Park, K. K., & He, Z. (2011). Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. *Annual Review of Neuroscience*, *34*, 131–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113723>
- Llinás, R., Steinberg, I. Z., & Walton, K. (1981). Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophysical Journal*, *33*(3), 289–321.
- Löw, K., & Aebischer, P. (2012). Use of viral vectors to create animal models for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *48*(2), 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.038>
- Ludwig, M., Sabatier, N., Bull, P. M., Landgraf, R., Dayanithi, G., & Leng, G. (2002). Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature*, *418*(6893), 85–89. <https://doi.org/10.1038/nature00822>
- Luo, S. X., & Huang, E. J. (2016). Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. *The American Journal of Pathology*, *186*(3), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.023>

- Martel, P., Leo, D., Fulton, S., Bérard, M., & Trudeau, L.-E. (2011). Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS One*, *6*(5), e20402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020402>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009a). Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, *29*(2), 444–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009b). Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *Journal of Neuroscience*, *29*(2), 444–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>
- Matsui, A., Jarvie, B. C., Robinson, B. G., Hentges, S. T., & Williams, J. T. (2014). Separate GABA afferents to dopamine neurons mediate acute action of opioids, development of tolerance and expression of withdrawal. *Neuron*, *82*(6), 1346–1356. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.030>
- Matthew, W. D., Tsavaler, L., & Reichardt, L. F. (1981). Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *The Journal of Cell Biology*, *91*(1), 257–269. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.1.257>
- Maximov, A., Lao, Y., Li, H., Chen, X., Rizo, J., Sørensen, J. B., & Südhof, T. C. (2008). Genetic analysis of synaptotagmin-7 function in synaptic vesicle exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(10), 3986–3991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712372105>
- Maximov, A., & Südhof, T. C. (2005). Autonomous Function of Synaptotagmin 1 in Triggering Synchronous Release Independent of Asynchronous Release. *Neuron*, *48*(4), 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.006>
- Mejías-Aponte, C. A., Drouin, C., & Aston-Jones, G. (2009). Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: Prominent inputs from medullary homeostatic centers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(11), 3613–3626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4632-08.2009>
- Melis, M., Gessa, G. L., & Diana, M. (2000). Different mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *24*(6), 993–1006. [https://doi.org/10.1016/s0278-5846\(00\)00119-6](https://doi.org/10.1016/s0278-5846(00)00119-6)
- Mendez, J., Bourque, M.-J., Fasano, C., Kortleven, C., & Trudeau, L.-E. (2011). Somatodendritic Dopamine Release Requires Synaptotagmin 4 and 7 and the Participation of Voltage-gated Calcium Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 23928–23937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.218032>

- Mercer, L., del Fiacco, M., & Cuello, A. C. (1979). The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurones. *Experientia*, 35(1), 101–103. <https://doi.org/10.1007/BF01917903>
- Michel, P. P., & Hefti, F. (1990). Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *Journal of Neuroscience Research*, 26(4), 428–435. <https://doi.org/10.1002/jnr.490260405>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Mittelstaedt, T., Alvaréz-Baron, E., & Schoch, S. (2010). RIM proteins and their role in synapse function. *Biological Chemistry*, 391(6), 599–606. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.064>
- Miyazaki, T., & Lacey, M. G. (1998). Presynaptic inhibition by dopamine of a discrete component of GABA release in rat substantia nigra pars reticulata. *The Journal of Physiology*, 513(3), 805–817. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.805ba.x>
- Morales, M., & Root, D. H. (2014). Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*, 282, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.032>
- Nestler, E. J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, 8(11), 1445–1449. <https://doi.org/10.1038/nm1578>
- Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B., & Roeper, J. (2002). Ih Channels Contribute to the Different Functional Properties of Identified Dopaminergic Subpopulations in the Midbrain. *The Journal of Neuroscience*, 22(4), 1290–1302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-04-01290.2002>
- Nicklas, W. J., Vyas, I., & Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sciences*, 36(26), 2503–2508. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90146-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90146-8)
- Nieoullon, A., Cheramy, A., & Glowinski, J. (1977). Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. *Nature*, 266(5600), 375–377. <https://doi.org/10.1038/266375a0>
- Nirenberg, M. J., Vaughan, R. A., Uhl, G. R., Kuhar, M. J., & Pickel, V. M. (1996). The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(2), 436–447.
- Ogawa, S. K., Cohen, J. Y., Hwang, D., Uchida, N., & Watabe-Uchida, M. (2014). Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. *Cell Reports*, 8(4), 1105–1118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.042>
- Oliveras-Salvá, M., Van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Nuber, S., D’Hooge, R., Van den Haute, C., & Baekelandt, V. (2013). RAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-44>

- Orimo, S., Uchihara, T., Nakamura, A., Mori, F., Kakita, A., Wakabayashi, K., & Takahashi, H. (2008). Axonal α -synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*, *131*(3), 642–650. <https://doi.org/10.1093/brain/awm302>
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M.-J., Lévesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L.-É. (2015). Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*, *25*(18), 2349–2360. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>
- Parent, M., & Parent, A. (2006). Relationship between axonal collateralization and neuronal degeneration in basal ganglia. In P. Riederer, H. Reichmann, M. B. H. Youdim, & M. Gerlach (Eds.), *Parkinson's Disease and Related Disorders* (pp. 85–88). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_14
- Parizek, J., Hassler, R., & Bak, I. J. (1971). Light and electron microscopic autoradiography of substantia nigra of rat after intraventricular administration of tritium labelled norepinephrine, dopamine, serotonin and the precursors. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, *115*(1), 137–148. <https://doi.org/10.1007/BF00330222>
- Patriarchi, T., Cho, J. R., Merten, K., Howe, M. W., Marley, A., Xiong, W.-H., Folk, R. W., Broussard, G. J., Liang, R., Jang, M. J., Zhong, H., Dombeck, D., von Zastrow, M., Nimmerjahn, A., Gradinaru, V., Williams, J. T., & Tian, L. (2018). Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science*, *360*(6396), eaat4422. <https://doi.org/10.1126/science.aat4422>
- Pereira, D. B., Schmitz, Y., Mészáros, J., Merchant, P., Hu, G., Li, S., Henke, A., Lizardi-Ortiz, J. E., Karpowicz, R. J., Morgenstern, T. J., Sonders, M. S., Kanter, E., Rodriguez, P. C., Mosharov, E. V., Sames, D., & Sulzer, D. (2016). Fluorescent false neurotransmitter reveals functionally silent dopamine vesicle clusters in the striatum. *Nature Neuroscience*, *19*(4), 578–586. <https://doi.org/10.1038/nn.4252>
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., & Südhof, T. C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, *345*(6272), 260–263. <https://doi.org/10.1038/345260a0>
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C. S., Dombeck, D. A., Deisseroth, K., & Awatramani, R. (2018). Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nature Neuroscience*, *21*(9), 1260–1271. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0203-4>
- Prensa, L., & Parent, A. (2001). The Nigrostriatal Pathway in the Rat: A Single-Axon Study of the Relationship between Dorsal and Ventral Tier Nigral Neurons and the Striosome/Matrix Striatal Compartments. *Journal of Neuroscience*, *21*(18), 7247–7260. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07247.2001>
- Preston, R. J., McCrea, R. A., Chang, H. T., & Kitai, S. T. (1981). Anatomy and physiology of substantia nigra and retrorubral neurons studied by extra- and intracellular recording and

- by horseradish peroxidase labeling. *Neuroscience*, 6(3), 331–344. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90127-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90127-5)
- Pucak, M. L., & Grace, A. A. (1994). Evidence that systemically administered dopamine antagonists activate dopamine neuron firing primarily by blockade of somatodendritic autoreceptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(3), 1181–1192.
- Radnikow, G., & Misgeld, U. (1998). Dopamine D1 Receptors Facilitate GABAASynaptic Currents in the Rat Substantia Nigra Pars Reticulata. *Journal of Neuroscience*, 18(6), 2009–2016. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-06-02009.1998>
- Ramirez, D. M. O., & Kavalali, E. T. (2012). The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cellular Logistics*, 2(1), 20–27. <https://doi.org/10.4161/cl.20114>
- Rao, T. C., Passmore, D. R., Peleman, A. R., Das, M., Chapman, E. R., & Anantharam, A. (2014). Distinct fusion properties of synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 bearing dense core granules. *Molecular Biology of the Cell*, 25(16), 2416–2427. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0702>
- Reubi, J. C., & Sandri, C. (1979). Ultrastructural observations on intercellular contacts of nigral dendrites. *Neuroscience Letters*, 13(2), 183–188. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(79\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(79)90039-9)
- Rice, M. E., & Cragg, S. J. (2008). Dopamine Spillover after Quantal Release: Rethinking Dopamine Transmission in the Nigrostriatal Pathway. *Brain Research Reviews*, 58(2), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.02.004>
- Rice, M. E., Cragg, S. J., & Greenfield, S. A. (1997). Characteristics of Electrically Evoked Somatodendritic Dopamine Release in Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area In Vitro. *Journal of Neurophysiology*, 77(2), 853–862. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.853>
- Rice, M. E., & Patel, J. C. (2015). Somatodendritic dopamine release: Recent mechanistic insights. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1672), 20140185. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0185>
- Rice, M. E., Richards, C. D., Nedergaard, S., Hounsgaard, J., Nicholson, C., & Greenfield, S. A. (1994). Direct monitoring of dopamine and 5-HT release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Experimental Brain Research*, 100(3), 395–406. <https://doi.org/10.1007/BF02738400>
- Riederer, P., & Wuketich, S. (1976). Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *Journal of Neural Transmission*, 38(3–4), 277–301. <https://doi.org/10.1007/BF01249445>
- Rinvik, E., & Ottersen, O. P. (1993). Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: An electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6(1), 19–30. [https://doi.org/10.1016/0891-0618\(93\)90004-n](https://doi.org/10.1016/0891-0618(93)90004-n)

- Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R., & Kuhar, M. J. (1987). Cocaine Receptors on Dopamine Transporters Are Related to Self-Administration of Cocaine. *Science*, *237*(4819), 1219–1223. <https://doi.org/10.1126/science.2820058>
- Robertson, G. S., & Robertson, H. A. (1989). Evidence that L-dopa-induced rotational behavior is dependent on both striatal and nigral mechanisms. *Journal of Neuroscience*, *9*(9), 3326–3331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-09-03326.1989>
- Robinson, D. L., Venton, B. J., Heien, M. L. A. V., & Wightman, R. M. (2003). Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. *Clinical Chemistry*, *49*(10), 1763–1773. <https://doi.org/10.1373/49.10.1763>
- Robinson, D. L., & Wightman, R. M. (2004). Nomifensine amplifies subsecond dopamine signals in the ventral striatum of freely-moving rats. *Journal of Neurochemistry*, *90*(4), 894–903. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02559.x>
- Robinson, I. M., Ranjan, R., & Schwarz, T. L. (2002). Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca²⁺ binding in the C2A domain. *Nature*, *418*(6895), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature00915>
- Russell, V. A., Lamm, M. C., Allin, R., de Villiers, A. S., Searson, A., & Taljaard, J. J. (1989). Effect of selective noradrenergic denervation on noradrenaline content and [³H]dopamine release in rat nucleus accumbens slices. *Neurochemical Research*, *14*(2), 169–172. <https://doi.org/10.1007/BF00969634>
- Santiago, M., & Westerink, B. H. C. (1991). Characterization and Pharmacological Responsiveness of Dopamine Release Recorded by Microdialysis in the Substantia Nigra of Conscious Rats. *Journal of Neurochemistry*, *57*(3), 738–747. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08214.x>
- Sarre, S., Yuan, H., Jonkers, N., Hemelrijck, A. V., Ebinger, G., & Michotte, Y. (2004). In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Journal of Neurochemistry*, *90*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02471.x>
- Sauer, H., & Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, *59*(2), 401–415. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90605-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90605-x)
- Schultz, W. (2007). Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annual Review of Neuroscience*, *30*(1), 259–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722>
- Sesack, S., Aoki, C., & Pickel, V. (1994). Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *The Journal of Neuroscience*, *14*(1), 88–106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00088.1994>
- Simon, H., Le Moal, M., Stinus, L., & Calas, A. (1979). Anatomical relationships between the ventral mesencephalic tegmentum—A 10 region and the locus coeruleus as demonstrated by anterograde and retrograde tracing techniques. *Journal of Neural Transmission*, *44*(1), 77–86. <https://doi.org/10.1007/BF01252703>

- Sipe, Jack C., & Moore, Robert Y. (1977). The lateral hypothalamic area: An ultrastructural analysis. *Cell and Tissue Research*, 179(2). <https://doi.org/10.1007/BF00219795>
- Smiley, J. F., Levey, A. I., Ciliax, B. J., & Goldman-Rakic, P. S. (1994). D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: Predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5720–5724.
- Soykan, T., Maritzen, T., & Haucke, V. (2016). Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Current Opinion in Neurobiology*, 39, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.03.005>
- Stewart, J. (2008). Review. Psychological and neural mechanisms of relapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1507), 3147–3158. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0084>
- Stuber, G. D., Hnasko, T. S., Britt, J. P., Edwards, R. H., & Bonci, A. (2010). Dopaminergic Terminals in the Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. *Journal of Neuroscience*, 30(24), 8229–8233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1754-10.2010>
- Südhof, T. C. (2002). Synaptotagmins: Why so many? *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7629–7632. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100052200>
- Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernández-Chacón, R., Lao, Y., & Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin VII as a Plasma Membrane Ca²⁺ Sensor in Exocytosis. *Neuron*, 30(2), 459–473. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00290-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00290-2)
- Sulzer, D., Chen, T., Lau, Y., Kristensen, H., Rayport, S., & Ewing, A. (1995). Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *The Journal of Neuroscience*, 15(5), 4102–4108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-04102.1995>
- Sulzer, D., Joyce, M. P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S. N., Hattori, T., & Rayport, S. (1998). Dopamine Neurons Make Glutamatergic Synapses In Vitro. *Journal of Neuroscience*, 18(12), 4588–4602. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04588.1998>
- Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S. F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., Yong, Z., Gao, Y., Peng, W., Wang, L., Zhang, S., Du, J., Lin, D., Xu, M., Kreitzer, A. C., ... Li, Y. (2018). A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice. *Cell*, 174(2), 481–496.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.042>
- Sun, F., Zhou, J., Dai, B., Qian, T., Zeng, J., Li, X., Zhuo, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Qian, C., Tan, K., Feng, J., Dong, H., Lin, D., Cui, G., & Li, Y. (2020). Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nature Methods*, 17(11), 1156–1166. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00981-9>

- Surmeier, D. J., Graves, S. M., & Shen, W. (2014). Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *29*, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.07.008>
- Takakusaki, K., Shiroyama, T., Yamamoto, T., & Kitai, S. T. (1996). Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *The Journal of Comparative Neurology*, *371*(3), 345–361. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960729\)371:3<345::AID-CNE1>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960729)371:3<345::AID-CNE1>3.0.CO;2-2)
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., ... Jahn, R. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, *127*(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tanaka, M., Sotomatsu, A., Kanai, H., & Hirai, S. (1991). Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron. *Journal of the Neurological Sciences*, *101*(2), 198–203. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(91\)90046-A](https://doi.org/10.1016/0022-510X(91)90046-A)
- Tassin, J. P., Lavielle, S., Hervé, D., Blanc, G., Thierry, A. M., Alvarez, C., Berger, B., & Glowinski, J. (1979). Collateral sprouting and reduced activity of the rat mesocortical dopaminergic neurons after selective destruction of the ascending noradrenergic bundles. *Neuroscience*, *4*(11), 1569–1582. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90020-4)
- Tipton, K. F., & Singer, T. P. (1993). Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *Journal of Neurochemistry*, *61*(4), 1191–1206. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb13610.x>
- Tofaris, G. K., Garcia Reitböck, P., Humby, T., Lambourne, S. L., O'Connell, M., Ghetti, B., Gossage, H., Emson, P. C., Wilkinson, L. S., Goedert, M., & Grazia Spillantini, M. (2006). Pathological Changes in Dopaminergic Nerve Cells of the Substantia Nigra and Olfactory Bulb in Mice Transgenic for Truncated Human α -Synuclein(1–120): Implications for Lewy Body Disorders. *The Journal of Neuroscience*, *26*(15), 3942–3950. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4965-05.2006>
- Trent, F., & Tepper, J. M. (1991). Dorsal raphé stimulation modifies striatal-evoked antidromic invasion of nigral dopaminergic neurons in vivo. *Experimental Brain Research*, *84*(3), 620–630. <https://doi.org/10.1007/BF00230974>
- Tritsch, N. X., Ding, J. B., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature*, *490*(7419), 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature11466>
- Tritsch, N. X., Granger, A. J., & Sabatini, B. L. (2016). Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(3), 139–145. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.21>
- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1998). Ca²⁺ binding to synaptotagmin: How many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *The EMBO Journal*, *17*(14), 3921–3930. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3921>

- Uchigashima, M., Ohtsuka, T., Kobayashi, K., & Watanabe, M. (2016). Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(15), 4206–4211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514074113>
- Vevea, J. D., Kusick, G. F., Courtney, K. C., Chen, E., Watanabe, S., & Chapman, E. R. (2021). Synaptotagmin 7 is targeted to the axonal plasma membrane through γ -secretase processing to promote synaptic vesicle docking in mouse hippocampal neurons. *ELife*, *10*, e67261. <https://doi.org/10.7554/eLife.67261>
- Virmani, T., Han, W., Liu, X., Südhof, T. C., & Kavalali, E. T. (2003). Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *The EMBO Journal*, *22*(20), 5347–5357. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg514>
- Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T. C., Neher, E., & Verhage, M. (2001). Munc18-1 Promotes Large Dense-Core Vesicle Docking. *Neuron*, *31*(4), 581–592. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00391-9)
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R., & Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, *56*, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.022>
- von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J., & Südhof, T. C. (1997). The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca²⁺ binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(22), 14314–14319. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14314>
- Wakamatsu, M., Ishii, A., Iwata, S., Sakagami, J., Ukai, Y., Ono, M., Kanbe, D., Muramatsu, S., Kobayashi, K., Iwatsubo, T., & Yoshimoto, M. (2008). Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human alpha-synuclein in mice. *Neurobiology of Aging*, *29*(4), 574–585. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.017>
- Wang, C.-T., Lu, J.-C., Bai, J., Chang, P. Y., Martin, T. F. J., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2003). Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature*, *424*(6951), 943–947. <https://doi.org/10.1038/nature01857>
- Wang, P., Chicka, M. C., Bhalla, A., Richards, D. A., & Chapman, E. R. (2005). Synaptotagmin VII is targeted to secretory organelles in PC12 cells, where it functions as a high-affinity calcium sensor. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(19), 8693–8702. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8693-8702.2005>
- Wang, Y. M., Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Xu, F., Jones, S. R., Bock, C. B., Miller, G. W., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1997). Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron*, *19*(6), 1285–1296. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80419-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80419-5)
- Wassef, M., Berod, A., & Sotelo, C. (1981). Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of

- tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience*, 6(11), 2125–2139. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90003-8)
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A., & Uchida, N. (2012). Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 74(5), 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>
- Wen, H., Linhoff, M. W., McGinley, M. J., Li, G.-L., Corson, G. M., Mandel, G., & Brehm, P. (2010). Distinct roles for two synaptotagmin isoforms in synchronous and asynchronous transmitter release at zebrafish neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13906–13911. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008598107>
- Westerink, B. H. C., & Justice, J. B. (1991). Chapter 2—Microdialysis compared with other in vivo release models. In T. E. Robinson & J. B. Justice (Eds.), *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences* (Vol. 7, pp. 23–43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81194-3.50007-1>
- Wilson, C. J., Groves, P. M., & Fifková, E. (1977). Monoaminergic synapses, including dendrodendritic synapses in the rat substantia nigra. *Experimental Brain Research*, 30(2), 161–174. <https://doi.org/10.1007/BF00237248>
- Witkovsky, P., Patel, J. C., Lee, C. R., & Rice, M. E. (2009). Immunocytochemical identification of proteins involved in dopamine release from the somatodendritic compartment of nigral dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 164(2), 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.017>
- Wu, M., Hryciyshyn, A. W., & Brudzynski, S. M. (1996). Subpallidal outputs to the nucleus accumbens and the ventral tegmental area: Anatomical and electrophysiological studies. *Brain Research*, 740(1–2), 151–161. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00859-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00859-1)
- Xavier, F. G. F., Doucet, G., Geffard, M., & Descarries, L. (1994). Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, 59(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90100-7)
- Xu, J., Pang, Z. P., Shin, O.-H., & Südhof, T. C. (2009). Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release. *Nature Neuroscience*, 12(6), 759–766. <https://doi.org/10.1038/nn.2320>
- Yamaguchi, T., Sheen, W., & Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *The European Journal of Neuroscience*, 25(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x>
- Yau, H.-J., Wang, D. V., Tsou, J.-H., Chuang, Y.-F., Chen, B. T., Deisseroth, K., Ikemoto, S., & Bonci, A. (2016). Pontomesencephalic Tegmental Afferents to VTA Non-dopamine Neurons Are Necessary for Appetitive Pavlovian Learning. *Cell Reports*, 16(10), 2699–2710. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.007>
- Yee, A. G., Forbes, B., Cheung, P.-Y., Martini, A., Burrell, M. H., Freestone, P. S., & Lipski, J. (2019). Action potential and calcium dependence of tonic somatodendritic dopamine

- release in the Substantia Nigra pars compacta. *Journal of Neurochemistry*, 148(4), 462–479. <https://doi.org/10.1111/jnc.14587>
- Yelnik, J., François, C., Percheron, G., & Heyner, S. (1987). Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 265(4), 455–472. <https://doi.org/10.1002/cne.902650402>
- Yung, K. K., Bolam, J. P., Smith, A. D., Hersch, S. M., Ciliax, B. J., & Levey, A. I. (1995). Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: Light and electron microscopy. *Neuroscience*, 65(3), 709–730. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00536-e](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00536-e)
- Zahm, D. S., & Heimer, L. (1990). Two transpallidal pathways originating in the rat nucleus accumbens. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(3), 437–446. <https://doi.org/10.1002/cne.903020302>
- Zecca, L., Zucca, F. A., Wilms, H., & Sulzer, D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: A neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends in Neurosciences*, 26(11), 578–580. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.009>
- Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., & Haydon, P. G. (2004). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9441–9446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401960101>
- Zhang, Z., Bhalla, A., Dean, C., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2009). Synaptotagmin IV: A multifunctional regulator of peptidergic nerve terminals. *Nature Neuroscience*, 12(2), 163–171. <https://doi.org/10.1038/nn.2252>
- Zhang, Z., Wu, Y., Wang, Z., Dunning, F. M., Rehfuss, J., Ramanan, D., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2011). Release mode of large and small dense-core vesicles specified by different synaptotagmin isoforms in PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), 2324–2336. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0159>
- Zhou, F.-W., Jin, Y., Matta, S. G., Xu, M., & Zhou, F.-M. (2009). An Ultra-Short Dopamine Pathway Regulates Basal Ganglia Output. *The Journal of Neuroscience*, 29(33), 10424–10435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4402-08.2009>
- Zweifel, L. S., Parker, J. G., Lobb, C. J., Rainwater, A., Wall, V. Z., Fadok, J. P., Darvas, M., Kim, M. J., Mizumori, S. J. Y., Paladini, C. A., Phillips, P. E. M., & Palmiter, R. D. (2009). Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7281–7288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813415106>

3.7. Supplementary figure

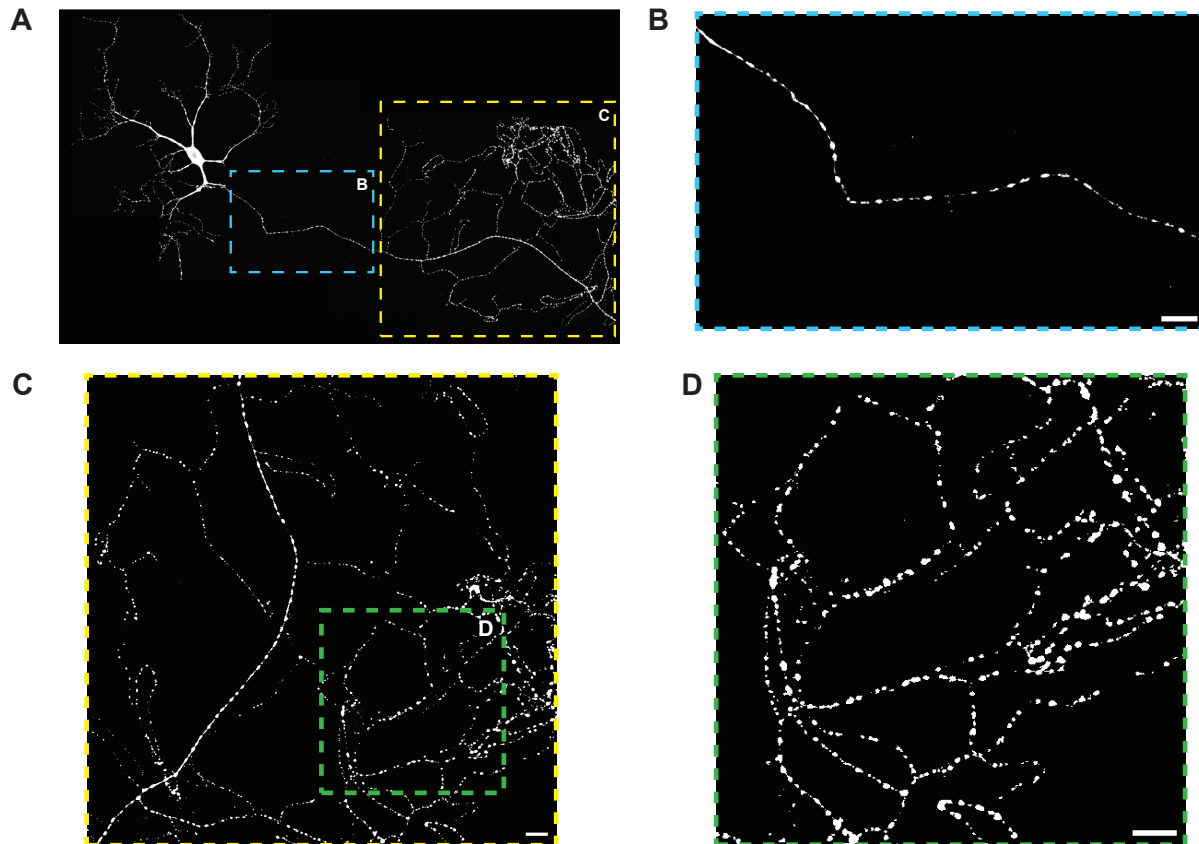


Figure S1: Primary DA neurons form axonal varicosities along the total length of their axons. (A) Reconstructed TH-positive neuron *in vitro*. (B) and (C) are larger magnifications of corresponding selections in image (A) and (D) is a larger magnification of the selection in (C) (scale bar: 10 μm).

Chapitre 4 – Discussion et conclusion

Dans les neurones DAergiques, on retrouve non seulement de la libération de neurotransmetteurs de façon « classique » au niveau des axones, mais aussi au niveau des dendrites et du soma, aussi nommé la libération somatodendritique (STD). Chacun de ces compartiments semble utiliser des senseurs calciques différents de la famille des synaptotagmines (Syt) pour permettre la fusion des vésicules à la membrane plasmique. Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à la Syt1 qui, jusqu'à présent, a seulement été localisée dans les axones de neurones DAergiques (Banerjee et al., 2020; Delignat-Lavaud et al., 2021; Mendez et al., 2011). Nous avons cherché à caractériser davantage la contribution de Syt1 à la libération de DA à l'aide d'une approche de KO conditionnel de Syt1. De façon surprenante, nous avons non seulement observé une baisse importante de la libération de DA dans le striatum, où on retrouve les terminaisons DAergiques, mais aussi dans l'ATV et dans la SNc, où on retrouve leurs dendrites et corps cellulaires (Delignat-Lavaud et al., 2021).

Notre première hypothèse était que, malgré l'absence de démonstration à cet effet, Syt1 pourrait être en partie localisée dans le corps cellulaire et/ou les dendrites des neurones DA, et donc contribuer à la libération STD de DA. Cependant, plusieurs études, tant chez les neurones DAergiques que d'autres types de neurones, n'ont retrouvé Syt1 que dans les axones (Banerjee et al., 2020; Dean et al., 2012; DiAntonio & Schwarz, 1994; Geppert et al., 1994; Mendez et al., 2011). Nous avons donc réinvestigué la localisation de Syt1 avec une technique de microscopie plus précise, soit celle de la microscopie à super-résolution et nous avons observé que Syt1 ne colocalise avec TH et VMAT2 que dans les axones. Ceci confirme aussi les données fonctionnelles que nous avons obtenues en utilisant une channelrhodopsine exprimée exclusivement dans le

compartiment STD des neurones DAergiques en combinaison avec de la tétrodotoxine (TTX) pour bloquer la propagation du signal électrique. Suite à des stimulations optiques, nous observons que la libération de DA n'est pas affectée par la délétion conditionnelle de Syt1 dans les neurones DAergiques (Delignat-Lavaud et al., 2021). Dans nos études, nous avons cependant retrouvé une abondance de VMAT2 dans le compartiment STD des neurones DA, ce qui met en évidence l'existence d'un compartiment vésiculaire abondant dans le corps cellulaire de ces neurones. L'absence d'une localisation équivalente de Syt1 dans ces mêmes neurones représente une démonstration éloquent de l'absence d'un rôle important de Syt1 dans ce compartiment cellulaire.

Nous avons donc exploré une deuxième hypothèse, celle de la présence de collatérales axonales DAergiques dans le mésencéphale. Dans l'ATV, des données anatomiques et fonctionnelles antérieures ont suggéré la présence de terminaisons axonales locales de neurones DAergiques. Or, ces études étaient affectées par des limitations techniques importantes. Notamment, la technique de marquage dans l'étude de Bayer & Pickel (1990) était non spécifique aux neurones DAergiques et les données fonctionnelles obtenues chez le cobaye sont différentes de celles obtenues chez la souris (Bayer & Pickel, 1990a; B. T. Chen et al., 2011a; Delignat-Lavaud et al., 2022b). À l'opposé, les chercheurs du domaine considèrent depuis longtemps que la SNc est dépourvue de terminaisons axonales. Cependant, les recherches précédentes cherchaient plutôt à démontrer la présence d'axones qui terminent localement. Cependant, il est d'importance de déterminer si les axones dits « de passage » contribuent aussi à la libération de DA dans le mésencéphale. Dans notre étude, nous avons observé que la SNc et l'ATV contiennent des varicosités de type axonal, semblables à celle observées dans le striatum. Nous avons d'abord caractérisé la taille des varicosités par microscopie confocale. Nous avons distingué deux populations de varicosités axonales: une de petite taille ($< 1,07 \mu\text{m}^2$), qui est la plus abondante

dans le striatum, et une de plus grande taille ($\geq 1,07 \mu\text{m}^2$). On observe que la population de varicosités la plus importante dans le mésencéphale était celle de petite taille. Ces dernières pourraient donc représenter des zones de relâche de DA semblables à celles retrouvées que dans le striatum.

Nous avons aussi tenté de mesurer la colocalisation de Syt1 et eYFP dans ces régions suite à une infection avec un AAV permettant l'expression conditionnelle de la protéine eYFP dans les neurones DAergiques. Cependant, la densité élevée de terminaisons, couplé aux limites de résolution de la microscopie confocale, ne nous ont pas permis de démontrer hors de tout doute la présence de varicosités axonales exprimant à la fois Syt1 et la eYFP. C'est pour cela que nous avons aussi caractérisé les varicosités eYFP-positives par la microscopie électronique. Nous avons identifié que de nombreuses structures exprimant la eYFP dans l'ATV et la SNc contiennent également des amis de vésicules semblables à celles retrouvées classiquement dans les terminaisons axonales. Nous avons par ailleurs observé que la majorité des varicosités axonales dans l'ATV et la SNc étaient des varicosités dites « asynaptiques », c'est-à-dire qu'elles contiennent des vésicules mais ne forment pas de synapse (Descarries et al., 1996). Il est fort probable que ces varicosités relâchent de la DA par transmission volumique. Il est cependant possible que certaines d'entre elles forment des synapses dans un autre plan focal. De plus, nous avons aussi observé des varicosités positives pour eYFP dotées d'une structure synaptique dans l'ATV et la SNc. Globalement, ces observations sont en accord avec l'hypothèse d'une contribution axonale à la libération de DA locale dans l'ATV et la SNc. Cependant, ces conclusions sont tirées d'une infection partielle du mésencéphale et donc nous avons seulement observé quelques varicosités synaptiques. Il serait donc intéressant de répliquer ces expériences de microscopie électronique dans une souris transgénique qui exprime un rapporteur fluorescent sous

le contrôle du promoteur DAT pour pouvoir étudier toutes les neurones DAergiques du mésencéphale.

En parallèle, nous avons fait les mêmes études dans le MFB, où circulent les axones de neurones DAergiques pour atteindre leur cible principale dans des régions comme le striatum et le cortex. Initialement, nous avons considéré que le MFB serait dépourvue de zones de relâches axonales. Cependant, l'observation de varicosités axonales, couplée à la baisse de colocalisation entre eYFP et Syt1 dans les coupes provenant de souris Syt1^{-/-} nous amène à nous questionner sur la possibilité de relâche de DA dans cette région. Certaines études antérieures ont suggéré de manière anatomique qu'il pourrait y avoir de la libération de DA à cet endroit. En effet, une étude a rapporté que des terminaisons contenant des vésicules à corps dense sont présents dans le MFB, une caractéristique propre aux neurones à monoamine (Sipe & Moore, 1977). De plus, il a été montré que les axones DAergiques dans le MFB expriment le DAT, ce qui suggère que de la DA pourrait être sécrétée dans le milieu (Bagalkot et al., 2021). Cependant, aucune étude n'a jusqu'à maintenant tenté de mesurer la libération de DA dans cette région. D'autres études seront donc nécessaires pour déterminer si la DA est libérée dans cette région et si cette relâche est comparable aux niveaux détectés dans le mésencéphale et le striatum.

Quelques études antérieures ont démontré que la libération STD dans la SNc est plus résiliente à la libération axonale dans le striatum dans un contexte parkinsonien. Cette observation cadre bien dans l'hypothèse de la mort rétrograde qui stipule que la dégénérescence des neurones DAergiques dans la MP commence non pas au niveau du corps cellulaire, mais plutôt dans les axones. Des études précédentes suggèrent par ailleurs la présence de mécanismes compensatoires dans la SNc dans le contexte de modèles de la MP, ce qui appuie l'hypothèse de la plus grande résilience de la libération de DA dans cette région. En effet, une étude a démontré qu'il y a un

bourgeoisement axonal dans l'ATV suite à une lésion 6-OHDA chez des rats P3 (Xavier et al., 1994). Or, nous n'avons pas observé cette néoinnervation dans notre étude, mais plutôt une augmentation de l'expression de Syt1. Ceci suggère que la libération axonale locale est augmentée pour compenser la perte de DA dans le mésencéphale. Cependant, ces résultats se basent sur de la microscopie confocale dans des tranches de mésencéphales où la fausse colocalisation est augmentée par la présence des autres terminaisons locales. En effet, il existe de nombreuses terminaisons 5-HT dans la SNc qui pourraient contribuer en partie à ce genre de fausse colocalisation eYFP/Syt1 (Azmitia & Segal, 1978; Beier et al., 2015; Ogawa et al., 2014; Watabe-Uchida et al., 2012). Il serait donc intéressant d'effectuer la même analyse de colocalisation avec un marqueur des neurones 5-HT pour éliminer la contribution de leurs terminaisons à la fausse colocalisation. De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet de la 6-OHDA sur l'expression de Syt1 dans un modèle in vitro où les axones pourraient être isolées.

La majorité des études antérieures sur la libération de DA dans l'ATV et la SNc réfèrent à la libération STD lorsqu'ils décrivent la libération de DA dans le mésencéphale. Cependant, nos travaux suggèrent que la libération dite « STD » dans le mésencéphale n'est probablement pas composée seulement de la libération provenant du soma et des dendrites locaux et que la libération axonale contribue probablement de façon importante aux niveaux de DA détectés. Basé sur les travaux présentés dans ce mémoire, nous estimons qu'il serait donc plus approprié dorénavant de décrire cette libération comme étant « mésencéphalique ».

Bibliographie

- Agnati, L. F., Zoli, M., Strömberg, I., & Fuxe, K. (1995). Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, *69*(3), 711–726. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00308-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00308-6)
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1995). The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, *18*(2), 63–64.
- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, *13*(7), 266–271. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90107-1](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90107-1)
- Alexander, G. E., Crutcher, M. D., & DeLong, M. R. (1990). Basal ganglia-thalamocortical circuits: Parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. *Progress in Brain Research*, *85*, 119–146.
- Andersson, D. R., Nissbrandt, H., & Bergquist, F. (2006). Partial depletion of dopamine in substantia nigra impairs motor performance without altering striatal dopamine neurotransmission. *European Journal of Neuroscience*, *24*(2), 617–624. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04953.x>
- Ann D. Crocker. (1997). The Regulation of Motor Control: An Evaluation of the Role of Dopamine Receptors in the Substantia Nigra. *Reviews in the Neurosciences*, *8*(1), 55–76. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.1997.8.1.55>
- Aravamudan, B., Fergestad, T., Davis, W. S., Rodesch, C. K., & Broadie, K. (1999). Drosophila Unc-13 is essential for synaptic transmission. *Nature Neuroscience*, *2*(11), 965–971. <https://doi.org/10.1038/14764>
- Azmitia, E. C., & Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *179*(3), 641–667. <https://doi.org/10.1002/cne.901790311>
- Bernard Katz (1969). The release of neural transmitter substances. *Liverpool University Press*, 5–39.
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2013). Synaptotagmin-1 and Synaptotagmin-7 Trigger Synchronous and Asynchronous Phases of Neurotransmitter Release. *Neuron*, *80*(4), 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.026>
- Bäckman, C. M., Malik, N., Zhang, Y., Shan, L., Grinberg, A., Hoffer, B. J., Westphal, H., & Tomac, A. C. (2006). Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *44*(8), 383–390. <https://doi.org/10.1002/dvg.20228>
- Bagalkot, T. R., Block, E. R., Bucchin, K., Balcita-Pedicino, J. J., Calderon, M., Sesack, S. R., & Sorkin, A. (2021). Dopamine Transporter Localization in Medial Forebrain Bundle Axons Indicates Its Long-Range Transport Primarily by Membrane Diffusion with a Limited

- Contribution of Vesicular Traffic on Retromer-Positive Compartments. *Journal of Neuroscience*, 41(2), 234–250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0744-20.2020>
- Bahuguna, J., Weidel, P., & Morrison, A. (2019). Exploring the role of striatal D1 and D2 medium spiny neurons in action selection using a virtual robotic framework. *The European Journal of Neuroscience*, 49(6), 737–753. <https://doi.org/10.1111/ejn.14021>
- Bai, J., He, F., Novikova, S. I., Undie, A. S., Dracheva, S., Haroutunian, V., & Lidow, M. S. (2004). Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biological Psychiatry*, 56(6), 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.06.022>
- Banerjee, A., Imig, C., Balakrishnan, K., Kershberg, L., Lipstein, N., Uronen, R.-L., Wang, J., Cai, X., Benseler, F., Rhee, J. S., Cooper, B. H., Liu, C., Wojcik, S. M., Brose, N., & Kaeser, P. S. (2022). Molecular and functional architecture of striatal dopamine release sites. *Neuron*, 110(2), 248-265.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.028>
- Banerjee, A., Lee, J., Nemcova, P., Liu, C., & Kaeser, P. S. (2020). Synaptotagmin-1 is the Ca²⁺ sensor for fast striatal dopamine release. *ELife*, 9, e58359. <https://doi.org/10.7554/eLife.58359>
- Bayer, V. E., & Pickel, V. M. (1990). Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: Relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(9), 2996–3013.
- Becker, C., Jick, S. S., & Meier, C. R. (2008). Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, 70(16 Pt 2), 1438–1444. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000303818.38960.44>
- Beckstead, M. J., Ford, C. P., Phillips, P. E. M., & Williams, J. T. (2007). Presynaptic regulation of dendrodendritic dopamine transmission. *The European Journal of Neuroscience*, 26(6), 1479–1488. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05775.x>
- Beckstead, M. J., Grandy, D. K., Wickman, K., & Williams, J. T. (2004). Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 42(6), 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.019>
- Beier, K. T., Steinberg, E. E., DeLoach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X. J., Kremer, E. J., Malenka, R. C., & Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*, 162(3), 622–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Bendahmane, M., Bohannon, K. P., Bradberry, M. M., Rao, T. C., Schmidtke, M. W., Abbineni, P. S., Chon, N. L., Tran, S., Lin, H., Chapman, E. R., Knight, J. D., & Anantharam, A. (2018). The synaptotagmin C2B domain calcium-binding loops modulate the rate of fusion pore expansion. *Molecular Biology of the Cell*, 29(7), 834–845. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-11-0623>

- Bergquist, F., Niazi, H. S., & Nissbrandt, H. (2002). Evidence for different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. *Brain Research*, 950(1–2), 245–253. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03047-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03047-0)
- Bergquist, F., Shahabi, H. N., & Nissbrandt, H. (2003). Somatodendritic dopamine release in rat substantia nigra influences motor performance on the accelerating rod. *Brain Research*, 973(1), 81–91.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., & Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the Neurological Sciences*, 20(4), 415–455. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(73\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(73)90175-5)
- Bhalla, A., Tucker, W. C., & Chapman, E. R. (2005). Synaptotagmin isoforms couple distinct ranges of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ concentration to SNARE-mediated membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4755–4764. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0277>
- Bischofberger, J., Geiger, J. R. P., & Jonas, P. (2002). Timing and efficacy of Ca²⁺ channel activation in hippocampal mossy fiber boutons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(24), 10593–10602.
- Björklund, A., & Lindvall, O. (1975). Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: Suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Research*, 83(3), 531–537. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90849-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90849-5)
- Bolam, J. P., & Pissadaki, E. K. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. *Movement Disorders*, 27(12), 1478–1483. <https://doi.org/10.1002/mds.25135>
- Bolam, J. P., & Smith, Y. (1990). The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Research*, 529(1–2), 57–78. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90811-o](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90811-o)
- Bowenkamp, K. E., David, D., Lapchak, P. L., Henry, M. A., Granholm, A. C., Hoffer, B. J., & Mahalik, T. J. (1996). 6-hydroxydopamine induces the loss of the dopaminergic phenotype in substantia nigra neurons of the rat. A possible mechanism for restoration of the nigrostriatal circuit mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Experimental Brain Research*, 111(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00229549>
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., & Rüb, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *Journal of Neurology*, 249 Suppl 3, III/1-5. <https://doi.org/10.1007/s00415-002-1301-4>
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Broadie, K., Bellen, H. J., DiAntonio, A., Littleton, J. T., & Schwarz, T. L. (1994). Absence of synaptotagmin disrupts excitation-secretion coupling during synaptic transmission.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10727–10731. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10727>
- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C., & Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: A calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5059), 1021–1025. <https://doi.org/10.1126/science.1589771>
- Burke, R. E., & O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 246, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.011>
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5999), 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>
- Caillé, I., Dumartin, B., & Bloch, B. (1996). Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Research*, 730(1), 17–31. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00424-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00424-6)
- Calo, L., Wegrzynowicz, M., Santivañez-Perez, J., & Grazia Spillantini, M. (2016). Synaptic failure and α -synuclein. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 31(2), 169–177. <https://doi.org/10.1002/mds.26479>
- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*, 180(4596), 1200–1200. <https://doi.org/10.1038/1801200a0>
- Chan, C. S., Guzman, J. N., Ilijic, E., Mercer, J. N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G. E., & Surmeier, D. J. (2007). 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*, 447(7148), 1081–1086. <https://doi.org/10.1038/nature05865>
- Chanaday, N. L., Cousin, M. A., Milosevic, I., Watanabe, S., & Morgan, J. R. (2019). The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 39(42), 8209–8216. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1158-19.2019>
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O. M., & Südhof, T. C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028>
- Chapman, E. R. (2002). Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7), 498–508. <https://doi.org/10.1038/nrm855>
- Chapman, E. R., Desai, R. C., Davis, A. F., & Tornehl, C. K. (1998). Delineation of the Oligomerization, AP-2 Binding, and Synprint Binding Region of the C2B Domain of Synaptotagmin*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32966–32972. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32966>
- Chapman, E. R., & Jahn, R. (1994). Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(8), 5735–5741.

- Chefer, V. I., Thompson, A. C., Zapata, A., & Shippenberg, T. S. (2009). Overview of Brain Microdialysis. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.]*, CHAPTER, Unit7.1. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0701s47>
- Chen, B. T., Patel, J. C., Moran, K. A., & Rice, M. E. (2011). Differential Calcium Dependence of Axonal Versus Somatodendritic Dopamine Release, with Characteristics of Both in the Ventral Tegmental Area. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00039>
- Chen, B. T., & Rice, M. E. (2001). Novel Ca²⁺ dependence and time course of somatodendritic dopamine release: Substantia nigra versus striatum. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7841–7847.
- Chen, C., & Jonas, P. (2017). Synaptotagmins: That's Why So Many. *Neuron*, 94(4), 694–696. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.011>
- Chen, C., Satterfield, R., Young, S. M., & Jonas, P. (2017). Triple Function of Synaptotagmin 7 Ensures Efficiency of High-Frequency Transmission at Central GABAergic Synapses. *Cell Reports*, 21(8), 2082–2089. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.122>
- Chen, N.-H., Reith, M. E. A., & Quick, M. W. (2004). Synaptic uptake and beyond: The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Archiv*, 447(5), 519–531. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1064-5>
- Cheramy, A., Leviel, V., & Glowinski, J. (1981). Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature*, 289(5798), 537–542. <https://doi.org/10.1038/289537a0>
- Chergui, K., Charléty, P. J., Akaoka, H., Saunier, C. F., Brunet, J. L., Buda, M., Svensson, T. H., & Chouvet, G. (1993). Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. *The European Journal of Neuroscience*, 5(2), 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00479.x>
- Chesselet, M.-F., & Richter, F. (2011). Modelling of Parkinson's disease in mice. *The Lancet. Neurology*, 10(12), 1108–1118. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70227-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70227-7)
- Chicka, M. C., Hui, E., Liu, H., & Chapman, E. R. (2008). Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca²⁺. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8), 827–835. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1463>
- Cobb, W. S., & Abercrombie, E. D. (2003). Differential regulation of somatodendritic and nerve terminal dopamine release by serotonergic innervation of substantia nigra. *Journal of Neurochemistry*, 84(3), 576–584. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01546.x>
- Collingridge, G. L., James, T. A., & MacLeod, N. K. (1979). Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra [proceedings]. *The Journal of Physiology*, 290(2), 44P.
- Courtney, N. A., Mamaligas, A. A., & Ford, C. P. (2012). Species Differences in Somatodendritic Dopamine Transmission Determine D2-Autoreceptor-Mediated Inhibition of Ventral Tegmental Area Neuron Firing. *The Journal of Neuroscience*, 32(39), 13520–13528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2745-12.2012>

- Cragg, S. J., & Greenfield, S. A. (1997). Differential Autoreceptor Control of Somatodendritic and Axon Terminal Dopamine Release in Substantia Nigra, Ventral Tegmental Area, and Striatum. *The Journal of Neuroscience*, 17(15), 5738–5746. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05738.1997>
- Cragg, S. J., Hawkey, C. R., & Greenfield, S. A. (1997). Comparison of Serotonin and Dopamine Release in Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area: Region and Species Differences. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2378–2386. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062378.x>
- Cragg, S. J., Nicholson, C., Kume-Kick, J., Tao, L., & Rice, M. E. (2001). Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *Journal of Neurophysiology*, 85(4), 1761–1771. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.4.1761>
- Cragg, S. J., & Rice, M. E. (2004). DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.011>
- Cragg, S. J., & Rice, M. E. (2005). Somatodendritic Dopamine Release in Midbrain. In M. Ludwig (Ed.), *Dendritic Neurotransmitter Release* (pp. 69–83). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-23696-1_5
- Cragg, S., Rice, M. E., & Greenfield, S. A. (1997). Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *Journal of Neurophysiology*, 77(2), 863–873. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.863>
- Croft, B. G., Fortin, G. D., Corera, A. T., Edwards, R. H., Beaudet, A., Trudeau, L.-E., & Fon, E. A. (2005). Normal biogenesis and cycling of empty synaptic vesicles in dopamine neurons of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 306–315. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0559>
- Cuello, A. C., & Kelly, J. S. (1977). Electron microscopic autoradiographic localization of [3H]-dopamine in the dendrites of the dopaminergic neurones of the rat substantia nigra in vivo [proceedings]. *British Journal of Pharmacology*, 59(3), 527P-528P.
- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7), 398–399. <https://doi.org/10.1007/BF02147990>
- Dai, H., Shin, O.-H., Machius, M., Tomchick, D. R., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2004). Structural basis for the evolutionary inactivation of Ca²⁺ binding to synaptotagmin 4. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(9), 844–849. <https://doi.org/10.1038/nsmb817>
- 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. *Journal of Neurochemistry*, 88(6), 1398–1405. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02277.x>
- Daniel, J. A., Galbraith, S., Iacovitti, L., Abdipranoto, A., & Vissel, B. (2009). Functional heterogeneity at dopamine release sites. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(46), 14670–14680. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1349-09.2009>

- Dean, C., Dunning, F. M., Liu, H., Bomba-Warczak, E., Martens, H., Bharat, V., Ahmed, S., & Chapman, E. R. (2012). Axonal and dendritic synaptotagmin isoforms revealed by a pHluorin-syt functional screen. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(9), 1715–1727. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-08-0707>
- Dean, C., Liu, H., Dunning, F. M., Chang, P. Y., Jackson, M. B., & Chapman, E. R. (2009). Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release. *Nature Neuroscience*, *12*(6), 767–776. <https://doi.org/10.1038/nn.2315>
- Delignat-Lavaud, B., Ducrot, C., Kouwenhoven, W., Feller, N., & Trudeau, L.-É. (2022). Implication of synaptotagmins 4 and 7 in activity-dependent somatodendritic dopamine release in the ventral midbrain. *Open Biology*, *12*(3), 210339. <https://doi.org/10.1098/rsob.210339>
- Delignat-Lavaud, B., Kano, J., Ducrot, C., Massé, I., Mukherjee, S., Giguère, N., Moquin, L., Lévesque, C., Nanni, S. B., Bourque, M.-J., Rosa-Neto, P., Lévesque, D., De Beaumont, L., & Trudeau, L.-É. (2021). The calcium sensor synaptotagmin-1 is critical for phasic axonal dopamine release in the striatum and mesencephalon, but is dispensable for basic motor behaviors in mice. *BioRxiv*, 2021.09.15.460511. <https://doi.org/10.1101/2021.09.15.460511>
- Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S., Bosler, O., & Doucet, G. (1996). Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: A quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *The Journal of Comparative Neurology*, *375*(2), 167–186. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961111\)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
- Descarries, L., Watkins, K. C., & Lapierre, Y. (1977). Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Research*, *133*(2), 197–222. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90759-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90759-4)
- Deutch, A. Y., Goldstein, M., Baldino, F., & Roth, R. H. (1988). Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *537*, 27–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb42095.x>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(14), 5274–5278.
- Diana, M. (2011). The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction and Its Potential Therapeutic Value. *Frontiers in Psychiatry*, *2*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2011.00064>
- DiAntonio, A., & Schwarz, T. L. (1994). The effect on synaptic physiology of synaptotagmin mutations in drosophila. *Neuron*, *12*(4), 909–920. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90342-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90342-5)
- Dobi, A., Margolis, E. B., Wang, H.-L., Harvey, B. K., & Morales, M. (2010). Glutamatergic and Nonglutamatergic Neurons of the Ventral Tegmental Area Establish Local Synaptic

- Contacts with Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 30(1), 218–229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3884-09.2010>
- Dopeso-Reyes, I. G., Rico, A. J., Roda, E., Sierra, S., Pignataro, D., Lanz, M., Sucunza, D., Chang-Azancot, L., & Lanciego, J. L. (2014). Calbindin content and differential vulnerability of midbrain efferent dopaminergic neurons in macaques. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2014.00146>
- Ducrot, C., Bourque, M.-J., Delmas, C. V. L., Racine, A.-S., Bello, D. G., Delignat-Lavaud, B., Lycas, M. D., Fallon, A., Michaud-Tardif, C., Nanni, S. B., Herborg, F., Gether, U., Nanci, A., Takahashi, H., Parent, M., & Trudeau, L.-E. (2020). Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *BioRxiv*, 2020.05.11.088351. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088351>
- Ducrot, C., Bourque, M.-J., Delmas, C. V. L., Racine, A.-S., Guadarrama Bello, D., Delignat-Lavaud, B., Domenic Lycas, M., Fallon, A., Michaud-Tardif, C., Burke Nanni, S., Herborg, F., Gether, U., Nanci, A., Takahashi, H., Parent, M., & Trudeau, L.-E. (2021). Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(8), e21791. <https://doi.org/10.1096/fj.202100201RR>
- Elverfors, A., Jonason, J., Jonason, G., & Nissbrandt, H. (1997). Effects of drugs interfering with sodium channels and calcium channels on the release of endogenous dopamine from superfused substantia nigra slices. *Synapse (New York, N.Y.)*, 26(4), 359–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199708\)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199708)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5)
- Fasano, C., Thibault, D., & Trudeau, L.-E. (2008). Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Current Protocols in Neuroscience, Chapter 3*, Unit 3.21. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0321s44>
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., & Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824), 41–49. <https://doi.org/10.1038/35065004>
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F., & Meldolesi, J. (1994). Neurotransmitter release: Fusion or “kiss-and-run”? *Trends in Cell Biology*, 4(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90025-6)
- Filloux, F., & Townsend, J. J. (1993). Pre- and Postsynaptic Neurotoxic Effects of Dopamine Demonstrated by Intrastratial Injection. *Experimental Neurology*, 119(1), 79–88. <https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1008>
- Fon, E. A., Pothos, E. N., Sun, B. C., Killeen, N., Sulzer, D., & Edwards, R. H. (1997). Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron*, 19(6), 1271–1283. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80418-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80418-3)
- Ford, C. P., Gantz, S. C., Phillips, P. E. M., & Williams, J. T. (2010). Control of Extracellular Dopamine at Dendrite and Axon Terminals. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 6975–6983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1020-10.2010>

- Ford, C. P., Phillips, P. E. M., & Williams, J. T. (2009). The Time Course of Dopamine Transmission in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neuroscience*, *29*(42), 13344–13352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3546-09.2009>
- Fornstedt, B. (1990). 5. Role of catechol autooxidation in the degeneration of dopamine neurons. *Acta Neurologica Scandinavica*, *82*(S129), 12–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1990.tb02595.x>
- Fortin, D. L., Nemani, V. M., Voglmaier, S. M., Anthony, M. D., Ryan, T. A., & Edwards, R. H. (2005). Neural Activity Controls the Synaptic Accumulation of α -Synuclein. *The Journal of Neuroscience*, *25*(47), 10913–10921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2922-05.2005>
- Fortin, G. D., Desrosiers, C. C., Yamaguchi, N., & Trudeau, L. E. (2006). Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *Journal of Neurochemistry*, *96*(6), 1740–1749. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03699.x>
- Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., Saegusa, C., Kim, T., Loh, Y. P., & Yamamoto, A. (2003). Nerve growth factor-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(5), 3220–3226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208323200>
- Fukuda, M., Kanno, E., Satoh, M., Saegusa, C., & Yamamoto, A. (2004). Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(50), 52677–52684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409241200>
- Fukuda, M., Kojima, T., & Mikoshiba, K. (1996). Phospholipid composition dependence of Ca²⁺-dependent phospholipid binding to the C2A domain of synaptotagmin IV. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(14), 8430–8434. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8430>
- Futami, T., Takakusaki, K., & Kitai, S. T. (1995). Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunculo-pontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neuroscience Research*, *21*(4), 331–342. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)00869-h](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)00869-h)
- Garner, C. C., Kindler, S., & Gundelfinger, E. D. (2000). Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(3), 321–327. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00093-3)
- Gauthier, J., Parent, M., Lévesque, M., & Parent, A. (1999). The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Research*, *834*(1–2), 228–232. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01573-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01573-5)
- Geffen, L. B., Jessell, T. M., Cuello, A. C., & Iversen, L. L. (1976). Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature*, *260*(5548), 258–260. <https://doi.org/10.1038/260258a0>
- Gentet, L. J., & Williams, S. R. (2007). Dopamine Gates Action Potential Backpropagation in Midbrain Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *27*(8), 1892–1901. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5234-06.2007>

- Georges, F., & Aston-Jones, G. (2002). Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: A novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(12), 5173–5187.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), 717–727. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90556-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90556-8)
- German, D. C., & Manaye, K. F. (1993). Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): Three-dimensional reconstruction in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 331(3), 297–309. <https://doi.org/10.1002/cne.903310302>
- Giguère, N., Burke Nanni, S., & Trudeau, L.-E. (2018). On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson’s Disease. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2018.00455>
- Giguère, N., Delignat-Lavaud, B., Herborg, F., Voisin, A., Li, Y., Jacquemet, V., Anand-Srivastava, M., Gether, U., Giros, B., & Trudeau, L.-É. (2019). Increased vulnerability of nigral dopamine neurons after expansion of their axonal arborization size through D2 dopamine receptor conditional knockout. *PLoS Genetics*, 15(8), e1008352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008352>
- Giguère, N., Pacelli, C., Saumure, C., Bourque, M.-J., Matheoud, D., Levesque, D., Slack, R. S., Park, D. S., & Trudeau, L.-É. (2018). Comparative analysis of Parkinson’s disease-associated genes in mice reveals altered survival and bioenergetics of Parkin-deficient dopamine neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(25), 9580–9593. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000499>
- 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. <https://doi.org/10.1038/379606a0>
- Glinka, Y., Tipton, K. F., & Youdim, M. B. (1996). Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry*, 66(5), 2004–2010. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66052004.x>
- Glinka, Y. Y., & Youdim, M. B. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology*, 292(3–4), 329–332. [https://doi.org/10.1016/0926-6917\(95\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0926-6917(95)90040-3)
- González-Rodríguez, P., Zampese, E., Stout, K. A., Guzman, J. N., Ilijic, E., Yang, B., Tkatch, T., Stavarache, M. A., Wokosin, D. L., Gao, L., Kaplitt, M. G., López-Barneo, J., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2021). Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04059-0>
- Greenamyre, J. T., & Hastings, T. G. (2004). Biomedicine. Parkinson’s—Divergent causes, convergent mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1120–1122. <https://doi.org/10.1126/science.1098966>

- Grenhoff, J., Nisell, M., Ferré, S., Aston-Jones, G., & Svensson, T. H. (1993). Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *Journal of Neural Transmission. General Section*, *93*(1), 11–25. <https://doi.org/10.1007/BF01244934>
- Groves, P. M., & Linder, J. C. (1983). Dendro-dendritic synapses in substantia nigra: Descriptions based on analysis of serial sections. *Experimental Brain Research*, *49*(2), 209–217. <https://doi.org/10.1007/BF00238581>
- Guzman, J. N., Sánchez-Padilla, J., Chan, C. S., & Surmeier, D. J. (2009). Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *29*(35), 11011–11019. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2519-09.2009>
- Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, *468*(7324), 696–700. <https://doi.org/10.1038/nature09536>
- Hattori, T., McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1979). Dendro axonic neurotransmission. II. Morphological sites for the synthesis, binding and release of neurotransmitters in dopaminergic dendrites in the substantia nigra and cholinergic dendrites in the neostriatum. *Brain Research*, *170*(1), 71–83. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90941-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90941-7)
- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L., & Evans, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *Journal of Cell Biology*, *81*(2), 275–300. <https://doi.org/10.1083/jcb.81.2.275>
- Hoffman, A. F., & Gerhardt, G. A. (1999). Differences in pharmacological properties of dopamine release between the substantia nigra and striatum: An in vivo electrochemical study. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *289*(1), 455–463.
- Hoffman, A. F., van Horne, C. G., Eken, S., Hoffer, B. J., & Gerhardt, G. A. (1997). In Vivo Microdialysis Studies of Somatodendritic Dopamine Release in the Rat Substantia Nigra: Effects of Unilateral 6-OHDA Lesions and GDNF. *Experimental Neurology*, *147*(1), 130–141. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6571>
- Hornykiewicz, O. (1998). Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology*, *51*(2 Suppl 2), S2-9. https://doi.org/10.1212/wnl.51.2_suppl_2.s2
- Hui, E., Bai, J., Wang, P., Sugimori, M., Llinas, R. R., & Chapman, E. R. (2005). Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: Candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(14), 5210–5214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500941102>
- Huson, V., van Boven, M. A., Stuefer, A., Verhage, M., & Cornelisse, L. N. (2019). Synaptotagmin-1 enables frequency coding by suppressing asynchronous release in a temperature dependent manner. *Scientific Reports*, *9*(1), 11341. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47487-9>
- Ibata, K., Fukuda, M., Hamada, T., Kabayama, H., & Mikoshiba, K. (2000). Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites. *Journal of Neurochemistry*, *74*(2), 518–526. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740518.x>

- Ibata, K., Hashikawa, T., Tsuboi, T., Terakawa, S., Liang, F., Mizutani, A., Fukuda, M., & Mikoshiba, K. (2002). Non-polarized distribution of synaptotagmin IV in neurons: Evidence that synaptotagmin IV is not a synaptic vesicle protein. *Neuroscience Research*, 43(4), 401–406. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00066-4)
- Jackman, S. L., Turecek, J., Belinsky, J. E., & Regehr, W. G. (2016). The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature*, 529(7584), 88–91. <https://doi.org/10.1038/nature16507>
- Jaffe, E. H., Marty, A., Schulte, A., & Chow, R. H. (1998). Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(10), 3548–3553.
- Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(2), 483–488.
- Johnson, S. W., Seutin, V., & North, R. A. (1992). Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: Role of electrogenic sodium pump. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5082), 665–667. <https://doi.org/10.1126/science.1329209>
- Jones, B. E., & Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Research*, 127(1), 23–53. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90378-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90378-X)
- Joyce, M. P., & Rayport, S. (2000). Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience*, 99(3), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00219-0)
- Juraska, J. M., Wilson, C. J., & Groves, P. M. (1977). The substantia nigra of the rat: A golgi study. *Journal of Comparative Neurology*, 172(4), 585–599. <https://doi.org/10.1002/cne.901720403>
- Kaesler, P. S., & Regehr, W. G. (2014). Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annual Review of Physiology*, 76, 333–363. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170338>
- Kalivas, P. W., Churchill, L., & Klitenick, M. A. (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 57(4), 1047–1060. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90048-k](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90048-k)
- Khaliq, Z. M., & Bean, B. P. (2010). Pacemaking in Dopaminergic Ventral Tegmental Area Neurons: Depolarizing Drive from Background and Voltage-Dependent Sodium Conductances. *The Journal of Neuroscience*, 30(21), 7401–7413. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0143-10.2010>
- Kim, Y., Park, M. K., & Chung, S. (2008). Voltage-operated Ca²⁺ channels regulate dopamine release from somata of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(4), 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.099>

- Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T. E., Muzyczka, N., Mandel, R. J., & Björklund, A. (2002). Parkinson-Like Neurodegeneration Induced by Targeted Overexpression of α -Synuclein in the Nigrostriatal System. *The Journal of Neuroscience*, 22(7), 2780–2791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02780.2002>
- Kochubey, O., Babai, N., & Schneggenburger, R. (2016). A Synaptotagmin Isoform Switch during the Development of an Identified CNS Synapse. *Neuron*, 90(5), 984–999. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.038>
- Kochubey, O., & Schneggenburger, R. (2011). Synaptotagmin increases the dynamic range of synapses by driving Ca^{2+} -evoked release and by clamping a near-linear remaining Ca^{2+} sensor. *Neuron*, 69(4), 736–748. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.013>
- Korotkova, T. M., Sergeeva, O. A., Eriksson, K. S., Haas, H. L., & Brown, R. E. (2003). Excitation of Ventral Tegmental Area Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons by Orexins/Hypocretins. *The Journal of Neuroscience*, 23(1), 7–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00007.2003>
- Koyama, S., Kanemitsu, Y., & Weight, F. F. (2005). Spontaneous activity and properties of two types of principal neurons from the ventral tegmental area of rat. *Journal of Neurophysiology*, 93(6), 3282–3293. <https://doi.org/10.1152/jn.00776.2004>
- Kuhr, G., Ewing, G., & Mark, R. (1985). *Amphetamine Attenuates the Stimulated Release of Dopamine in Vivo*. 232, 7.
- Kupsch, A., Schmidt, W., Gizatullina, Z., Debska-Vielhaber, G., Voges, J., Striggow, F., Panther, P., Schwegler, H., Heinze, H.-J., Vielhaber, S., & Gellerich, F. N. (2014). 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: Respirometric, histological, and behavioral analyses. *Journal of Neural Transmission*, 121(10), 1245–1257. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1185-3>
- Labouesse, M. A., Cola, R. B., & Patriarchi, T. (2020). GPCR-Based Dopamine Sensors-A Detailed Guide to Inform Sensor Choice for In vivo Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), E8048. <https://doi.org/10.3390/ijms21218048>
- Lacey, M. G., Mercuri, N. B., & North, R. A. (1987). Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *The Journal of Physiology*, 392, 397–416.
- Lategan, A. J., Marien, M. R., & Colpaert, F. C. (1990). Effects of locus coeruleus lesions on the release of endogenous dopamine in the rat nucleus accumbens and caudate nucleus as determined by intracerebral microdialysis. *Brain Research*, 523(1), 134–138. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91646-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91646-x)
- Lefevre, E. M., Pisansky, M. T., Toddes, C., Baruffaldi, F., Pravetoni, M., Tian, L., Kono, T. J. Y., & Rothwell, P. E. (2020). Interruption of continuous opioid exposure exacerbates drug-evoked adaptations in the mesolimbic dopamine system. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 45(11), 1781–1792. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0643-x>

- Leviel, V. (2001). The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochemistry International*, 38(2), 83–106. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00076-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00076-0)
- Leyton, M. (2017). Altered dopamine transmission as a familial risk trait for addictions. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 13, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.11.011>
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G. W., Brose, N., & Südhof, T. C. (1995). Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature*, 375(6532), 594–599. <https://doi.org/10.1038/375594a0>
- Liprando, L. A., Miner, L. H., Blakely, R. D., Lewis, D. A., & Sesack, S. R. (2004). Ultrastructural interactions between terminals expressing the norepinephrine transporter and dopamine neurons in the rat and monkey ventral tegmental area. *Synapse*, 52(4), 233–244. <https://doi.org/10.1002/syn.20023>
- Littleton, J. T., Serano, T. L., Rubin, G. M., Ganetzky, B., & Chapman, E. R. (1999). Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV. *Nature*, 400(6746), 757–760. <https://doi.org/10.1038/23462>
- Liu, C., Goel, P., & Kaeser, P. S. (2021). Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(6), 345–358. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00455-7>
- Liu, C., & Kaeser, P. S. (2019). Mechanisms and regulation of dopamine release. *Current Opinion in Neurobiology*, 57, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.01.001>
- Liu, C., Kershberg, L., Wang, J., Schneeberger, S., & Kaeser, P. S. (2018). Dopamine Secretion Is Mediated by Sparse Active Zone-like Release Sites. *Cell*, 172(4), 706–718.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.008>
- Liu, H., Dean, C., Arthur, C. P., Dong, M., & Chapman, E. R. (2009). Autapses and Networks of Hippocampal Neurons Exhibit Distinct Synaptic Transmission Phenotypes in the Absence of Synaptotagmin I. *Journal of Neuroscience*, 29(23), 7395–7403. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1341-09.2009>
- Liu, K., Tedeschi, A., Park, K. K., & He, Z. (2011). Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 131–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113723>
- Llinás, R., Steinberg, I. Z., & Walton, K. (1981). Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophysical Journal*, 33(3), 289–321.
- Löw, K., & Aebischer, P. (2012). Use of viral vectors to create animal models for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 48(2), 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.038>
- Ludwig, M., Sabatier, N., Bull, P. M., Landgraf, R., Dayanithi, G., & Leng, G. (2002). Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature*, 418(6893), 85–89. <https://doi.org/10.1038/nature00822>

- Luo, S. X., & Huang, E. J. (2016). Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. *The American Journal of Pathology*, *186*(3), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.023>
- Martel, P., Leo, D., Fulton, S., Bérard, M., & Trudeau, L.-E. (2011). Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS One*, *6*(5), e20402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020402>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009). Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, *29*(2), 444–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>
- Matsui, A., Jarvie, B. C., Robinson, B. G., Hentges, S. T., & Williams, J. T. (2014). Separate GABA afferents to dopamine neurons mediate acute action of opioids, development of tolerance and expression of withdrawal. *Neuron*, *82*(6), 1346–1356. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.030>
- Matthew, W. D., Tsavaler, L., & Reichardt, L. F. (1981). Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *The Journal of Cell Biology*, *91*(1), 257–269. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.1.257>
- Maximov, A., Lao, Y., Li, H., Chen, X., Rizo, J., Sørensen, J. B., & Südhof, T. C. (2008). Genetic analysis of synaptotagmin-7 function in synaptic vesicle exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(10), 3986–3991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712372105>
- Maximov, A., & Südhof, T. C. (2005). Autonomous Function of Synaptotagmin 1 in Triggering Synchronous Release Independent of Asynchronous Release. *Neuron*, *48*(4), 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.006>
- Mejías-Aponte, C. A., Drouin, C., & Aston-Jones, G. (2009). Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: Prominent inputs from medullary homeostatic centers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(11), 3613–3626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4632-08.2009>
- Melis, M., Gessa, G. L., & Diana, M. (2000). Different mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *24*(6), 993–1006. [https://doi.org/10.1016/s0278-5846\(00\)00119-6](https://doi.org/10.1016/s0278-5846(00)00119-6)
- Mendez, J., Bourque, M.-J., Fasano, C., Kortleven, C., & Trudeau, L.-E. (2011). Somatodendritic Dopamine Release Requires Synaptotagmin 4 and 7 and the Participation of Voltage-gated Calcium Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 23928–23937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.218032>
- Mercer, L., del Fiacco, M., & Cuello, A. C. (1979). The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurones. *Experientia*, *35*(1), 101–103. <https://doi.org/10.1007/BF01917903>

- Michel, P. P., & Hefti, F. (1990). Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *Journal of Neuroscience Research*, 26(4), 428–435. <https://doi.org/10.1002/jnr.490260405>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Mittelstaedt, T., Alvaréz-Baron, E., & Schoch, S. (2010). RIM proteins and their role in synapse function. *Biological Chemistry*, 391(6), 599–606. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.064>
- Miyazaki, T., & Lacey, M. G. (1998). Presynaptic inhibition by dopamine of a discrete component of GABA release in rat substantia nigra pars reticulata. *The Journal of Physiology*, 513(3), 805–817. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.805ba.x>
- Morales, M., & Root, D. H. (2014). Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*, 282, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.032>
- Nestler, E. J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, 8(11), 1445–1449. <https://doi.org/10.1038/nn1578>
- Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B., & Roeper, J. (2002). Ih Channels Contribute to the Different Functional Properties of Identified Dopaminergic Subpopulations in the Midbrain. *The Journal of Neuroscience*, 22(4), 1290–1302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-04-01290.2002>
- Nicklas, W. J., Vyas, I., & Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sciences*, 36(26), 2503–2508. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90146-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90146-8)
- Nieoullon, A., Cheramy, A., & Glowinski, J. (1977). Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. *Nature*, 266(5600), 375–377. <https://doi.org/10.1038/266375a0>
- Nirenberg, M. J., Vaughan, R. A., Uhl, G. R., Kuhar, M. J., & Pickel, V. M. (1996). The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(2), 436–447.
- Ogawa, S. K., Cohen, J. Y., Hwang, D., Uchida, N., & Watabe-Uchida, M. (2014). Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. *Cell Reports*, 8(4), 1105–1118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.042>
- Oliveras-Salvá, M., Van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Nuber, S., D’Hooge, R., Van den Haute, C., & Baekelandt, V. (2013). RAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-44>
- Orimo, S., Uchihara, T., Nakamura, A., Mori, F., Kakita, A., Wakabayashi, K., & Takahashi, H. (2008). Axonal α -synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac

- sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*, *131*(3), 642–650. <https://doi.org/10.1093/brain/awm302>
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M.-J., Lévesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L.-É. (2015). Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*, *25*(18), 2349–2360. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>
- Parent, M., & Parent, A. (2006). Relationship between axonal collateralization and neuronal degeneration in basal ganglia. In P. Riederer, H. Reichmann, M. B. H. Youdim, & M. Gerlach (Eds.), *Parkinson's Disease and Related Disorders* (pp. 85–88). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_14
- Parizek, J., Hassler, R., & Bak, I. J. (1971). Light and electron microscopic autoradiography of substantia nigra of rat after intraventricular administration of tritium labelled norepinephrine, dopamine, serotonin and the precursors. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, *115*(1), 137–148. <https://doi.org/10.1007/BF00330222>
- Patriarchi, T., Cho, J. R., Merten, K., Howe, M. W., Marley, A., Xiong, W.-H., Folk, R. W., Broussard, G. J., Liang, R., Jang, M. J., Zhong, H., Dombeck, D., von Zastrow, M., Nimmerjahn, A., Gradinaru, V., Williams, J. T., & Tian, L. (2018). Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science*, *360*(6396), eaat4422. <https://doi.org/10.1126/science.aat4422>
- Pereira, D. B., Schmitz, Y., Mészáros, J., Merchant, P., Hu, G., Li, S., Henke, A., Lizardi-Ortiz, J. E., Karpowicz, R. J., Morgenstern, T. J., Sonders, M. S., Kanter, E., Rodriguez, P. C., Mosharov, E. V., Sames, D., & Sulzer, D. (2016). Fluorescent false neurotransmitter reveals functionally silent dopamine vesicle clusters in the striatum. *Nature Neuroscience*, *19*(4), 578–586. <https://doi.org/10.1038/nn.4252>
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., & Südhof, T. C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, *345*(6272), 260–263. <https://doi.org/10.1038/345260a0>
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C. S., Dombeck, D. A., Deisseroth, K., & Awatramani, R. (2018). Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nature Neuroscience*, *21*(9), 1260–1271. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0203-4>
- Prensa, L., & Parent, A. (2001). The Nigrostriatal Pathway in the Rat: A Single-Axon Study of the Relationship between Dorsal and Ventral Tier Nigral Neurons and the Striosome/Matrix Striatal Compartments. *Journal of Neuroscience*, *21*(18), 7247–7260. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07247.2001>
- Preston, R. J., McCrea, R. A., Chang, H. T., & Kitai, S. T. (1981). Anatomy and physiology of substantia nigra and retrorubral neurons studied by extra- and intracellular recording and by horseradish peroxidase labeling. *Neuroscience*, *6*(3), 331–344. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90127-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90127-5)

- Pucak, M. L., & Grace, A. A. (1994). Evidence that systemically administered dopamine antagonists activate dopamine neuron firing primarily by blockade of somatodendritic autoreceptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *271*(3), 1181–1192.
- Radnikow, G., & Misgeld, U. (1998). Dopamine D1 Receptors Facilitate GABAergic Synaptic Currents in the Rat Substantia Nigra Pars Reticulata. *Journal of Neuroscience*, *18*(6), 2009–2016. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-06-02009.1998>
- Ramirez, D. M. O., & Kavalali, E. T. (2012). The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cellular Logistics*, *2*(1), 20–27. <https://doi.org/10.4161/cl.20114>
- Rao, T. C., Passmore, D. R., Peleman, A. R., Das, M., Chapman, E. R., & Anantharam, A. (2014). Distinct fusion properties of synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 bearing dense core granules. *Molecular Biology of the Cell*, *25*(16), 2416–2427. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0702>
- Reubi, J. C., & Sandri, C. (1979). Ultrastructural observations on intercellular contacts of nigral dendrites. *Neuroscience Letters*, *13*(2), 183–188. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(79\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(79)90039-9)
- Rice, M. E., & Cragg, S. J. (2008). Dopamine Spillover after Quantal Release: Rethinking Dopamine Transmission in the Nigrostriatal Pathway. *Brain Research Reviews*, *58*(2), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.02.004>
- Rice, M. E., Cragg, S. J., & Greenfield, S. A. (1997). Characteristics of Electrically Evoked Somatodendritic Dopamine Release in Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area In Vitro. *Journal of Neurophysiology*, *77*(2), 853–862. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.853>
- Rice, M. E., & Patel, J. C. (2015). Somatodendritic dopamine release: Recent mechanistic insights. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1672), 20140185. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0185>
- Rice, M. E., Richards, C. D., Nedergaard, S., Hounsgaard, J., Nicholson, C., & Greenfield, S. A. (1994). Direct monitoring of dopamine and 5-HT release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Experimental Brain Research*, *100*(3), 395–406. <https://doi.org/10.1007/BF02738400>
- Riederer, P., & Wuketich, S. (1976). Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *Journal of Neural Transmission*, *38*(3–4), 277–301. <https://doi.org/10.1007/BF01249445>
- Rinvik, E., & Ottersen, O. P. (1993). Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: An electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *6*(1), 19–30. [https://doi.org/10.1016/0891-0618\(93\)90004-n](https://doi.org/10.1016/0891-0618(93)90004-n)
- Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R., & Kuhar, M. J. (1987). Cocaine Receptors on Dopamine Transporters Are Related to Self-Administration of Cocaine. *Science*, *237*(4819), 1219–1223. <https://doi.org/10.1126/science.2820058>

- Robertson, G. S., & Robertson, H. A. (1989). Evidence that L-dopa-induced rotational behavior is dependent on both striatal and nigral mechanisms. *Journal of Neuroscience*, *9*(9), 3326–3331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-09-03326.1989>
- Robinson, D. L., Venton, B. J., Heien, M. L. A. V., & Wightman, R. M. (2003). Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. *Clinical Chemistry*, *49*(10), 1763–1773. <https://doi.org/10.1373/49.10.1763>
- Robinson, D. L., & Wightman, R. M. (2004). Nomifensine amplifies subsecond dopamine signals in the ventral striatum of freely-moving rats. *Journal of Neurochemistry*, *90*(4), 894–903. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02559.x>
- Robinson, I. M., Ranjan, R., & Schwarz, T. L. (2002). Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca²⁺ binding in the C2A domain. *Nature*, *418*(6895), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature00915>
- Russell, V. A., Lamm, M. C., Allin, R., de Villiers, A. S., Searson, A., & Taljaard, J. J. (1989). Effect of selective noradrenergic denervation on noradrenaline content and [3H]dopamine release in rat nucleus accumbens slices. *Neurochemical Research*, *14*(2), 169–172. <https://doi.org/10.1007/BF00969634>
- Santiago, M., & Westerink, B. H. C. (1991). Characterization and Pharmacological Responsiveness of Dopamine Release Recorded by Microdialysis in the Substantia Nigra of Conscious Rats. *Journal of Neurochemistry*, *57*(3), 738–747. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08214.x>
- Sarre, S., Yuan, H., Jonkers, N., Hemelrijck, A. V., Ebinger, G., & Michotte, Y. (2004). In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Journal of Neurochemistry*, *90*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02471.x>
- Sauer, H., & Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, *59*(2), 401–415. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90605-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90605-x)
- Schultz, W. (2007). Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annual Review of Neuroscience*, *30*(1), 259–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722>
- Sesack, S., Aoki, C., & Pickel, V. (1994). Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *The Journal of Neuroscience*, *14*(1), 88–106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00088.1994>
- Simon, H., Le Moal, M., Stinus, L., & Calas, A. (1979). Anatomical relationships between the ventral mesencephalic tegmentum—A 10 region and the locus coeruleus as demonstrated by anterograde and retrograde tracing techniques. *Journal of Neural Transmission*, *44*(1), 77–86. <https://doi.org/10.1007/BF01252703>
- Sipe, Jack C., & Moore, Robert Y. (1977). The lateral hypothalamic area: An ultrastructural analysis. *Cell and Tissue Research*, *179*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00219795>

- Smiley, J. F., Levey, A. I., Ciliax, B. J., & Goldman-Rakic, P. S. (1994). D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: Predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(12), 5720–5724.
- Soykan, T., Maritzen, T., & Haucke, V. (2016). Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Current Opinion in Neurobiology*, *39*, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.03.005>
- Stewart, J. (2008). Review. Psychological and neural mechanisms of relapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *363*(1507), 3147–3158. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0084>
- Stuber, G. D., Hnasko, T. S., Britt, J. P., Edwards, R. H., & Bonci, A. (2010). Dopaminergic Terminals in the Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. *Journal of Neuroscience*, *30*(24), 8229–8233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1754-10.2010>
- Südhof, T. C. (2002). Synaptotagmins: Why so many? *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(10), 7629–7632. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100052200>
- Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, *27*, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernández-Chacón, R., Lao, Y., & Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin VII as a Plasma Membrane Ca²⁺ Sensor in Exocytosis. *Neuron*, *30*(2), 459–473. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00290-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00290-2)
- Sulzer, D., Chen, T., Lau, Y., Kristensen, H., Rayport, S., & Ewing, A. (1995). Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *The Journal of Neuroscience*, *15*(5), 4102–4108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-04102.1995>
- Sulzer, D., Joyce, M. P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S. N., Hattori, T., & Rayport, S. (1998). Dopamine Neurons Make Glutamatergic Synapses In Vitro. *Journal of Neuroscience*, *18*(12), 4588–4602. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04588.1998>
- Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S. F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., Yong, Z., Gao, Y., Peng, W., Wang, L., Zhang, S., Du, J., Lin, D., Xu, M., Kreitzer, A. C., ... Li, Y. (2018). A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice. *Cell*, *174*(2), 481–496.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.042>
- Sun, F., Zhou, J., Dai, B., Qian, T., Zeng, J., Li, X., Zhuo, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Qian, C., Tan, K., Feng, J., Dong, H., Lin, D., Cui, G., & Li, Y. (2020). Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nature Methods*, *17*(11), 1156–1166. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00981-9>
- Surmeier, D. J., Graves, S. M., & Shen, W. (2014). Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *29*, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.07.008>

- Takakusaki, K., Shiroyama, T., Yamamoto, T., & Kitai, S. T. (1996). Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *The Journal of Comparative Neurology*, *371*(3), 345–361. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960729\)371:3<345::AID-CNE1>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960729)371:3<345::AID-CNE1>3.0.CO;2-2)
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., ... Jahn, R. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, *127*(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tanaka, M., Sotomatsu, A., Kanai, H., & Hirai, S. (1991). Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron. *Journal of the Neurological Sciences*, *101*(2), 198–203. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(91\)90046-A](https://doi.org/10.1016/0022-510X(91)90046-A)
- Tassin, J. P., Lavielle, S., Hervé, D., Blanc, G., Thierry, A. M., Alvarez, C., Berger, B., & Glowinski, J. (1979). Collateral sprouting and reduced activity of the rat mesocortical dopaminergic neurons after selective destruction of the ascending noradrenergic bundles. *Neuroscience*, *4*(11), 1569–1582. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90020-4)
- Tipton, K. F., & Singer, T. P. (1993). Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *Journal of Neurochemistry*, *61*(4), 1191–1206. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb13610.x>
- Tofaris, G. K., Garcia Reitböck, P., Humby, T., Lambourne, S. L., O'Connell, M., Ghetti, B., Gossage, H., Emson, P. C., Wilkinson, L. S., Goedert, M., & Grazia Spillantini, M. (2006). Pathological Changes in Dopaminergic Nerve Cells of the Substantia Nigra and Olfactory Bulb in Mice Transgenic for Truncated Human α -Synuclein(1–120): Implications for Lewy Body Disorders. *The Journal of Neuroscience*, *26*(15), 3942–3950. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4965-05.2006>
- Trent, F., & Tepper, J. M. (1991). Dorsal raphé stimulation modifies striatal-evoked antidromic invasion of nigral dopaminergic neurons in vivo. *Experimental Brain Research*, *84*(3), 620–630. <https://doi.org/10.1007/BF00230974>
- Tritsch, N. X., Ding, J. B., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature*, *490*(7419), 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature11466>
- Tritsch, N. X., Granger, A. J., & Sabatini, B. L. (2016). Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(3), 139–145. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.21>
- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1998). Ca²⁺ binding to synaptotagmin: How many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *The EMBO Journal*, *17*(14), 3921–3930. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3921>
- Uchigashima, M., Ohtsuka, T., Kobayashi, K., & Watanabe, M. (2016). Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic

- postsynaptic structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(15), 4206–4211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514074113>
- Vevea, J. D., Kusick, G. F., Courtney, K. C., Chen, E., Watanabe, S., & Chapman, E. R. (2021). Synaptotagmin 7 is targeted to the axonal plasma membrane through γ -secretase processing to promote synaptic vesicle docking in mouse hippocampal neurons. *ELife*, 10, e67261. <https://doi.org/10.7554/eLife.67261>
- Virmani, T., Han, W., Liu, X., Südhof, T. C., & Kavalali, E. T. (2003). Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *The EMBO Journal*, 22(20), 5347–5357. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg514>
- Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T. C., Neher, E., & Verhage, M. (2001). Munc18-1 Promotes Large Dense-Core Vesicle Docking. *Neuron*, 31(4), 581–592. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00391-9)
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R., & Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.022>
- von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J., & Südhof, T. C. (1997). The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca²⁺ binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 14314–14319. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14314>
- Wakamatsu, M., Ishii, A., Iwata, S., Sakagami, J., Ukai, Y., Ono, M., Kanbe, D., Muramatsu, S., Kobayashi, K., Iwatsubo, T., & Yoshimoto, M. (2008). Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human alpha-synuclein in mice. *Neurobiology of Aging*, 29(4), 574–585. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.017>
- Wang, C.-T., Lu, J.-C., Bai, J., Chang, P. Y., Martin, T. F. J., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2003). Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature*, 424(6951), 943–947. <https://doi.org/10.1038/nature01857>
- Wang, P., Chicka, M. C., Bhalla, A., Richards, D. A., & Chapman, E. R. (2005). Synaptotagmin VII is targeted to secretory organelles in PC12 cells, where it functions as a high-affinity calcium sensor. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), 8693–8702. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8693-8702.2005>
- Wang, Y. M., Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Xu, F., Jones, S. R., Bock, C. B., Miller, G. W., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1997). Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron*, 19(6), 1285–1296. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80419-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80419-5)
- Wassef, M., Berod, A., & Sotelo, C. (1981). Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience*, 6(11), 2125–2139. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90003-8)

- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A., & Uchida, N. (2012). Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron*, *74*(5), 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>
- Wen, H., Linhoff, M. W., McGinley, M. J., Li, G.-L., Corson, G. M., Mandel, G., & Brehm, P. (2010). Distinct roles for two synaptotagmin isoforms in synchronous and asynchronous transmitter release at zebrafish neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(31), 13906–13911. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008598107>
- Westerink, B. H. C., & Justice, J. B. (1991). Chapter 2—Microdialysis compared with other in vivo release models. In T. E. Robinson & J. B. Justice (Eds.), *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences* (Vol. 7, pp. 23–43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81194-3.50007-1>
- Wilson, C. J., Groves, P. M., & Fifková, E. (1977). Monoaminergic synapses, including dendrodendritic synapses in the rat substantia nigra. *Experimental Brain Research*, *30*(2), 161–174. <https://doi.org/10.1007/BF00237248>
- Witkovsky, P., Patel, J. C., Lee, C. R., & Rice, M. E. (2009). Immunocytochemical identification of proteins involved in dopamine release from the somatodendritic compartment of nigral dopaminergic neurons. *Neuroscience*, *164*(2), 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.017>
- Wu, M., Hryciyshyn, A. W., & Brudzynski, S. M. (1996). Subpallidal outputs to the nucleus accumbens and the ventral tegmental area: Anatomical and electrophysiological studies. *Brain Research*, *740*(1–2), 151–161. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00859-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00859-1)
- Xavier, F. G. F., Doucet, G., Geffard, M., & Descarries, L. (1994). Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, *59*(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90100-7)
- Xu, J., Pang, Z. P., Shin, O.-H., & Südhof, T. C. (2009). Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release. *Nature Neuroscience*, *12*(6), 759–766. <https://doi.org/10.1038/nn.2320>
- Yamaguchi, T., Sheen, W., & Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *The European Journal of Neuroscience*, *25*(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x>
- Yau, H.-J., Wang, D. V., Tsou, J.-H., Chuang, Y.-F., Chen, B. T., Deisseroth, K., Ikemoto, S., & Bonci, A. (2016). Pontomesencephalic Tegmental Afferents to VTA Non-dopamine Neurons Are Necessary for Appetitive Pavlovian Learning. *Cell Reports*, *16*(10), 2699–2710. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.007>
- Yee, A. G., Forbes, B., Cheung, P.-Y., Martini, A., Burrell, M. H., Freestone, P. S., & Lipski, J. (2019). Action potential and calcium dependence of tonic somatodendritic dopamine release in the Substantia Nigra pars compacta. *Journal of Neurochemistry*, *148*(4), 462–479. <https://doi.org/10.1111/jnc.14587>

- Yelnik, J., François, C., Percheron, G., & Heyner, S. (1987). Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 265(4), 455–472. <https://doi.org/10.1002/cne.902650402>
- Yung, K. K., Bolam, J. P., Smith, A. D., Hersch, S. M., Ciliax, B. J., & Levey, A. I. (1995). Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: Light and electron microscopy. *Neuroscience*, 65(3), 709–730. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00536-e](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00536-e)
- Zahm, D. S., & Heimer, L. (1990). Two transpallidal pathways originating in the rat nucleus accumbens. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(3), 437–446. <https://doi.org/10.1002/cne.903020302>
- Zecca, L., Zucca, F. A., Wilms, H., & Sulzer, D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: A neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends in Neurosciences*, 26(11), 578–580. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.009>
- Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., & Haydon, P. G. (2004). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9441–9446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401960101>
- Zhang, Z., Bhalla, A., Dean, C., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2009). Synaptotagmin IV: A multifunctional regulator of peptidergic nerve terminals. *Nature Neuroscience*, 12(2), 163–171. <https://doi.org/10.1038/nn.2252>
- Zhang, Z., Wu, Y., Wang, Z., Dunning, F. M., Rehfuss, J., Ramanan, D., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2011). Release mode of large and small dense-core vesicles specified by different synaptotagmin isoforms in PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), 2324–2336. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0159>
- Zhou, F.-W., Jin, Y., Matta, S. G., Xu, M., & Zhou, F.-M. (2009). An Ultra-Short Dopamine Pathway Regulates Basal Ganglia Output. *The Journal of Neuroscience*, 29(33), 10424–10435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4402-08.2009>
- Zweifel, L. S., Parker, J. G., Lobb, C. J., Rainwater, A., Wall, V. Z., Fadok, J. P., Darvas, M., Kim, M. J., Mizumori, S. J. Y., Paladini, C. A., Phillips, P. E. M., & Palmiter, R. D. (2009). Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7281–7288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813415106>

Annexe - Développement d'une technique de détection de la libération spontanée

Contexte

L'absence de phénotype moteur chez les Syt1 cKO nous amène à nous questionner sur les mécanismes qui contribuent à maintenir chez ces souris les niveaux extracellulaires de DA. Plusieurs publications démontrent que l'élimination de Syt1 augmente la fréquence de l'exocytose spontanée, notamment dans les neurones corticaux et de l'hippocampe, puisqu'il est suggéré que Syt1 agit comme inhibiteur de synaptotagmines à haute affinité au calcium (Bai et al., 2004; Broadie et al., 1994; Huson et al., 2019; Kochubey & Schneggenburger, 2011; Maximov & Südhof, 2005; Xu et al., 2009). Il serait donc d'intérêt d'étudier ce phénomène dans les neurones DAergiques et d'évaluer la contribution de la libération spontanée en absence de la libération évoquée.

Il existe plusieurs techniques de détection de la DA extracellulaire, chacune avec des résolutions temporelles et spatiales différentes. Une technique courante est celle de la voltammétrie cyclique qui mesure l'oxydation de la DA sur la surface d'une électrode en carbone en réponse à des rampes de voltages (D. L. Robinson et al., 2003). Or, bien qu'elle ait une haute résolution temporelle, cette technique permet de détecter la libération évoquée de DA, mais pas les niveaux de base. La microdialyse couplée à la quantification par HPLC est une autre méthode de détection de DA. Celle-ci permet de mesurer la libération spontanée. Cependant, cette technique est limitée dans sa résolution temporelle, qui est dans l'ordre des minutes ainsi que spatiale qui est dans l'ordre des micromètres (C. Liu et al., 2021). Elle ne permettrait donc pas de quantifier les fluctuations rapides de DA extracellulaires à proximité de neurones DA en culture.

Nous avons donc cherché à développer une technique qui permet de détecter la libération à l'échelle neuronale à une meilleure résolution temporelle que la microdialyse. Nous avons donc adapté une technique de détection de DA basée sur l'utilisation d'un senseur de DA encodé génétiquement et appelé GRAB_{DA} (G-protein-coupled receptor-activation-based DA). Il s'agit d'un récepteur D2 de la DA modifié, qui exprime un fluorophore eGFP sensible à la conformation du récepteur. Lorsque la DA se lie au récepteur, elle induit un changement de conformation et la fluorescence de la GFP est augmentée. Cette technique peut être utilisée tant *in vivo* que *in vitro* et est caractérisée par une sensibilité et une résolution spatiotemporelle élevée, idéale pour la détection de la libération spontanée (Sun et al., 2018).

Méthode

Pour évaluer l'efficacité de la technique, nous avons exprimé de manière virale le gène de GRAB_{DA} (AAV9-hsyn-DA2h(h-D02), WZ Biosciences) dans des neurones mésencéphaliques de souris préparés à partir de souris Syt1^{+/+} (de la colonie DAT^{IRES-Cre/+} ; Syt1^{lox/lox}) postnatals (P0-P3), à une concentration cellulaire de 120 000 cellules/ml, mis en culture sur des lamelles de verre. Le virus a été rajouté aux cultures à un jour après la mise en culture (1 DIV). Puisque cette construction est exprimée sous le contrôle d'un promoteur neuronal ubiquitaire hsyn, le GRAB_{DA} s'exprime de façon aléatoire dans n'importe quel type de neurones et son expression n'est donc pas spécifique aux neurones DAergiques. Afin de pouvoir localiser ces derniers, nous avons aussi infecté les cellules avec un virus Cre-dépendant permettant d'exprimer la protéine fluorescente rouge tdTomato (AAV9-CBA-FLEX-tdTOMATO-WPRE, Neurophotomics) à 4 DIV, permettant ainsi une expression sélective dans les neurones DAergiques. À 14 DIV, nous avons mesuré les niveaux de fluorescence dans des neurones exprimant le GRAB_{DA} et localisé à proximité de

prolongements axonaux de neurones DA. Nous avons aussi évalué si les niveaux de DA détectés étaient influencés par certaines drogues qui modulent l'activité électrique des neurones DAergiques et la recapture de DA pour évaluer l'efficacité du senseur.

Les drogues utilisées dans ces expériences ont été diluées dans un salin physiologique Krebs (contient en mM: NaCl, 140; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glucose, 10; sucrose, 6) aux concentrations suivantes : le bloqueur de DAT nomifensine à 10 µM, le bloqueur de canaux sodiques voltage-dépendants tétrodothine (TTX) à 1 µM et l'antagoniste du récepteur D2 raclopride à 10 µM. Les lamelles ont été placées dans une chambre de perfusion et stabilisées pendant 15 minutes avant le début des acquisitions.

Suite à une perfusion de salin Krebs pendant 5 minutes, nous avons d'abord appliqué de la nomifensine, une drogue qui inhibe la recapture de la DA, pendant 5 minutes pour évaluer si ceci augmenterait le signal fluorescent. Ensuite, la TTX a été utilisée pour évaluer quelle partie du signal détecté est dépendant de l'activité électrique des neurones DA. Finalement, nous avons évaluer quelle partie du signal détecté est spécifique pour la DA extracellulaire est bloquant le GRAB_{DA} à l'aide du raclopride, un antagoniste du récepteur D2.

Les images ont été acquises avec une caméra Hamamatsu Orca-Flash 4.0 avec un système d'excitation par lampe au Xénon Lambda DG-4 (Sutter instruments, Novato, CA) avec un objectif à 40x à l'huile (NA= 1.30). Les images ont été acquises à chaque 30 secondes à une exposition de 300ms avec un binning de 4x4 et une excitation de 488nm.

Sur ImageJ, des régions d'intérêts ont été sélectionnées soit sur les corps cellulaires ou prolongements du neurone, ceci afin de mesurer l'intensité moyenne du signal GRAB_{DA} en fonction du temps. Les analyses de fréquence et d'amplitude ont été effectuées sur les images non modifiées tandis que les graphiques représentatifs ont été produits suite à une correction de

blanchissement d'image avec le plugin *bleach correction* du logiciel de traitement d'image Fiji (ImageJ) et le tout a été rapporté en pourcentage de l'état basal (moyenne des 5 premières minutes de l'acquisition).

Résultats

Nous avons observé dans un premier temps que l'intensité du signal fluorescent émis par le GRAB_{DA} (Fig. S1A) démontre des fluctuations (Figure S1B), suggérant que la sonde nous permet de détecter des fluctuations des niveaux extracellulaires de DA à proximité des neurones enregistrés. De plus, la fréquence de ces réponses a augmenté après ajout de la nomifensine (Fig. S1C), ce qui est compatible avec l'hypothèse qu'un blocage de la recapture de DA permet d'augmenter les niveaux extracellulaires de DA (D. L. Robinson & Wightman, 2004). Cependant, nous avons observé que l'amplitude est restée la même après la perfusion de nomifensine (Fig. S1D), ce qui pourrait peut-être être dû à une saturation du senseur utilisé, qui est une forme à haute sensibilité, nommé GRAB_{DA2h}. Nous avons par ailleurs observé que la TTX a induit une forte baisse de la fréquence des pics détectés (Fig. S1C), ainsi que de leur intensité (Fig. S1D). Finalement, nous avons observé qu'une partie du signal résiduel après l'application de TTX a été bloqué par la raclopride, soit près de 6% de la fluorescence initiale. Le signal résiduel après la raclopride correspondrait au signal basal émis par le GRAB_{DA}, indépendamment des niveaux extracellulaires de DA. Cependant, on n'observe pas une abolition complète des pics après l'application de la raclopride. Ceci pourrait être soit attribué à des pics artéfactuels, aussi observables dans plusieurs autres publications (Lefevre et al., 2020; Patriarchi et al., 2018; Sun et al., 2018, 2020) ou à la concentration d'antagoniste utilisée qui ne serait pas suffisante pour bloquer tous les biosenseurs GRAB_{DA}. En effet, on observe une réponse dose-dépendante dans un autre

biosenseur nommé dLight, un récepteur D1 modifié. La fluorescence émise est réduite après une injection de l'antagoniste D1 SCH-23390 à 0.25mg/kg (Patriarchi et al., 2018) et complètement abolie à 10mg/kg (Lefevre et al., 2020). D'autres expériences sont donc requises pour déterminer si on observe ce même phénomène avec le senseur GRAB_{DA}.

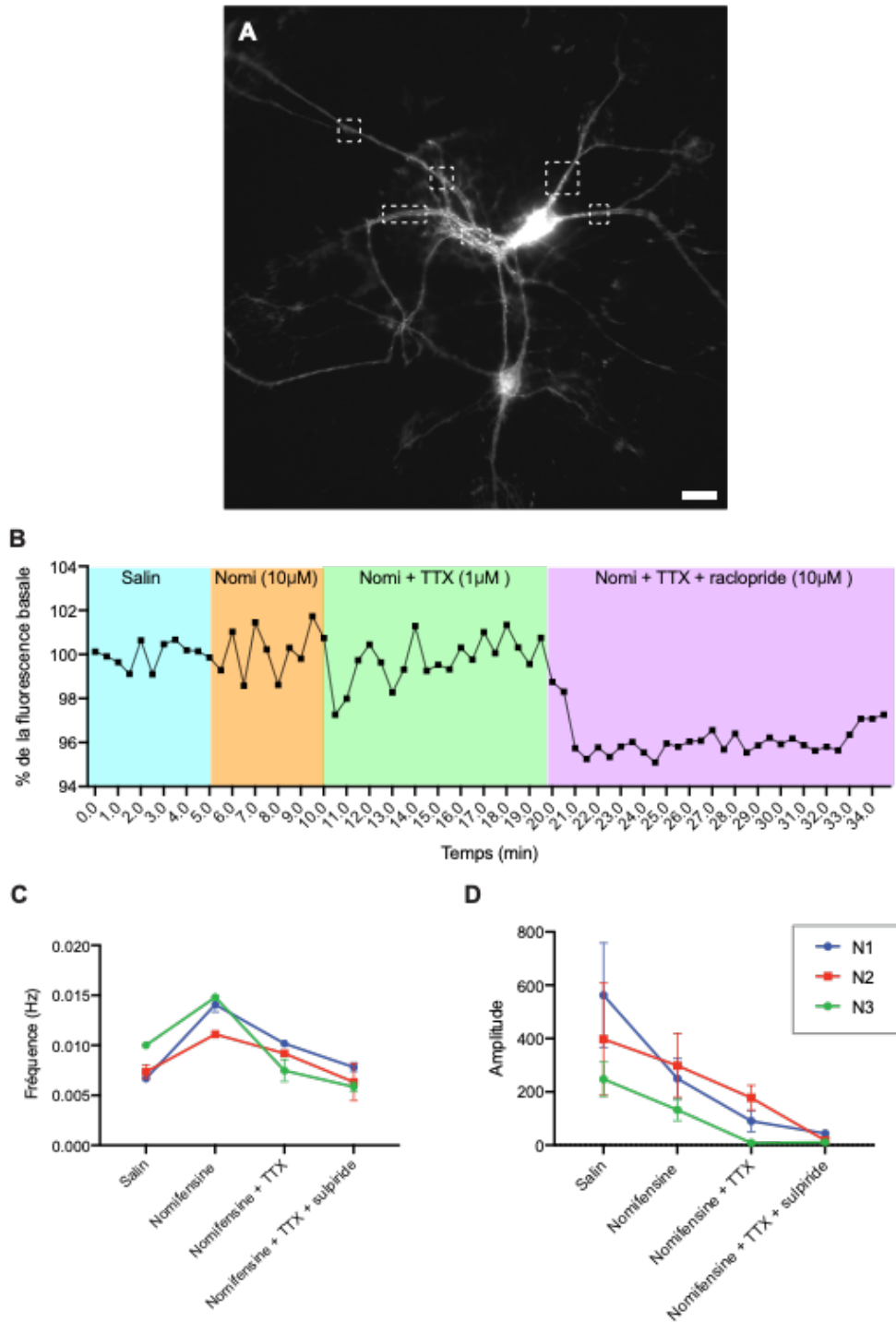
Le senseur GRAB_{DA} apporte aussi une haute résolution spatiale puisqu'il est possible de mesurer la fluorescence de différentes régions d'un même neurone. Dans la figure S2, il est possible d'observer des pics d'intensité différents à différents moments au sein de différents prolongements. Il serait donc possible de comparer les cinétiques de libération de DA entre différents prolongements, tels que les axones et les dendrites d'un même neurone.

Cette technique sera utilisée prochainement dans le laboratoire Trudeau pour étudier les mécanismes moléculaires de la sécrétion spontanée de DA et l'implication de différents senseurs calciques dans cette forme de libération. Dans le cas des souris Syt1^{-/-}, il est possible que les pics de grande amplitude, vraisemblablement causés par la libération phasique de DA, disparaissent, mais que les niveaux basaux de DA soient maintenus, ou même augmentés. Il serait aussi intéressant d'étudier les effets d'une délétion d'un senseur calcique impliqué dans la libération spontanée tel que Syt7 pour valider la technique et nos conclusions. De plus, le senseur GRAB_{DA} utilisé dans cette analyse est un senseur de première génération. On retrouve maintenant d'autres biosenseurs couplés à la protéine G chez lesquelles la sensibilité et le ratio signal sur bruit sont augmentés, tel que ceux de la famille de dLight (Labouesse et al., 2020). Il serait donc d'intérêt d'évaluer ces autres senseurs avec le même protocole.

Nous concluons que cette méthode de détection détecte la DA de manière rapide précise et spécifique. Elle nécessite peu d'équipements spécialisés et est facilement adaptable à diverses

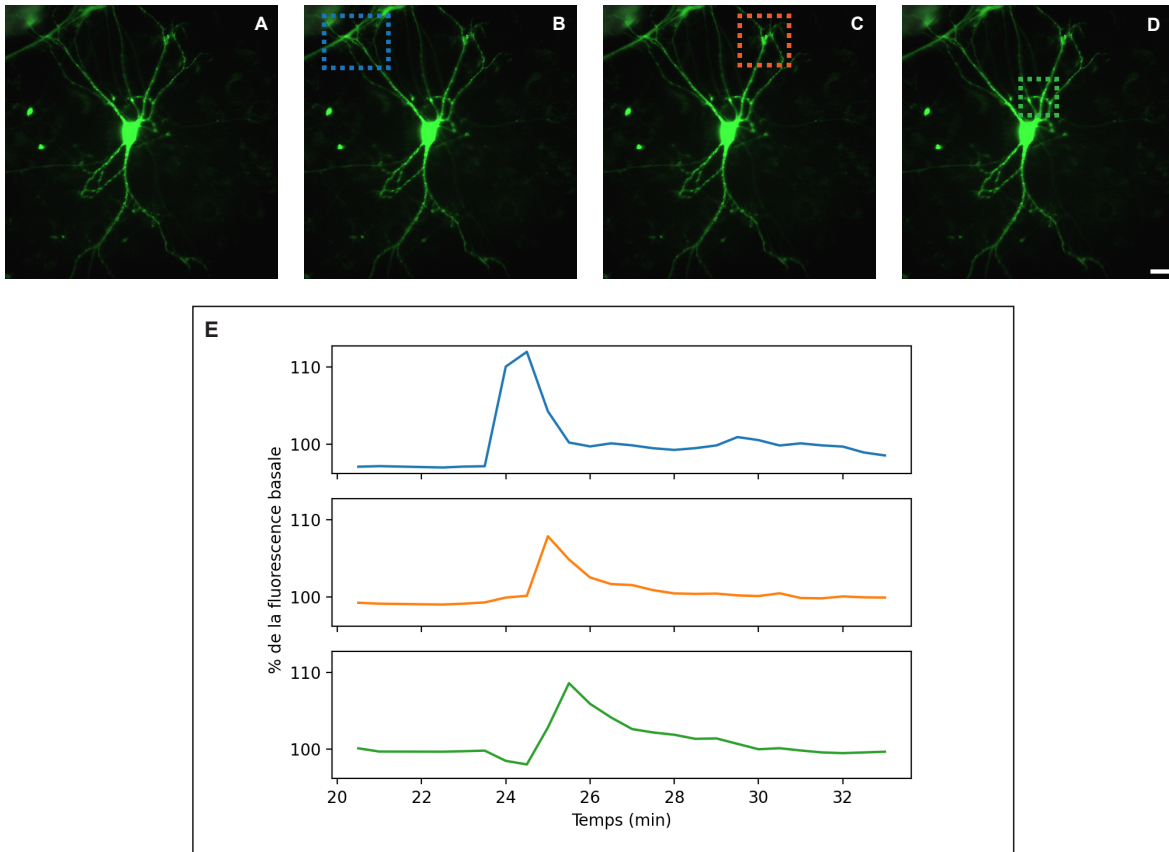
applications. Il y a donc un énorme potentiel d'applications pour l'étude des mécanismes de la libération de la DA.

Figure 1: Fréquence des pics d'intensité fluorescents de GRAB_{DA} en fonction de la drogue perfusée.



(A) Neurone DAergique exprimant la GRAB_{DA} ainsi que les zones de sélection de prolongements utilisées dans l'analyse (barre d'échelle: 30 μm). (B) Tracé moyen de tous les prolongements sélectionnés en (A). (C) Fréquence des pics en fonction des drogues perfusées. Chaque tracé représente la moyenne des fréquences de pics pour toutes les régions d'intérêts tracées pour un seul neurone ($n = 3$). (D) De même que (C), mais ici pour l'amplitude des pics. Nomi, nomifensine; TTX, tetrodotoxine; N1, neurone 1; N2, neurone 2; N3, neurone 3.

Figure 2: Propagation du signal à travers différents prolongements.



(A) Fluorescence basale d'un neurone exprimant la GRAB_{DA}. (B) , (C), et (D) illustrent la propagation du signal à travers le temps (barre d'échelle: 30 μ m). Les tracés des régions sélectionnées sont représentés dans le graphique en (E) avec leur couleur respective.