

Université de Montréal

**Étude de la capacité intrinsèque
des neurones dopaminergiques
à développer une connectivité non-synaptique**

Par

Charles Ducrot

Département de Neurosciences

Faculté de Médecine

Thèse présentée

En vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

En sciences neurologiques

Janvier 2021

© Charles Ducrot, 2021

Université de Montréal

Département de Neurosciences

Faculté de Médecine

Cette thèse s'intitule :

**Étude de la capacité intrinsèque
des neurones dopaminergiques
à développer une connectivité non-synaptique**

Présenté par :

Charles Ducrot

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Graziella Di Cristo,
Président-rapporteur

Louis-Éric Trudeau,
Directeur de recherche

Valérie Mongrain,
Membre du jury

Etienne Herzog,
Examineur externe

Rejean Dubuc,
Représentant du doyen de la FESP



Résumé

Les neurones dopaminergiques (DAergiques) de l'aire tegmentaire ventrale (ATV) et de la substance noire compacte (SNc) sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la motivation, la récompense, l'apprentissage ou encore le contrôle du mouvement volontaire. Ces neurones sont également connus pour être perturbés dans plusieurs grandes maladies du cerveau telles que la schizophrénie, les maladies associées aux drogues d'abus ou dans la maladie de Parkinson. Des études *in vivo* ont démontré que la structure des terminaisons axonales DAergiques pouvait être de type « synaptique » et « non-synaptique ». Ces terminaisons dites « non-synaptiques », dépourvues de toute apposition avec un domaine membranaire postsynaptique, semblent représenter la grande majorité des terminaisons axonales établies par les neurones DAergiques. De façon intéressante, certaines des terminaisons synaptiques ont quant à elles, la capacité de co-libérer du glutamate ou du GABA.

D'une façon générale, la formation et le maintien des synapses fait intervenir des protéines d'adhésion cellulaire dont les plus courantes sont les neurexines (Nrxn) et les neuroligines (Nlgn). Au niveau présynaptique, ces molécules d'adhésion interagissent avec des protéines de la zone active qui sont impliquées dans la régulation de l'exocytose. Parmi elles, on retrouve RIM1/2, Piccolo/Bassoon, ELKS ou encore Munc-13. Du côté postsynaptique, ces protéines d'adhésion cellulaire interagissent directement avec les protéines d'échafaudages telles que PSD95 ou Géphyrine.

Mes travaux de doctorat ont consisté dans un premier temps à caractériser de façon exhaustive les terminaisons axonales établies par les neurones DAergiques. La proportion et la structure moléculaire des terminaisons synaptiques et non-synaptiques ont ainsi été évaluées. Dans un premier article, via l'utilisation d'un système *in vitro*, nous avons démontré qu'une minorité des

terminaisons DAergiques (~20%) était de nature synaptique, une proportion totalement différente lorsque comparée avec les neurones glutamatergiques ou GABAergiques, dont les terminaisons synaptiques sont très fortement majoritaires (~80%). De façon intéressante, la protéine de ZABassoon a été retrouvée majoritairement au sein des terminaisons synaptiques suggérant une différence de structure avec les terminaisons non-synaptiques. Finalement, au niveau du mécanisme de formation des synapses, nous avons mis en évidence que la surexpression de la protéine présynaptique *Nrxn-1 α ^{SS4}* dans les neurones DAergiques permet d'augmenter la proportion de terminaisons synaptiques alors que la surexpression de la *Nlgn-1^{AB}* est, quant à elle, capable d'induire une différenciation présynaptique DAergique.

Dans un second article, nous avons voulu investiguer plus en détails le rôle des *Nrxn* dans la synaptogénèse DAergique. Pour ce faire, nous avons pris avantage d'un modèle animal totalement inédit mais absolument fascinant où nous avons évalué l'impact d'une délétion conditionnelle de l'ensemble des *Nrxn* sur la connectivité DAergique. Dans cette étude nous avons démontré que la densité de synapses excitatrices et inhibitrices établies par les neurones DAergiques n'était pas affectée chez les souris *DAT::NrxnsKO* et ce en comparaison des animaux de souche sauvage. Dans un deuxième temps, via des enregistrements électrophysiologiques, nous avons évalué la neurotransmission excitatrice et inhibitrice établie par les neurones DAergiques. Les résultats n'ont pas révélé de changement dans la neurotransmission excitatrice mais ont curieusement révélé un renforcement de l'activité synaptique inhibitrice chez les animaux *DAT::NrxnsKO* et ce par rapport aux animaux du groupe contrôle. Finalement, via la mise en place de tests comportementaux, nous avons pu observer que les animaux *DAT::NrxnsKO* avaient une capacité d'apprentissage et de locomotion identique aux animaux de souche sauvage, cependant, une stimulation pharmacologique du système DAergique par l'amphétamine a révélé d'une

diminution significative de la locomotion chez les souris DAT::NrnxKO, pouvant refléter une baisse de la neurotransmission DAergique en condition non physiologique.

Ces travaux de doctorat amènent pour la première fois une nouvelle vision sur la capacité des neurones DAergiques à établir une arborisation axonale majoritairement non-synaptique. Cette thèse démontre que les neurones DA du mésencéphale ont un programme intrinsèque de développement de leur arborisation axonale qui est différent des neurones GABAergiques du striatum et glutamatergiques du cortex. Aussi, au travers de ces travaux, nous montrons clairement que des protéines aussi fondamentales que les Nrnx et les Nlgn ont un impact limité dans la formation, le maintien et le fonctionnement des synapses établies par les neurones DAergiques.

Mots clés : Neurones dopaminergiques, terminaisons non-synaptiques, transmission volumique, Neurexines, Neuroligines.

Abstract

Dopamine (DA) neurons from the substantia nigra compacta (SNc) and ventral tegmental area (VTA) are key players of the neuronal circuitry regulating movement initiation, reward and learning. Their functioning and survival are also perturbed in diseases such as schizophrenia, drug abuse and Parkinson's. The axonal connectivity of DA neurons is particularly intriguing due to the hyperdense nature of the axonal arbor of these neurons, containing a very large number of neurotransmitter release sites. Ultrastructural examination of the axon terminals established by DA neurons failed to identify a tight pre- and postsynaptic coupling at most of release sites, giving rise to the concept of non-synaptic terminals and “diffuse” or volume transmission. Furthermore, it is now well established that a subset of terminals established by DA terminals has the capacity to release other neurotransmitters such as glutamate and GABA.

A large literature implicates trans-synaptic proteins including neuroligins (Nrxns) and neuroligins (Nlgn) in the development of synaptic contacts. In the presynaptic compartment, these cell adhesion molecules interact with active zone proteins like RIM1/2, Bassoon, ELKS and Munc-13 involved in regulating exocytosis. In the postsynaptic compartment, these cell adhesion molecules closely interact with scaffolding proteins like PSD95 or Gephyrin.

In this thesis work, we first performed an exhaustive characterization of axon terminals established by DA neurons in primary co-culture system. We evaluated the proportion and the molecular structure of synaptic and non-synaptic terminals established by VTA and SNc DA neurons. In our first article, using an efficient *in vitro* system, we demonstrated that DA neurons develop a small proportion of synaptic terminals that is strikingly lower compared to glutamatergic and GABAergic neurons. Interestingly, we discovered that the active zone protein Bassoon is mainly expressed in DA terminals that are in contact or in close proximity to a target cell, and less

expressed in non-synaptic DA terminals. Finally, we found that overexpression of Nr1x1^{SS4} in DA neurons leads to an increase in the proportion of synapses whereas, overexpression of Nr1x1^{A+B} is able to trigger a DA presynaptic differentiation of DA neurons, suggesting a key role for these transsynaptic proteins in synapse formation by DA neurons.

In a second article, we studied more globally the role of Nr1x1 proteins in the formation of synapses by DA neurons. We took advantage of a recently introduced triple conditional Nr1x1 mouse line to selectively delete Nr1x1 in DA neurons (DAT::Nr1x1KO) and examine the impact of this gene inactivation on the connectivity of DA neurons. In this part we demonstrated that the density of excitatory and inhibitory synapses density established by DA neurons is not affected by the deletion of all Nr1x1, in comparison to the wild type group and does not impair the basic development and axonal connectivity of DA neurons at least, *in vitro*. In a second set of experiments, using patch-clamp recordings, we evaluated the function of excitatory and inhibitory synapses established by DA neurons in the striatum. GABA and glutamate synaptic currents evoked in the striatal medium spiny neurons by optogenetic stimulation of DA neuron axons revealed that glutamate release was unchanged, but identified a strong tendency for enhanced GABA co-release. Furthermore, using fast scan cyclic voltammetry, we found that the loss of Nr1x1 was associated with impaired DA transmission in the brain of adult mice, revealed by a reduced rate of DA reuptake after electrically-evoked DA release and with impaired amphetamine-induced locomotion.

With this thesis, we bring a new perspective on the capacity of DA neurons to develop an axonal arborization that is mainly non-synaptic. With this work, we provide strong evidence arguing that mesencephalic DA neurons are endowed with an intrinsic developmental program leading them to develop an axonal connectivity that is very different from striatal GABA neurons

or cortical glutamate neurons. Ours findings suggest that although Nrxns and Nlgnns are unlikely to be the main determinants of on the formation of synapses by DA neurons, that are likely to act as key regulators of DA and GABA signaling by these.

Key words : Dopaminergic neurons, non-synaptic terminals, volume transmission, Neurexins, Neuroligins.

Table des matières	
Résumé.....	4
Abstract.....	7
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	18
Remerciements.....	19
Publications.....	21
La preuve par l’image 2019.....	24
Préambule.....	25
CHAPITRE 1.....	27
Introduction générale.....	27
1. Chronologie d’une découverte.....	28
2. Le système dopaminergique.....	30
2.1. Neurochimie de la dopamine.....	30
2.2. Neuro-anatomie et nomenclature des voies dopaminergiques.....	32
2.3. Récepteurs et fonctions des voies dopaminergiques.....	35
2.3.1. Découverte et fonctions des récepteurs dopaminergiques.....	35
3. Physiopathologie du système dopaminergique.....	40
3.1. La maladie de Parkinson.....	40
3.1.1. « An Essay on the Shaking Palsy ».....	40
3.1.2. Symptômes et de la maladie de Parkinson.....	41
3.1.3. Étiologie de la maladie de Parkinson.....	43
3.2. Les antiparkinsoniens.....	45
3.2.1. De « l’atropa belladonna » à la simulation cérébrale profonde.....	45
3.3. La Schizophrénie.....	48
3.3.1. Description et diagnostique de la schizophrénie.....	48
3.4. Les antipsychotiques.....	49
3.4.1. Une découverte remplie de hasard.....	50
3.4.2. De 1960 à aujourd’hui : De l’hypothèse dopaminergique aux antipsychotiques de nouvelle génération.....	51
3.5. Drogues d’abus et dépendance.....	52
4. Caractéristiques des neurones dopaminergiques.....	53
4.1. Une arborisation axonale très dense.....	53
4.2. Un neurone multilingue.....	55
4.3. De la transmission synaptique à la transmission volumique.....	57
4.3.1. Terminaisons synaptiques : découverte et caractérisation.....	58
4.3.2. Synaptique ou non-synaptique ? Quand la connectivité des neurones à dopamine joue double jeu.....	63
4.3.3. Quel rôle pour cette double connectivité dopaminergique ?.....	68
5. Neurotransmission.....	71
5.1. Mécanisme d’exocytose.....	71
5.2. La zone active et ses protéines, emphase sur Munc-13, RIM et Bassoon.....	73
5.2.1. Protéine de la zone active Munc-13.....	74
5.2.2. Protéine de la zone active RIM.....	75
5.2.3. Protéine de la zone active Bassoon.....	78
5.3. Neurotransmission dopaminergique, que savons-nous ?.....	79

6.	Formation des synapses	81
6.1.	Établissement des boutons axonaux	81
6.2.	Protéines Trans-synaptiques	83
6.2.1.	Les neurexines : découverte et caractéristiques	84
6.2.2.	Neurexines et synaptogénèse, que savons-nous ?	86
6.2.3.	Les neuroligines, caractéristiques et rôle dans la synaptogénèse	89
6.2.4.	Synaptogénèse et Neuroligines, quel rôle pour chacune d'entre elles ?	92
6.2.5.	Neurexines et neuroligines, état des connaissances actuelles au niveau du système dopaminergique	94
6.2.6.	Autres protéines transynaptiques	95
	CHAPITRE 2	98
	Problématiques et objectifs de ces travaux de recherche	98
	CHAPITRE 3	101
	Résultats publiés	101
	Article original I	101
	Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals	101
	Article original II	126
	Neurexins Regulate GABA Co-release by Dopamine Neurons	127
	CHAPITRE 4	186
	Discussion et Perspectives futures	186
1.	Les terminaisons DAergiques sont majoritairement non-synaptiques	189
2.	Les terminaisons dopaminergiques synaptiques et non-synaptiques expriment différents ensembles de protéines	192
3.	La majorité des terminaisons dopaminergiques sont fonctionnelles	194
4.	Les protéines d'adhésions cellulaires Neurexines ont un rôle limité dans le développement de la connectivité des neurones dopaminergiques	197
5.	Renforcement de la co-transmission GABAergique par les neurones DAergiques après la délétion de l'ensemble des Nrnx	199
6.	La fonctionnalité du transporteur à la dopamine est altérée chez les souris $Nrxn^{-/-};DAT^{Cre}$	201
7.	Utilisation du modèle de synapses artificielles et rôle des Neuroligines dans la formation des synapses DAergiques	203
8.	Directions futures	205
8.1.	Quel rôle pour la protéine de zone active Bassoon dans la neurotransmission DAergique ?	206
8.2.	Quel rôle pour les autres protéines d'adhésion cellulaire dans la synaptogénèse DAergique ?	207
8.3.	Connectivité non-synaptique et vulnérabilité des neurones DAergiques dans le contexte de la maladie de Parkinson	207
	Références	209

Liste des sigles

AMPA : Alpha-Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozazol-4-Propionate

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ATV : Aire Tegmentaire Ventrale

CPF : Cortex Préfrontal

DA : Dopamine

DARPP-32 : Dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein 32 kDa

D1R : Récepteur Dopaminergique de type 1

D2R : Récepteur Dopaminergique de type 2

ELKS : Protéine riche en acides aminés E, L, K et S

EPSC : Excitatory Postsynaptic Current

GAD : Glutamic Acid Decarboxylase

Glu : Glutamate

GFP : Green Fluorescent Protein

GPe : Globus pallidum externe

GPI : Globus pallidum interne

IPSC : Inhibitory Postsynaptic Current

KO : Knock-out

LAR : Leukocyte common antigen-related

LRRTM : Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein

MEM : Minimum Essential Medium

MPP+ : 1-méthyl-4-phenylpyridium

Munc : Mammalian uncoordinated protein

NAc : Noyau Accumbens

NLGN : Neuroligine

NMDA : N-Methyl D-Aspartate

NRXN : Neurexine

NST : Noyau sous thalamique

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFA : Paraformaldéhyde

PSD95 : Postsynaptic Density 95

PTP : Protéine Tyrosine Phosphatase

qPCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative

RIM : Rab3-interacting molecule
RIM-BP : RIM-Binding protein
ROS : Espèces oxygénées réactives
RT : Reverse transcriptase
SD : Striatum Dorsal
shRNA : short hairpin Ribonucleic acid
Snc : Substance Noire compacte
SNC : Système Nerveux Central
SNARE : Soluble NSF Attachment Protein Receptor
Syt-1 : Synaptotagmine 1
SV : Striatum Ventral
TH : Tyrosine Hydroxylase
Trk : Récepteur à Tyrosine Kinase
VGAT : Transporteur Vésiculaire du GABA
VGluT1 : Transporteur Vésiculaire du Glutamate de type 1
VGluT2 : Transporteur Vésiculaire du Glutamate de type 2
VMAT2 : Transporteur Vésiculaire des Monoamines de type 2
Vs : Vésicule synaptique

Liste des figures

Introduction générale

Figure.1- Photos des Drs Arvid Carlsson, Nills Åke Hillarp et Bengt Falck.....	29
Figure.2- Utilisation de la technique d’histofluorescence.....	30
Figure.3- Voie de synthèse de la dopamine, de la noradrénaline et l’adrénaline.....	31
Figure.4- Principe de fonctionnement du DAT et du VMAT2.....	32
Figure.5- Origines et voies de projections du système dopaminergique chez l’homme.....	33
Figure.6- Nombre de neurones dopaminergiques dans la SNc et l’ATV en fonction des espèces...34	
Figure.7- Photos de John Kebabian et Paul Greengard.....	37
Figure.8- Voie moléculaire du récepteur à la dopamine de type D1.....	37
Figure.9- Représentation schématique des noyaux des ganglions de la base	39
Figure.10- Photos des Drs James Parkinson et Jean-Martin Charcot	41
Figure.11- Représentation schématique des noyaux des ganglions de la base dans le contexte de la maladie de Parkinson.....	43
Figure.12- Photos de Léopold Ordenstein et d’Oleh Hornykiewicz	47
Figure.13- Photos de Paul Charpentier, Henri Laborit et Simone Courvoisier	51
Figure.14- Représentation de l’arborisation axonale d’un neurone dopaminergique issu de la SNc après utilisation de la technique de la chambre claire.....	54
Figure.15- Immunomarquage dirigé contre la protéine VgluT2 au niveau de terminaisons axonales d’un neurone DA en culture.....	56
Figure.16- Immunomarquage dirigé contre la protéine GAD6 au niveau de terminaisons axonales d’un neurone DA en culture.....	57
Figure.17- Exemple de synapses de type 1, dites asymétriques	61
Figure.18- Exemple de synapses de type 2, dites symétriques	62
Figure.19- Photos des Drs Charles Sherrington, George Palade, Sanford Palay	63

Figure.20- Représentation schématique des différents modèles permettant de quantifier la proportion de terminaisons synaptiques (incidence synaptique)	66
Figure.21- Photo de Laurent Descarries et illustration d'une terminaison dopaminergique non-synaptique (A) et synaptique (B).....	68
Figure.22- Représentation schématique de terminaisons axonales synaptiques et non-synaptiques issues d'un neurone DAergique.....	70
Figure.23- Représentation schématique du processus d'exocytose d'un neurotransmetteur suite à un potentiel d'action	72
Figure.24- Représentation schématique des différentes protéines qui composent la zone active et leurs principales interactions.....	73
Figure.25- Structure de la protéine Munc-13 et de ses différents domaines d'interactions	75
Figure.26- Structure de la protéine RIM1/2 et de ses différents domaines d'interactions	76
Figure.27- Représentation schématique de l'interaction entre RIM et Munc-13 et de son importance dans la régulation de l'exocytose	77
Figure.28- Structure de la protéine Bassoon et de ses différents domaines d'interactions	78
Figure.29- Représentation schématique de la mise en place d'un bouton axonal.....	83
Figure.30- Représentation schématique de la structure moléculaire des Nr1n- α et - β	86
Figure.31- Représentation schématique de la structure des NLGNs avec les deux sites d'épissages retrouvés au niveau de la Nlgn-1.....	90
Figure.32- Expérience des neuroligines chimériques démontrant le rôle fondamental du domaine extracellulaire dans l'établissement des synapses.....	92
Figure.33- Structure moléculaire des protéines LAR-RPTPs et leur principales interactions.....	94

Article original I

Figure.1-Ultrastructural evidence for functional non-synaptic terminals established by DA neurons.....107

Figure.2-Dopaminergic neurons establish a majority of axon terminals that are not in contact with target cells.....109

Figure.3-Dopaminergic neurons establish a high density of axonal varicosities along their axonal domain.....111

Figure.4-The active zone protein bassoon is enriched in DA terminals that are in close proximity to dendrites.....112

Figure.5-The active zone protein RIM1/2 and bassoon are partially segregated in distinct sets of DA terminals.....113

Figure.6-DA neurons develop only a small proportion of excitatory and inhibitory synapses in contrast to cortical and striatal neurons and a small subset of terminals in close proximity to D2R clusters.....114

Figure.7-Mitochondria are similarly distributed into synaptic and non-synaptic DA neuron release.....116

Figure.8-Most synaptic and non-synaptic dopaminergic terminals are active.....117

Figure.9-Nlgn-1 induce presynaptic differentiation of DA neuron terminals.....119

Figure.10-Overexpression of Nr1x1 α^{SS4-} promotes the formation of both excitatory and inhibitory synapses by DA neurons.....120

Article original II

Figure.1-Synaptic and non-synaptic ultrastructure of DA terminals is unchanged after Nrnx123 triple knockout in dopamine neurons.....163

Figure.2-Proportion of synapses established by cultured DA neurons is unchanged after conditional deletion of all neurexins.....164

Figure.3-Normal axonal growth and complexity in DA neurons after conditional deletion of all neurexins.....166

Figure.4-DAT::NrnxnsKO mice exhibit impaired amphetamine-induced motor activity.....168

Figure.5-Normal dopamine release but slower reuptake in DAT::NrnxnsKO mice.....169

Figure.6-Neurexins regulate GABA release from dopaminergic neurons in the ventral striatum.....171

Figure.7-Neurexins removal does not influence the release of glutamate from the dopaminergic neurons in the ventral and dorsal striatum.....173

Figure.8-GABA uptake from cultured DA neurons is unchanged after conditional deletion of all neurexins.....174

Figure.9-Increased VMAT2 but decreased DAT expression in DA axon terminals lacking neurexins.....175

Liste des tableaux

Tableau 1 -Critères diagnostiques de la schizophrénie (DSM, 5 ^e version, 2013).....	49
Tableau 2 -Incidence synaptique des terminaisons axonales monoaminergiques et cholinergiques dans le SNC du rat, singe et chez l'homme	65
Tableau 3 -Incidence synaptique au niveau du striatum dorsal et ventral.....	67
Tableau 4 -Interactions des Nrxns avec leur partenaire postsynaptique en fonction de la présence ou non du site d'épissage #SS4.....	89

Remerciements

Voilà ! Six années plus tard, et après bon nombre de cultures cellulaires, d'immunomarquages, d'innombrables heures passées au microscope confocal, d'analyses de terminaisons dopaminergiques, de discussions scientifiques avec Marie-Josée et après cinq défis vélo pour Parkinson Québec, cette thèse est finalement complétée...et il était temps !

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse Louis-Éric Trudeau. Merci de m'avoir donné la chance de venir faire mon doctorat dans ton laboratoire, ici à Montréal ! Cette opportunité de faire mon doctorat au Québec a été pour moi une expérience extraordinaire et particulièrement enrichissante sur le plan personnel mais aussi professionnel ! Merci pour ta confiance, tes conseils, ta disponibilité, mais surtout merci pour la liberté scientifique durant toutes ces années !

Un immense merci à toi Marie-Josée, tu es sans aucun doute l'assistante de recherche la plus talentueuse de l'UdeM et dont la bonne marche du laboratoire repose en grande partie sur tes épaules ! L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse est dû à tout ton travail en amont. Merci pour tes conseils, pour les discussions, pour ta confiance, ton aide, ton soutien et ton investissement durant mon doctorat !

Merci aux collègues et amis, Rafael Varaschin dont les soirées jeux avec William et Carlos sont sans équivalent ! Merci à Aurore Voisin, Conciglia Pacelli, Willemieke Kouwenhoven pour votre bonne humeur, les soirées labo et pour vos bons conseils scientifiques ! Merci aux futurs doctorants et membres actuels du labo qui ont travaillé avec moi, Benoit Delignat-Lavaud, en quasi-fusion avec son setup de voltammétrie et Samuel Burke-Nanni, le philosophe scientifique du laboratoire qui aimerait lui aussi finir son doctorat cette année...mais ce n'est pas encore

gagné... pas du tout même ☺ ! Merci aux autres membres du labo, du passé et du présent, Guillaume (Fortin), Nicolas, Giselle, Sarah, Anna-Maya, Sriparna, Ilyes, Raphaëlle et Jana (qui mange du chocolat à tous les repas !). Merci aussi aux étudiants d'été qui ont travaillé avec moi sur ce projet, Charlotte et Anne-Sophie.

Bonne continuation à toi Florence ! Avec beaucoup de succès pour la suite.

Enfin, un merci tout particulier pour deux amis : Isabella (Isa) avec qui j'ai eu le plaisir de partager tellement de choses depuis mon échange étudiant en 2013-2014 ! Merci à toi Isa ! et William, avec qui l'UdeM n'a plus de secret pour nous ! L'Urbex (ici et aux US), le petit train du nord en pleine nuit et le Manicouagan resteront dans mes meilleurs souvenirs ! Merci mon ami, merci pour tout !

Et comme je dis depuis toujours, le plus important dans la vie ce sont les amis ! Le reste importe peu !

Publications

Cette thèse a donné lieu à plusieurs publications en lien avec mon doctorat

- Projet principal de doctorat sur la connectivité des neurones à dopamine

Ducrot C, Bourque M-J, Delmas V.L. C, 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 and Trudeau L-E. **Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals**. FASEB journal 2021; Aug;35(8):e21791

Ducrot C, De Carvalho G, Delignat-Lavaud B, Delmas C, Giguère N, Mukerjee S, Burke Nanni S, Bourque M-J, Parent M, Chen L and Trudeau L-E. **Neurexins regulate GABA corelease by dopamine neurons**. (En préparation, 2021)

Ducrot C and Trudeau L-E. **The challenging diversity of neurons in the ventral tegmental area: A commentary of Miranda-Barrientos, J. et al.**, Eur J Neurosci 2021. Eur J Neurosci. 2021 May 4

- Collaborations sur différents projets en lien avec le système dopaminergique

Tanguay W, **Ducrot C**, Giguère N, Bourque M-J and Trudeau L-E. **Neonatal 6-OHDA lesion of the SNC induces striatal compensatory sprouting from surviving SNc dopaminergic neurons without VTA contribution**. European Journal of Neuroscience; DOI:10.1111/ejn.15437

Delignat-Lavaud B, **Ducrot C**, Kouwenhoven W, Feller N and Trudeau L-E. **Activity-dependent somatodendritic dopamine release requires synaptotagmin 4 and 7**. (Sous presse, 2021) - Disponible sur BioRxiv.

Matheoud D, Cannon T, Voisin A, Penttinen A-M, Ramet L, Fahmy A, **Ducrot C**, Laplante A, Bourque M-J, Zhu L, Cayrol R, Le Campion A, McBride H, Gruenheid S, Trudeau L-E and Desjardins M. **Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in Pink1^{-/-} mice**. Nature (2019) Jul;571(7766):565-569

Fortin GM, **Ducrot C**, Giguère N, Kouwenhoven WM, Bourque M-J, Pacelli C, Varaschin RK, Brill M, Singh S, Wiseman PW and Trudeau L-E. **Segregation of dopamine and glutamate release sites in dopamine neuron axons: regulation by striatal target cells**. FASEB J. (2019) Jan;33(1):400-417

Zhu H, Lussier F, **Ducrot C**, Bourque M-J, Spatz J-P, Cui W, Yu L, Peng W, Trudeau L-E, Bazuin CG and Masson J-F. **Block Copolymer Brush Layer-Templated Gold Nanoparticles on Nanofibers for Surface-Enhanced Raman Scattering Optophysiology**. ACS Appl Mater Interfaces. (2019) Jan 30;11(4):4373-4384

Varaschin RK, Osterstock G, **Ducrot C**, Leino S, Bourque M-J, Prado MAM, Prado VF, Salminen O, Rannanpää Née Nuutinen S and Trudeau L-E. **Histamine H3 Receptors Decrease Dopamine Release in the Ventral Striatum by Reducing the Activity of Striatal Cholinergic Interneurons**. Neuroscience (2018) Apr 15; 376:188-203

Hryhorczuk C, Sheng Z, Décarie-Spain L, Giguère N, **Ducrot C**, Trudeau L-E, Routh VH, Alquier T and Fulton S. **Oleic Acid in the Ventral Tegmental Area Inhibits Feeding, Food Reward and Dopamine Tone**. Neuropsychopharmacology (2018) Feb ;43(3):607-616

Lussier F, Brulé T, Bourque M-J, **Ducrot C**, Trudeau L-E and Masson J-F. **Dynamic SERS nanosensor for neurotransmitter sensing near neurons**. Faraday Discuss. (2017) Dec 4;205-387-407

Thibault D, Giguère N, Loustalot F, Bourque M-J, **Ducrot C**, El Mestikawy S and Trudeau L-E. **Homeostatic regulation of excitatory synapses on striatal medium spiny neurons expressing the D2 dopamine receptor**. Brain Struct Funct. (2016) May ;221(4):2093-107

À mon grand-père, René Ducrot

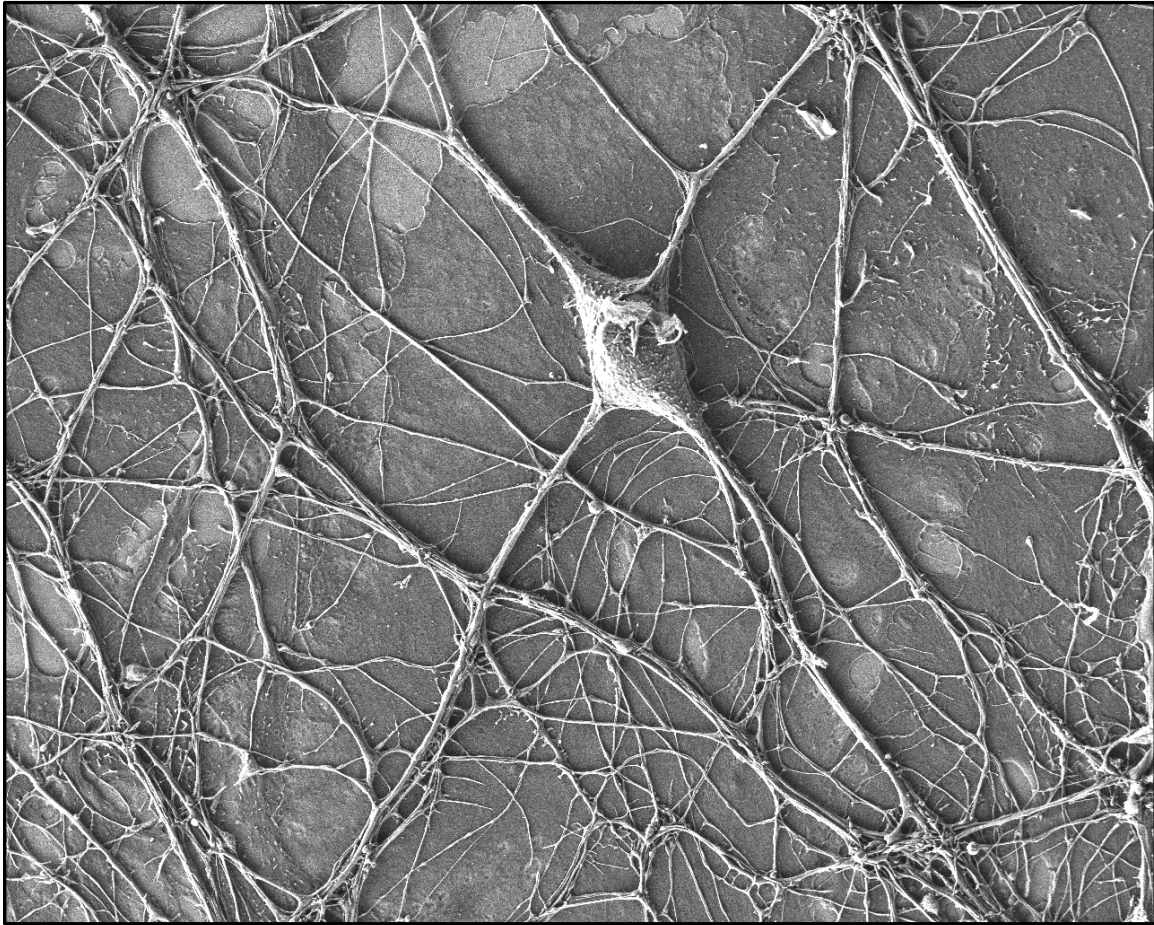
Un résumé du doctorat en quelques lignes :

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne
sait pourquoi. Si la pratique et la théorie sont réunies, rien ne
fonctionne et on ne sait pas pourquoi. »*

Albert Einstein

La preuve par l'image 2019

Concours photo de l'Association Canadienne-Française pour l'Avancement des Sciences



Microscopie électronique à balayage - X950 - Ducrot C., 2019

Photographie exposée à « L'espace pour la vie » au planétarium de Montréal

L'élément moteur

Issu d'une région du cerveau appelée « substance noire compacte », ce neurone dopaminergique intrigue et fascine. Lui et ses semblables, avec leurs multiples ramifications, jouent un rôle clé dans la coordination des mouvements. Mais ces neurones sont malheureusement aussi connus pour leur grande vulnérabilité, observée notamment dans la maladie de Parkinson. On tente de percer le mystère de cette fragilité au moyen de leur culture *in vitro* combinée à la microscopie électronique, pour en distinguer jusqu'aux terminaisons synaptiques (invisibles dans cette vue d'ensemble).

Préambule

Intrigant mais fascinant, le cerveau aiguise notre curiosité depuis des millénaires ! Bien avant notre ère, environ 6000 ans avant Jésus-Christ, l'homme réalisait déjà des trépanations au niveau de la boîte crânienne au moyen d'un silex. Dans quel but ? Pour soigner des maux de tête ou alors par simple curiosité ? Nul ne le sait, mais le cerveau semblait déjà intéresser l'homme.

Depuis le début de notre ère contemporaine cette curiosité pour le système nerveux n'a cessé d'exister donnant lieu à une succession de découvertes fondamentales. De la description de la maladie de Parkinson par James Parkinson en 1817, à la première visualisation d'un neurone par Santiago Ramón y Cajal en 1880 ou en passant par la synthèse de la chlorpromazine par Paul Charpentier en 1951, ces découvertes ont permis de façonner le paysage des neurosciences. Au cours du 20^e siècle, l'une des découvertes majeures a été sans aucun doute celle de la dopamine avec les travaux inédits d'Arvid Carlsson en 1958 démontrant que cette substance jouant le rôle de neurotransmetteur était bel et bien présente dans le cerveau de mammifère. Par la suite, grâce au développement notable de la pharmacologie associée à l'essor de la biochimie, Paul Greengard en 1970 a démontré que la dopamine avait la capacité d'agir sur des récepteurs bien précis, les récepteurs dopaminergiques. Cette période faste du milieu du 20^e siècle aboutissant à des avancées remarquables dans notre compréhension du système dopaminergique s'est par la suite poursuivie jusqu'à l'émergence du concept de transmission volumique. En effet, les travaux de Laurent Descarries venaient de mettre en évidence que les terminaisons axonales dopaminergiques étaient majoritairement de type non-synaptique donnant lieu au principe de transmission diffuse. Ce postulat, décrié par le passé mais accepté aujourd'hui, venait remettre en cause l'ordre établi comme par lequel la communication nerveuse était uniquement de type synaptique, où une terminaison axonale était forcément en apposition avec un domaine postsynaptique.

Bien que reconnue par la communauté scientifique de nos jours, très peu d'études se sont finalement intéressées à cette capacité intrinsèque des neurones dopaminergiques à développer cette double connectivité. Au travers de cette thèse, nous avons voulu apporter un regard nouveau sur les découvertes pionnières réalisées dans les années 1970.

CHAPITRE 1

Introduction générale

1. Chronologie d'une découverte

Tout commence en 1910, lorsque la dopamine (DA) fut synthétisée pour la première fois par deux scientifiques Anglais, Georges Barger et James Ewens, au sein du laboratoire *Wellcome* à Londres. Cependant, il faut attendre 1958 pour que la présence de DA dans le cerveau de mammifère soit confirmée.

Au début des années 1950, de nombreuses recherches sur le traitement de la schizophrénie amènent les chercheurs à utiliser la réserpine, un puissant tranquillisant issu de la racine de « *Rauwolfia serpentina* », et qui se révèle être une molécule efficace pour traiter les psychoses. C'est alors qu'Arvid Carlsson (**Figure 1**), professeur de pharmacologie en Suède, démontre que la sédation induite par la réserpine chez le lapin est entièrement réversible après administration de L-DOPA (DA non-décarboxylée). Il pense alors que la DA et la L-DOPA pourraient être impliquées dans les effets de la réserpine. De ce fait, il développe une technique de dosage permettant de montrer que la DA est bien présente dans le cerveau des mammifères et est capable de s'accumuler dans certaines structures cérébrales telle que le striatum. Cette technique mise au point par Arvid Carlsson lui-même consistait à oxyder les molécules de DA avec de la iode, ce qui avait pour but de générer un dérivé indole rouge légèrement fluorescent (Carlsson et al., 1958; Bertler and Rosengren, 1959; Carlsson, 1959; Sano et al., 1959; Carlsson et al., 1962). Ces travaux ont ainsi permis de donner à la DA le statut de neurotransmetteur à part entière puisqu'auparavant, la DA était considérée comme étant uniquement un précurseur de la noradrénaline (NAD).

Malgré tout, bien que majeurs, ces travaux ne permettaient toujours pas de déterminer l'origine de la libération ni même la distribution des noyaux dopaminergiques (DAergique) au sein du système nerveux central (SNC). Il a alors fallu attendre 1965 pour avoir une toute première caractérisation du système DAergique grâce à deux scientifiques suédois, les Drs Hillarp et Falck

(**Figure 1**). Ces derniers ont mis au point la technique d'histofluorescence permettant de visualiser les noyaux DAergiques et d'en cartographier la distribution. Cette méthode originale et révolutionnaire pour le domaine des neurosciences à cette époque consistait à exposer brièvement un morceau de tissu cérébral à des vapeurs de formaldéhyde dans le but de convertir les molécules de DA en iso-quinone. Cette DA « convertie » émettait alors une fluorescence jaune-verte stable et bien visible à l'œil nu [**Figure 2**; (Falck et al., 1982; Kotake et al., 1982)]. Grâce à cela, les Drs Hillarp et Falck ont réalisé une cartographie préliminaire de certains noyaux monoaminergiques, incluant les structures DAergiques, dont la nomenclature est encore utilisée de nos jours. Quant aux travaux du Dr Carlsson, ces derniers lui ont valu le prix Nobel de Médecine en l'an 2000.

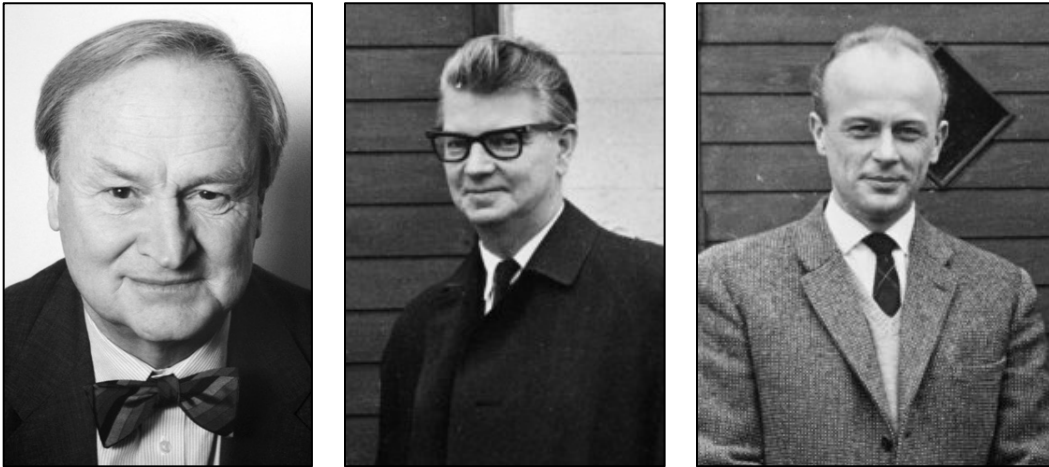


Figure 1 - Photos des Drs Arvid Carlsson, Nils Åke Hillarp et Bengt Falck (Archives de la fondation Nobel et de falck-hillarp.se)

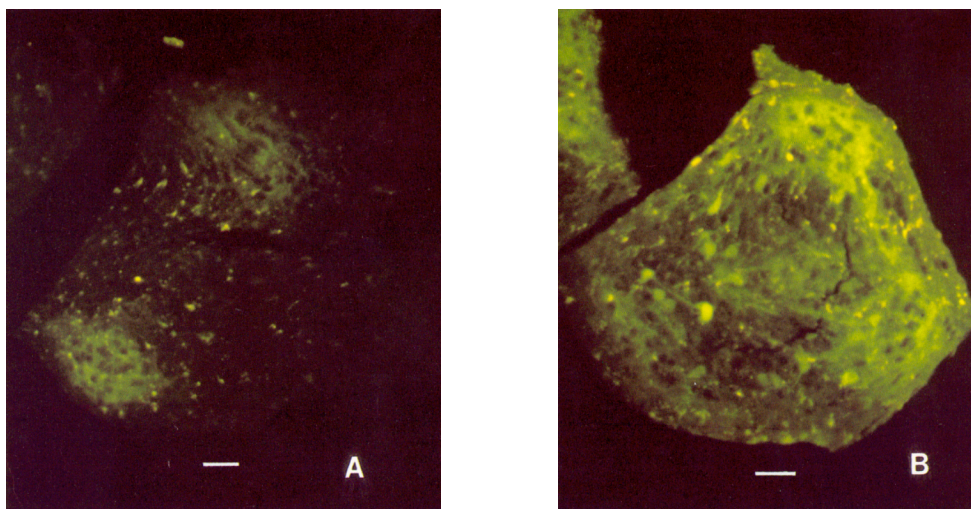


Figure 2 - Utilisation de la technique d'histofluorescence mise au point par B. Falck et N. Hillarp. Procédure effectuée sur des tranches du tegmentum mésencéphalique rostral (RMTg), mises en culture avec du striatum et où la fluorescence jaune-verte issue de la DA « convertie » est bien visible après 14 jours (A) ou 21 jours *ex vivo* (B). Échelle = 30µm (Kotake et al., 1982).

2. Le système dopaminergique

2.1. Neurochimie de la dopamine

Le SNC est doué d'une capacité de communication faisant appel à des médiateurs chimiques que sont les neurotransmetteurs. Ces derniers sont classifiés en différents groupes dépendamment de leur voie de synthèse. La DA fait partie du groupe des catécholamines, sous-groupe des monoamines, dans lequel on retrouve également la NAD et l'adrénaline (AD). Ces trois neurotransmetteurs ont tous pour origine l'acide aminé tyrosine. C'est à partir de cet acide aminé non-essentiel que la DA est synthétisée. Dans un premier temps, la tyrosine est transformée en 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) grâce à l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) (Nagatsu et al., 1964). Puis via l'enzyme L-DOPA décarboxylase (ou décarboxylase des acides aminés

aromatiques), la L-DOPA est décarboxylée pour donner la molécule de DA. Au sein des neurones noradrénergiques et adrénérgiques, la DA y est également synthétisée, mais les réactions enzymatiques se poursuivent en cascade. On retrouve d'une part l'enzyme dopamine β -hydroxylase, qui permet d'hydroxyler la DA et donner la NAD. Quant à l'AD, elle est synthétisée à partir de la NAD avec l'aide de l'enzyme phenyléthanolamine N-méthyl transférase (**Figure 3**).

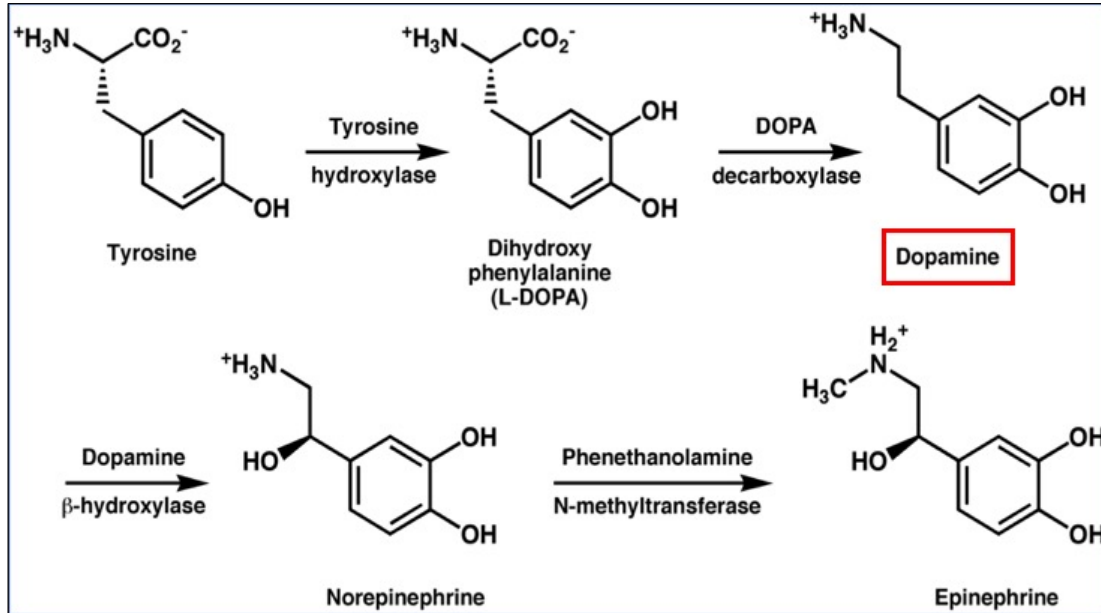


Figure 3 - Voie de synthèse de la dopamine, de la noradrénaline et l'adrénaline.

Une fois la DA synthétisée dans la terminaison axonale, elle y est emmagasinée dans les vésicules synaptiques via le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2). L'emmagasinage de la DA, via le VMAT2, se fait grâce à un échange de deux protons H^+ pour une molécule de DA. La forte teneur en protons H^+ au sein de la vésicule synaptique est due à la pompe ATPase localisée sur sa membrane et dont l'activité du VMAT2 est entièrement dépendante (**Figure 4**). Par la suite, une fois les vésicules chargées en DA, elles sont envoyées à la membrane plasmique où le phénomène d'exocytose se produit, habituellement suite à une entrée de calcium (voir partie Mécanisme d'exocytose). La disponibilité des catécholamines est aussi influencée par leur

catabolisme. Du côté de leur dégradation, les catécholamines sont catabolisées par deux enzymes spécifiques : (1) la monoamine oxydases (MAO), localisée au niveau des mitochondries et (2) la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) localisée au niveau de la terminaison axonale, de la fente synaptique, ainsi qu'au niveau du cytoplasme des cellules gliales environnantes. La DA libérée dans le milieu extracellulaire est par ailleurs majoritairement recaptée par le transporteur membranaire à la DA (DAT), localisé sur la membrane plasmique des terminaisons dopaminergiques (**Figure 4**). Cette recapture donne lieu à sa dégradation par la MAO en 3,4-Dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) et par la COMT en 3-Methoxytyramine (3-MT).

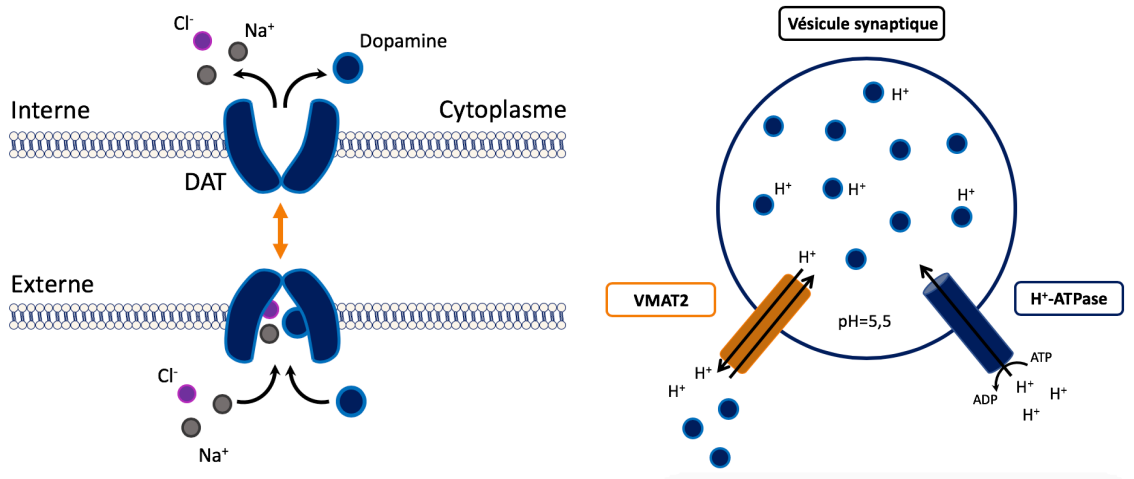


Figure 4 - Principe de fonctionnement du transporteur à la dopamine (DAT) et du transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2).

2.2. Neuro-anatomie et nomenclature des voies dopaminergiques

Tel que décrit précédemment, la toute première caractérisation du système DAergique remonte au milieu des années 1960 avec les travaux des Drs Hillarp et Falck (voir partie 1). Ces travaux ont par la suite été complété avec ceux de deux autres chercheurs suédois, les Drs

Dahlstroem et Fuxe, qui ont permis de cartographier un ensemble plus complet de 12 noyaux monoaminergiques, nommés de A1 à A12, incluant une partie des noyaux DAergique (Dahlstroem and Fuxe, 1964). Puis au milieu des années 80, huit autres noyaux monoaminergiques ont été ajoutés dans cette nomenclature avec les travaux du Dr Hökfelt et ont été nommés de A13 à A17 et C1 à C3 (Hökfelt et al., 1984).

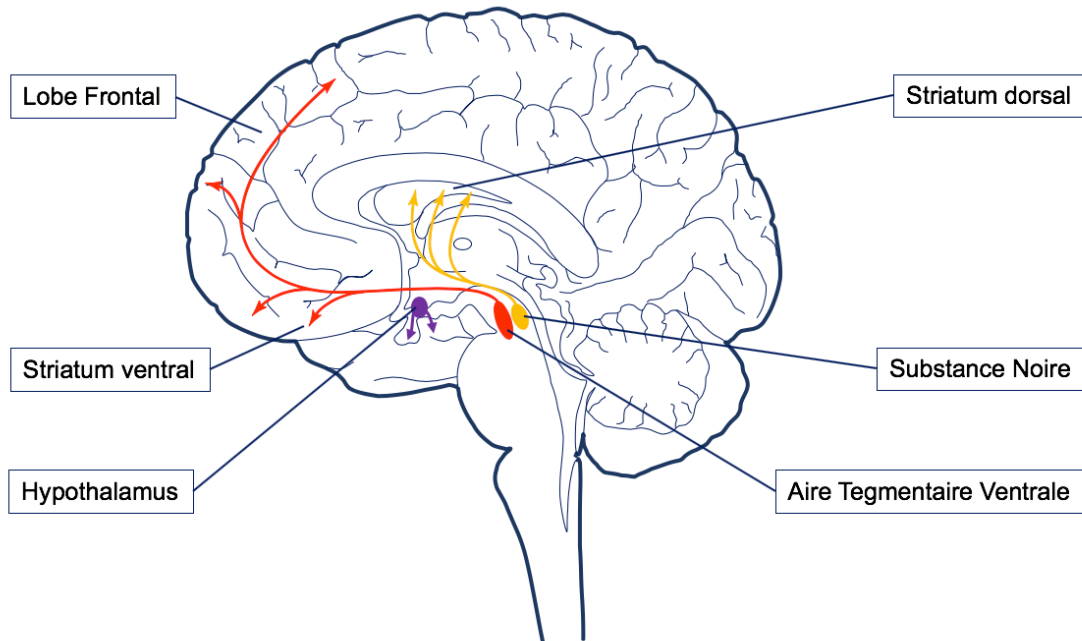


Figure 5 - Origines et voies de projections principales du système dopaminergique chez l'homme.

Si on s'intéresse spécifiquement au système DAergique, ce dernier se compose de huit structures anatomiques, nommées par la nomenclature de Dahlstrom et Fuxe comme étant les noyaux A8 à A16 et dont les deux plus importantes, la substance noire compacte (SNc) et de l'aire tegmentaire ventrale (ATV), sont situées au niveau du mésencéphale ventral. Ces deux régions anatomiques regroupent la grande majorité des neurones DAergiques et sont classifiées comme étant les noyaux A9 et A10 respectivement. Il s'agit de neurones dits de projection, qui dans le cas de la SNc, envoient leurs axones vers le striatum dorsal pour former la voie nigro-striée, alors que ceux de l'ATV, projettent majoritairement vers le striatum ventral et le cortex préfrontal (PFC)

pour former les voies mésolimbiques et mésocorticales, respectivement (**Figure 5**). Au fil de l'évolution des espèces, ces deux structures se sont relativement bien conservées mais le nombre de neurones DAergiques varie grandement (Hardman et al., 2002; Nair-Roberts et al., 2008). Chez l'homme, la population de neurones DAergiques issu de la SNc est d'environ 60 000 neurones alors que pour l'ATV elle se situe entre 200 000 et 420 000 neurones. Chez le rongeur et tout particulièrement chez la souris, on estime que la SNc est composée d'environ 8 000 à 12 000 neurones DAergiques tout comme pour l'ATV (**Figure 6**). Ces deux groupes de neurones DAergiques feront l'objet de toute notre attention dans cette thèse de doctorat, et tout particulièrement leurs terminaisons axonales.

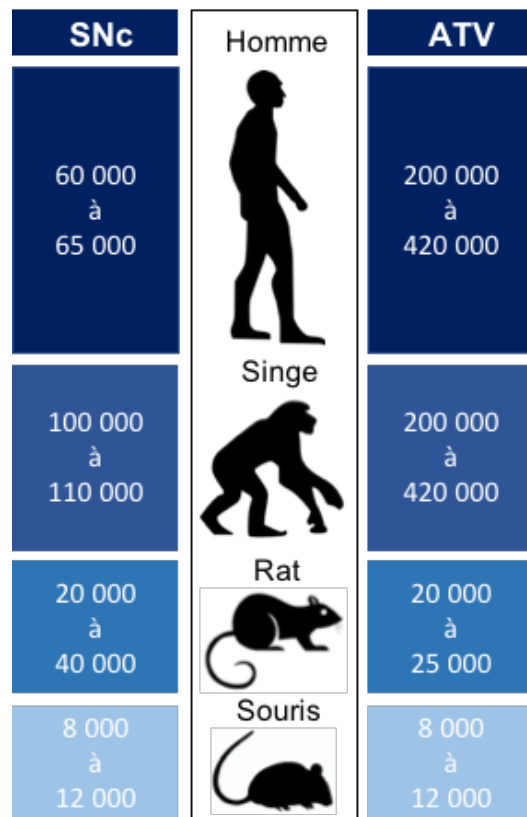


Figure 6 - Nombre de neurones dopaminergiques dans la SNc et l'ATV en fonction des espèces [adapté de (Hardman et al., 2002; Nair-Roberts et al., 2008)].

Quant aux autres structures qui sont pourvues de neurones DAergiques, très brièvement, il s'agit de l'aire rétrobulbaire (A8), de l'hypothalamus (A12), du thalamus (tractus mamillothalamique; A13), du noyau pérventriculaire préoptique (A14 et A15), du bulbe olfactif (A16) et finalement de la rétine (A17). Il y'a également des neurones DA dans le système nerveux entérique, localisé dans les intestins.

2.3. Récepteurs et fonctions des voies dopaminergiques

2.3.1. Découverte et fonctions des récepteurs dopaminergiques

Les travaux inédits d'Arvid Carlsson en 1958, démontrant que la DA était bien un neurotransmetteur à part entière, ont par la suite été succédés par ceux de Paul Greengard, qui en 1970, a découvert que la DA pouvait agir sur des récepteurs membranaires. Dans cette partie, nous décrivons comment la DA à la possibilité de moduler certaines fonctions physiologiques puis nous reviendrons brièvement sur la découverte des récepteurs DAergiques.

Le système DAergique, via ses projections, intervient dans plusieurs grandes fonctions physiologiques qui sont maintenant bien documentées. En effet, les neurones DAergiques de l'ATV sont impliqués dans les processus de motivation, de plaisirs (alimentaire et sexuel), de récompense et d'apprentissage, alors que les neurones DAergiques de la SNc sont majoritairement impliqués dans la régulation de circuits qui contrôlent des mouvements volontaires (Schultz, 1998, 2007). La spécificité de l'ensemble de ces fonctions est en grande partie due à l'activation par la DA de récepteurs membranaires. La découverte puis la caractérisation des récepteurs DAergiques remonte au début des années 1970 avec les travaux remarquables de Paul Greengard (**Figure 7**). Dans un premier temps, Paul Greengard démontra qu'une infusion de DA au niveau du striatum de rat était

capable d'induire une augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). A cette époque, les recherches en neuropsychiatrie avaient déjà démontré que l'utilisation d'antipsychotiques modulait la transmission DAergiques mais sans savoir comment. Ainsi, Paul Greengard pris avantage de l'utilisation de la chlorpromazine et de l'halopéridol, deux antipsychotiques typiques, et observa qu'une infusion de ces molécules dans le noyau caudé avait comme effet de diminuer les niveaux d'AMPc (Kebabian et al., 1972). Avec ces observations, Paul Greengard venait de comprendre que la DA pouvait agir sur des « récepteurs » propres au système DAergique mais pour lesquels un lien avec l'AMPc n'était pas encore établi. De ce fait, en s'inspirant de travaux précédents montrant que l'AMPc pouvait médier l'action de certaines hormones dans le foie via une protéine kinase (maintenant appelée PKA), Paul Greengard décida de voir si l'AMPc avait également la capacité d'agir comme second messenger au niveau du SNC. En utilisant la technique de Brown, technique dite de radio-ligand avec de l'AMPc tritiée, Paul Greengard démontra que l'AMPc tritiée avait la capacité de se lier à un d'homogénat de protéines issu du cerveau de bovin. Il observa que plus la quantité d'homogénat protéique était grande, plus la liaison de l'AMPc tritiée était forte (Gill and Garren, 1969; Kuo and Greengard, 1969; Miyamoto et al., 1969; Brown et al., 1971). Ces travaux ont ainsi suggéré que la DA agissait sur des récepteurs spécifiques qui, via un second messenger, pouvaient moduler des réponses physiologiques. Les récepteurs DAergiques furent par la suite identifiés par clonage au tout début des années 1990 (Monsma et al., 1990).

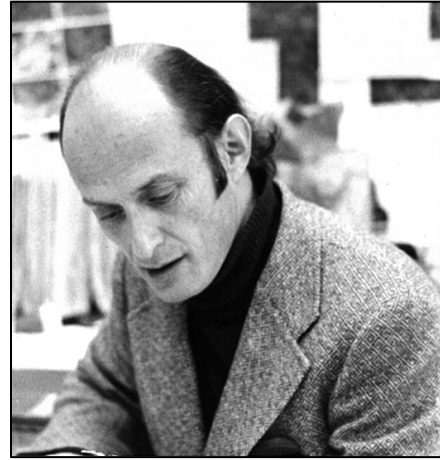


Figure 7 - Photo de John Keibabian et Paul Greengard dans les années 1970 durant leur travaux pionniers sur l'AMPC (Snyder, 2011).

Les récepteurs DAergiques sont divisés en deux grandes familles, celle des récepteurs de type D1 et celle des récepteurs de type D2. Dans les deux cas, il s'agit de récepteurs à 7 passages transmembranaires et couplés aux protéines G qui selon le type, activatrice ou inhibitrice, donnera une spécificité d'action. La famille des récepteurs de type D1 regroupe les récepteurs D1 et D5 et possède un couplage à une protéine G activatrice [Gs; **Figure 8**; (Keibabian and Calne, 1979)].

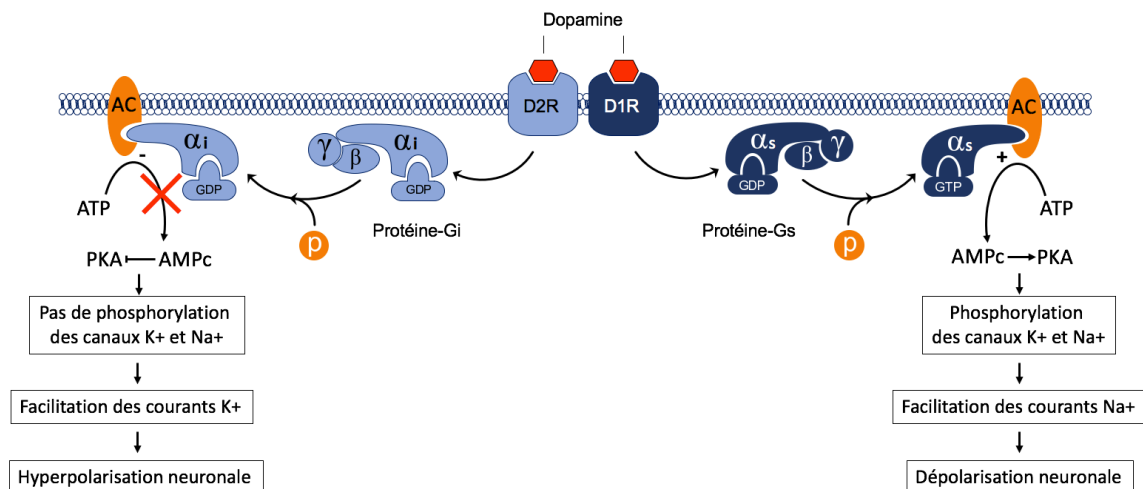


Figure 8 - Voies de signalisations des récepteurs dopaminergiques de type D1 et de type D2. La résultante sera l'activation ou l'inhibition de l'activité neuronale.

Ce couplage positif à une protéine Gs a pour conséquence d'activer l'adénylate cyclase (AC), ce qui favorisera alors l'augmentation du taux d'AMPc et qui activera à son tour la protéine kinase A (PKA). Un fois activée, la PKA va alors phosphoryler de nombreuses protéines intracellulaires et membranaires, incluant certains canaux sodiques ou potassiques, ce qui facilitera la dépolarisation neuronale (**Figure 8**). Quant à la famille des récepteurs de type D2, elle regroupe les récepteurs D2, D3 et D4 et est dotée d'un couplage à une protéine G inhibitrice [Gi; (Beaulieu and Gainetdinov, 2011)]. Ce couplage a pour conséquence d'inactiver l'AC aboutissant à une baisse des niveaux d'AMPc et à une inactivation de la PKA. Globalement les effets des D2R favoriseront une baisse de l'excitabilité neuronale, en partie par l'activation de canaux potassiques (**Figure 8**).

2.3.2. Expression et localisation des récepteurs dopaminergiques

Les neurones dopaminergiques provenant de l'ATV et de la SNc, innervent principalement et massivement le striatum. Cette structure neuronale appelée aussi néostriatum est composée à 95% d'interneurones GABAergiques, défini comme étant des neurones épineux de taille moyenne ou MSNs (pour Medium Spiny Neurons en anglais). Ces neurones sont également considérés comme étant la porte d'entrée de la circuiterie des ganglions de la base et expriment en grande quantité les récepteurs DAergiques de type D1 et D2 (Aizman et al., 2000). L'expression différentielle des récepteurs D1 ou D2 par les MSNs conduit à deux voies au niveau des ganglions de la base (GB), l'une directe via les MSNs exprimant les récepteurs D1 et l'une indirecte via les MSNs exprimant les récepteurs D2. Les deux voies jouent des rôles complémentaires dans la sélection de programmes moteurs du mouvement volontaire (**Figure 9**).

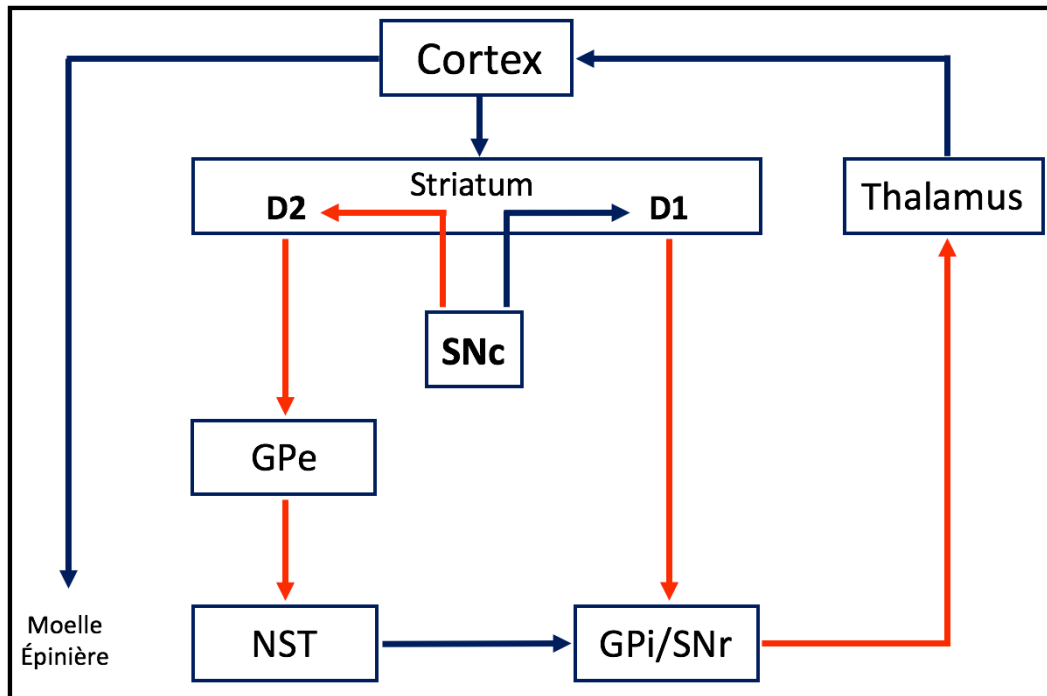


Figure 9- Représentation schématique des noyaux des ganglions de la base. Illustration des voies directes et indirectes médiées par les récepteurs D1 et D2 en condition physiologique. Rouge : projections GABAergiques; Bleu : projections glutamatergiques. GPe : Globus Pallidus externe; NST : noyau sous-thalamique; GPi : Globus Pallidus interne; SNr : Substance Noire réticulée.

Enfin, une dernière spécificité concerne leur localisation. Plusieurs études associant la microscopie électronique à transmission (MET) à l'immunomarquage ont révélé que la grande majorité de ces récepteurs était exprimée en dehors des zones synaptiques dans les neurones du striatum. En effet, un marquage aux billes d'or des récepteurs D1 ou D2 associé à un marquage TH, révèle une expression au niveau des épines et l'arbre dendritique des MSNs mais sans aucune apposition avec une terminaison TH-positive (Sesack et al., 1994; Agnati et al., 1995; Caille et al., 1996; Uchigashima et al., 2016). Cette localisation dite « extrasynaptique » va de pair avec la façon dont la DA est libérée, puisque presque exclusivement, les neurones DAergiques agissent par transmission volumique (voir section 4.3.).

3. Physiopathologie du système dopaminergique

Le système dopaminergique est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la motivation, la récompense ou encore dans la régulation des mouvements volontaires. Une atteinte du système dopaminergique conduit donc sans surprise à plusieurs pathologies que nous décrirons dans ce chapitre. Une attention particulière sera portée à la maladie de Parkinson et à la schizophrénie, les deux maladies associées au système dopaminergique dont l'incidence est la plus élevée.

3.1. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative invalidante qui se caractérise par une perte progressive des neurones DAergiques majoritairement issus de la SNc. Les neurones DAergiques de la VTA sont proportionnellement moins touchés alors que ceux du bulbe olfactif et de l'hypothalamus sont plutôt épargnés. Bien que les causes soient encore mal connues plusieurs hypothèses sont actuellement étudiées.

3.1.1. « An Essay on the Shaking Palsy »

La maladie de Parkinson a été découverte par James Parkinson en 1817, médecin résidant à Londres. Il a été le premier à décrire avec une grande précision les symptômes de la maladie observés chez ses propres malades. On retrouve cette première caractérisation dans un mémoire intitulé « *An Essay on the Shaking Palsy* » ou littéralement en français « *Un essai sur la paralysie agitante* » (**Figure 10**). Par la suite en 1861, Jean-Martin Charcot, neurologue et neuroanatomiste

français, donne une description plus fine et plus précise des symptômes associés à la maladie de Parkinson, dont l'origine n'est toujours pas connue. Il faut alors attendre les travaux de deux autres neuroanatomistes, Paul Oscar Blocq et Georges Marinesco en 1893, qui évoquent pour la première fois la possibilité que la SN soit associée à la maladie de Parkinson. En effet, suite à une autopsie d'un patient tuberculeux présentant des tremblements unilatéraux de type parkinsonien, ils ont découvert que la SN controlatérale aux symptômes était très fortement altérée suite à une atteinte tumorale (Blocq et Marinesco, 1893). Les deux neuroanatomistes conclurent alors que les tremblements étaient associés à la perte de la SN. Cette remarquable observation fût par la suite confirmée avec les travaux inédits de Constantin Trétiakoff en 1919 qui suite à des analyses post-mortem sur des patients parkinsonien confirma le lien entre la maladie de Parkinson et la SN (Parent and Parent, 2010).

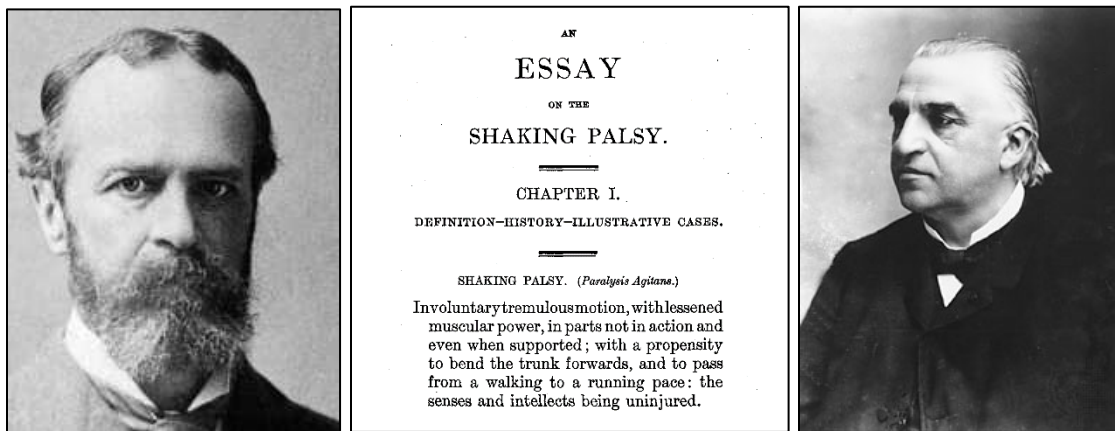


Figure 10 - Les Drs James Parkinson, Jean-Martin Charcot et le mémoire intitulé « *An Essay on the Shaking Palsy* » rédigé par James Parkinson (Encyclopaedia Britannica).

3.1.2. Symptômes et de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson se caractérise par un ensemble de symptômes caractéristiques et son diagnostic doit être établi après avoir éliminé la possibilité d'une atteinte du cervelet, d'une

paralysie supranucléaire ou encore d'une démence fronto-temporale. Les symptômes associés à la maladie de Parkinson sont les suivants :

1. Un tremblement de repos, qui disparaît après l'initiation d'un mouvement volontaire mais également pendant les phases de sommeil.
2. Une rigidité musculaire ou akynésie, qui est due à une augmentation anormale du tonus musculaire. Elle se manifeste par une atteinte des mouvements dits « automatiques » telle que la marche.
3. De l'akinésie, qui se définit comme étant une difficulté importante à initier un mouvement volontaire et dont l'exécution sera plus lente (bradykinésie)
4. Une instabilité posturale, qui généralement se manifeste par des troubles de l'équilibre. Les patients ont tendance à chuter fréquemment.

La perte des neurones DA dans la SNc induit un déséquilibre du circuit des ganglions de la base qui est essentiel pour la fluidité du contrôle du mouvement volontaire. On peut expliquer par le schéma suivant la résultante de la perte des neurones DA de la SNc :

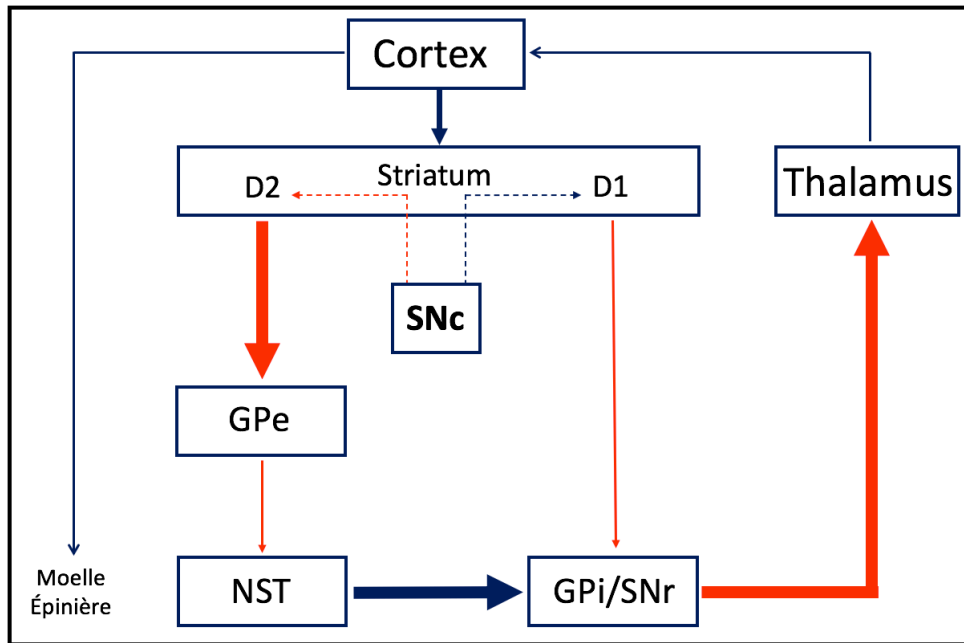


Figure 11 - Représentation schématique des ganglions de la base dans le contexte de la maladie de Parkinson. Rouge : projections GABAergiques; Bleu : projections Glutamatergiques. GPe : Globus Pallidum externe; NST : noyau sous-thalamique; GPi : Globus Pallidus interne; SNr : Substance Noire réticulée.

3.1.3. Étiologie de la maladie de Parkinson

Il existe actuellement plusieurs hypothèses tentant d'expliquer la cause de la perte de neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson. Dans cette partie nous décrivons brièvement les plus importantes, qui prennent en compte de facteurs environnementaux génétiques, et physiologiques.

La première hypothèse est environnementale. Plusieurs études ont clairement identifié un lien entre la maladie de Parkinson et une exposition aux pesticides, herbicides ou engrais chimiques. Les personnes ayant un travail associé au domaine agricole sont surreprésenté dans cette

catégorie. En France, la maladie de Parkinson est d'ailleurs maintenant reconnue comme une maladie professionnelle affectant les agriculteurs. L'utilisation de la roténone est l'un des meilleurs exemples. Il s'agit d'un pesticide très toxique pour les cellules dont la respiration est aérobie. La roténone a la capacité de bloquer le complexe I de la chaîne mitochondriale inhibant ainsi la respiration cellulaire et la production d'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules. Les neurones DAergiques sont particulièrement sensibles à cette toxine, bien plus que n'importe quelle autre cellule. Lorsque ces neurones y sont exposés, cela aboutit à leur dégénérescence qui donne lieu aux symptômes de la maladie de Parkinson (Sherer et al., 2003b; Sherer et al., 2003a). Bien qu'interdite dans certains pays occidentaux de nos jours (pas au Canada), les conséquences d'une utilisation passée de la roténone sont encore bien visibles.

La seconde hypothèse est génétique. Le caractère génétique de la maladie de Parkinson est plutôt rare et intervient dans environ 10 à 15% des cas. On retrouve principalement 4 gènes qui sont impliqués dans la forme familiale de la maladie. Il s'agit de ceux qui encode pour la protéine déglycase **DJ-1**, L'ubiquitine ligase E3-**Parkin**, La kinase de type 2 avec des domaines riches en leucine-**LRRK2** et PEN induced putative kinase-1-**PINK-1**. Très brièvement, l'ensemble de ces gènes ont comme point commun de jouer sur la fonction mitochondriale qui en temps normal permet la mitophagie. Des travaux pour réalisés uniquement *in vitro*, ont démontrés que la perte de fonction associée à ces protéines, aboutie à une accumulation massive de mitochondries défectueuses et qui relâcherait des espèces oxygénées réactives en grande quantité induisant des dommages irréversibles aux neurones DAergiques, aboutissant à leur mort. De plus, en lien avec ces protéines ayant un rôle dans la fonction mitochondriale, une troisième hypothèse a été soulevée, celle du métabolisme énergétique des neurones DAergiques. Les neurones DAergiques ont une capacité surprenante pour développer une arborisation axonale très dense et très fournie en terminaisons axonales. Les neurones DAergiques et tout particulièrement ceux de la SNc, seraient plus vulnérables du fait de la taille très importante de leur arborisation axonale qui nécessiterait une

forte demande énergétique associée à de hauts niveaux de stress oxydatif (Choi et al., 2011; Pacelli et al., 2015).

Finalement, une dernière hypothèse mais qui reste exploratoire à l'heure actuelle, est celle en lien avec le caractère asynaptiques des neurones DAergiques. En effet, il est bien établi que les neurones reçoivent des signaux rétrograde impliqués dans la survie (Kaplan and Miller, 2000; Ginty and Segal, 2002). Hors pour les neurones DAergiques leur connectivité est majoritairement non-synaptique et pourrait ainsi être un facteur de vulnérabilité associé à la maladie de Parkinson. De plus, il est intéressant de noter que dans la maladie de Parkinson, la majorité des populations neuronales qui dégénèrent établissent une majorité de terminaisons non-synaptiques. Il s'agit bien entendu des neurones DAergiques de la SNc, mais aussi les neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert, les interneurones cholinergiques du striatum, le noyau dorsal du nerf vague et les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Braak et al., 2002; Giguere et al., 2018).

3.2. Les antiparkinsoniens

Bien que découverte il y'a maintenant plus de 200 ans, la maladie de Parkinson ne possède toujours pas de traitement efficace permettant d'arrêter sa progression. Actuellement, certaines thérapies pharmacologiques ainsi que la neurochirurgie sont capables de diminuer les symptômes associés à la maladie. La faible connaissance des causes et des origines de la pathologie est en partie responsable du manque de traitements disponibles. Dans cette section nous reviendrons brièvement sur les grandes découvertes pharmacologiques jusqu'au développement de la neurochirurgie antiparkinsonienne.

3.2.1. De « *l'atropa belladonna* » à la simulation cérébrale profonde

Historiquement l'avènement des traitements antiparkinsoniens commence en 1867 avec les travaux de Jean-Martin Charcot et Léopold Ordenstein (**Figure 12**) qui démontrent pour la première fois que les alcaloïdes peuvent être efficaces contre les symptômes parkinsoniens. En effet, leurs travaux ont révélé que la belladone ou « *atropa belladonna* », une plante herbacée contenant de l'atropine (**Figure 12**), avait la capacité d'agir sur les tremblements et la rigidité musculaire. Il faut par la suite attendre la fin de la seconde guerre mondiale pour comprendre que l'atropine possède des propriétés anticholinergiques. Cette compréhension a donné lieu par la suite à un véritable essor des anticholinergiques de synthèse. Malgré tout, le tournant majeur de la pharmacologie antiparkinsonienne est sans aucun doute celui associé aux travaux du pharmacologue Autrichien Oleh Hornykiewicz (**Figure 12**), qui au début des années 1960 démontra clairement que les niveaux de DA dans le striatum étaient fortement réduits chez les patients Parkinsonien (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Par la suite, grâce à des travaux remarquables en collaboration avec le neurologue Walther Birkmayer, Oleh Hornykiewicz démontra que des infusions de L-Dopa (DA non-décarboxylée) étaient capables de restaurer les niveaux de DA initiaux chez les patients parkinsoniens. Les résultats publiés pour la première fois dans *The Journal of Vienna's Medical Society* ont rapidement été surnommés « *The L-Dopa Miracle* » soulignant l'effet indiscutable de ce traitement (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961).

Au travers de cette thèse, il me semblait nécessaire de reconnaître autant que possible les travaux inédits qui ont permis de réelles avancées dans les neurosciences et tout particulièrement en lien avec ces travaux de doctorat. Dans ce chapitre sur les antiparkinsoniens, bien que le Dr Hornykiewicz est été le premier à publier le lien entre les niveaux de DA et la maladie de Parkinson, il est également indispensable de souligner la contribution remarquable du Dr André Barbeau. Ce neurologue québécois était l'un des premiers à relier la déficience en DA à la maladie de Parkinson. En 1961, il est l'un des premier à utiliser expérimentalement des petites de doses de L-Dopa dans

le traitement de cette maladie (Barbeau et al., 1961). Malheureusement, son article soumis dans la revue *Neurology* sera refusé laissant le champ libre à Oleh Hornykiewicz de publier en premier.



Figure 12 - Photos de Léopold Ordensstein, de la fleur de Belladone ainsi que du pharmacologue Autrichien Oleh Hornykiewicz (Lehmann et al., 2007; Seeman, 2020).

À l'heure actuelle, la L-Dopa reste incontestablement le traitement de choix pour les patients Parkinsoniens. Cependant, il est à noter que son efficacité s'estompe avec le temps puisqu'il est nécessaire que la L-Dopa soit convertie en DA par l'enzyme TH au niveau des neurones DAergiques. Malheureusement et avec le temps, les neurones DAergiques de la SNc continuent à dégénérer et les neurones DAergiques restants sont incapable de compenser cette perte. Par ce fait, le traitement à L-Dopa est généralement associé à des inhibiteurs de la MAO et de la COMT dans le but de réduire au maximum la dégradation de la DA et de prolonger le plus longtemps possible les effets bénéfiques de la L-Dopa. De plus, ces inhibiteurs de la dégradation de la DA peuvent induire des effets secondaires importants tel que des dyskinésies, des troubles de la vision ou encore des perturbations au niveau du cycle du sommeil.

Finalement, une des méthodes complémentaires à la pharmacologie, développée au début des 1980 est la stimulation cérébrale profonde. Cette méthode consiste à implanter des électrodes au niveau des ganglions de la base dans le but de restaurer l'activité électrique suite à la perte de l'innervation DAergique. Actuellement, le GPi et le NST sont les cibles privilégiées pour l'implantation des électrodes puisqu'en stimulant à ces endroits les patients voient une nette diminution de l'ensemble des symptômes associés à la maladie de Parkinson.

3.3. La Schizophrénie

3.3.1. Description et diagnostique de la schizophrénie

La schizophrénie est une maladie psychiatrique extrêmement invalidante qui se caractérise principalement par une perte de contact avec la réalité. Le système DAergique semble être impliqué dans cette pathologie bien que la compréhension de cette implication ne soit pas encore bien documentée. Le terme schizophrénie a été introduit au début du 20^e siècle et provient du grec « *Schizen* » qui veut dire fracture et « *Phren* » qui signifie esprit. Cette « fracture de l'esprit » se caractérise par un ensemble de symptômes répartis en 3 groupes :

- Des **symptômes positifs** : des hallucinations, des idées délirantes, des troubles de la pensée et un langage incohérent.
- Des **symptômes négatifs** : un affect plat, de l'apathie, une anhédonie ou encore un isolement social.
- Des **symptômes cognitifs** : problèmes d'attention, difficultés à prendre des décisions et dans l'organisation.

Pour diagnostiquer une personne atteinte de schizophrénie, les médecins et psychiatres se réfèrent au manuel de diagnostics et statistiques des troubles mentaux dont les critères sont regroupés dans le tableau suivant (**Tableau 1**) et dont la 5^e version est la plus récente (année 2013) :

Critères	Critères du DSM-5
A-Caractéristiques principales	Présence d'au moins 2 des symptômes suivants: 1) délires, 2) hallucinations, 3) discours désorganisé, 4) comportement désorganisé, 5) symptômes négatifs tel qu'une réduction de l'expression émotionnelle.
B-Relations sociales et professionnelles	Pendant une période de temps significative, diminution importante du niveau de fonctionnement dans plusieurs activités (travail, relations interpersonnelles...)
C-Durée	Les signes de perturbations persistent pendant au moins 6 mois avec au moins un symptôme répondant au critère A
D-Exclusion Des troubles schizo-affectifs	Exclusion 1) absence d'épisode dépressif ou maniaque, 2) si présence de ces épisodes, ils ne l'ont été que pour une faible proportion de la durée des périodes actives et résiduelles
E-Exclusion D'une substance pharmacologique ou d'une condition médicale	La perturbation n'est pas due aux effets physiologiques directs de la substance (drogue donnant lieu à un abus, un médicament) ou d'une affection médicale
F-Lien avec un possible Trouble du développement	Si présence d'un trouble autistique ou de la communication dès l'enfance, le diagnostic de schizophrénie n'est confirmé que si les idées délirantes et les hallucinations sont prononcées et présentes avec les autres symptômes requis pour le diagnostic pendant au moins 1 mois.

Tableau 1 - Critères diagnostiques de la schizophrénie (DSM, 5^e version, 2013)

3.4. Les antipsychotiques

Les troubles psychotiques ont toujours fasciné, questionné, étonné mais ont aussi rendu l'homme méfiant. Jusqu'au 18^e siècle, les gens atteints de psychoses étaient enchaînés et enfermés en cellule individuelle montrant ainsi l'impuissance de la société à traiter ce type de pathologie. La révolution des traitements antipsychotiques n'arriva qu'au milieu du 20^e siècle avec le laboratoire français Rhône-Poulenc et l'essor incroyable de la pharmacologie.

3.4.1. Une découverte remplie de hasard

Historiquement, tout commence bien loin des troubles psychotiques mais plutôt avec les travaux de Henry Dale en 1910 qui pour la première fois, montrent que l’histamine joue un rôle majeur dans le choc anaphylactique. Dans la foulée certains laboratoires comme Rhône-Poulenc, développent des antihistaminiques tel que la phénothiazine en 1930 mais son efficacité se montre rapidement limitée. Ce même laboratoire décide alors de développer des dérivés de la phénothiazine et parvient en 1940 à synthétiser la prométhazine. Malgré une efficacité bien meilleure, on demande à synthétiser de nouveaux dérivés plus puissants avec une action sur le SNC. A la demande d’Henri Laborit, médecin français des armées, le laboratoire Rhône-Poulenc synthétise alors des dérivés de la prométhazine et abouti à la synthèse de la chlorpromazine (la première synthèse fut réalisée le 11 décembre 1951 au sein du laboratoire Rhône-Poulenc par le chimiste Paul Charpentier - **Figure 13**). Contre toute attente, cette molécule initialement destinée à traiter les réactions allergiques, se retrouva être un formidable traitement contre les psychoses. Les études pharmacologiques réalisés chez l’animal par René Ducrot et Simone Courvoisier ont mis en avant un effet central de cette molécule. Les animaux traités à la chlorpromazine devenaient totalement indifférents à leur environnement ainsi qu’aux différents stimuli sensoriels qu’ils recevaient. En effet, ces animaux spécialement conditionnés à une tâche montraient un désintéressement total sans perte de conscience une fois traités à la chlorpromazine (Courvoisier et al., 1953). Ces travaux totalement inédits et absolument fascinants, ont par la suite été confirmé en psychiatrie chez l’homme et ce pour la première fois en 1952 par Henri Laborit, Jean Delay et Pierre Deniker à l’hôpital Saint-Anne à Paris. Les personnes traitées montraient toutes ce même désintéressement qu’on pouvait qualifier « d’inhibition de l’affect » (Delay et al., 1952; Lehmann and Hanrahan, 1954). Cette découverte absolument remarquable ne fera pourtant pas l’objet d’un

prix Nobel de médecine. Aujourd'hui, l'utilisation de la Chlorpromazine est encore une option de choix dans le traitement de la schizophrénie et des troubles psychotiques.

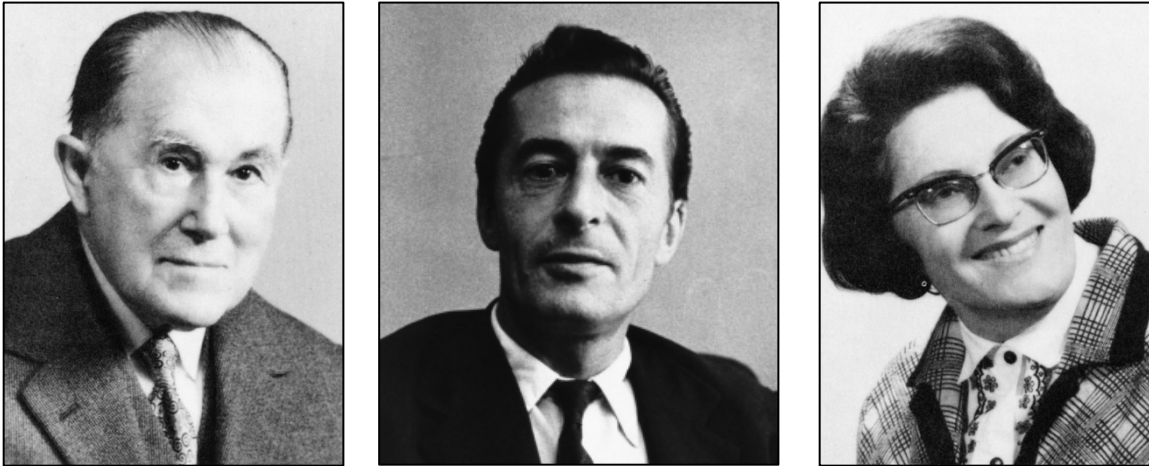


Figure 13 - Dans l'ordre des photos : Paul Charpentier, Henri Laborit et Simone Courvoisier (Science History Institute).

3.4.2. De 1960 à aujourd'hui : De l'hypothèse dopaminergique aux antipsychotiques de nouvelle génération

Il faut attendre le milieu des années 1960 et les travaux des Drs Carlsson et Lindqvist pour faire un premier lien entre la schizophrénie et la DA. En effet, ces derniers ont mis en avant que la chlorpromazine avait la capacité d'agir comme antagoniste sur les récepteurs D2 donnant ainsi lieu à l'hypothèse d'une hyperdopaminergie dans la schizophrénie (Howes and Kapur, 2009). En plus d'être efficaces contre les troubles psychotiques, les premiers antipsychotiques avaient ce profil typique de générer des symptômes extrapyramidaux de par leur forte affinité pour les récepteurs DAergiques de type D2. A cette époque dans les années 1960, il était déjà bien établi que la maladie de Parkinson était due à une perte de DA dans le striatum (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). L'induction de symptômes de type parkinsonien (symptômes extrapyramidaux) venait donc renforcer l'hypothèse que les médicaments antipsychotiques produisaient leur effet clinique en

réduisant la neurotransmission DAergique et que la schizophrénie était dû à une augmentation de la neurotransmission DAergique (Birnbaum and Weinberger, 2017). Par la suite, une nouvelle molécule synthétisée au début des années 1970, la Clozapine, est venue tout remettre en question. Cette molécule très efficace contre les troubles psychotiques n'induisait pas de symptômes extrapyramidaux. Ce profil atypique lança alors une seconde hypothèse, celle en lien avec le système sérotoninergique (hypothèse non décrite dans cette thèse), puisque en effet la Clozapine possède une affinité plus forte pour les récepteurs de type 5-HT_{2A} que pour les récepteurs DAergiques de type D2. A l'heure actuelle, l'hypothèse DAergique reste prédominante puisque l'ensemble des antipsychotiques (typiques et atypiques) possède une affinité variable pour les récepteurs DAergiques de type D2.

3.5. Drogues d'abus et dépendance

Très brièvement, plusieurs drogues d'abus comme les psychostimulants incluant l'amphétamine et la cocaïne ont la capacité de moduler, de façon directe ou indirecte, la transmission DAergique. L'amphétamine et la cocaïne ont la possibilité d'augmenter, de façon temporaire, la transmission DAergique donnant lieu à une sensation d'euphorie pour son consommateur. Au niveau mécanistique, l'amphétamine va agir sur le transporteur vésiculaire VMAT2 en diminuant le stockage vésiculaire de DA mais également en induisant un transport inverse par le DAT donnant lieu à une augmentation des niveaux de DA extracellulaires. Quant à la cocaïne, elle va avoir une action sur le transporteur DAT en rendant la recapture impossible aboutissant là aussi à une augmentation des niveaux de DA extracellulaire (Usdin et al., 1991; Ciccarone, 2011). Une utilisation répétée de psychostimulants peut aboutir une perte de contrôle de la consommation et faire plonger l'utilisateur dans le phénomène d'addiction.

4. Caractéristiques des neurones dopaminergiques

Dans les sections suivantes (4., 5., 6. et 7.), les termes « terminaison(s) » et « varicosité(s) » seront utilisés sans distinction particulière et auront la même signification.

Le système DAergique intrigue et fascine de par ses trois grandes particularités qui lui sont propres. Ainsi dans cette section, nous reviendrons sur leur arborisation axonale, leur capacité à co-libérer d'autres neurotransmetteurs et nous développerons en détails sur leur capacité à former des terminaisons axonales synaptiques et non-synaptiques.

4.1. Une arborisation axonale très dense

Une des premières particularités des neurones DAergiques concerne leur arborisation axonale. Ces neurones, dont les corps cellulaires sont situés dans l'ATV et la SNc, ont une capacité incroyable de développer une arborisation axonale très dense contenant une multitude de terminaisons. Les premiers travaux ayant explicitement démontré que les neurones DAergiques étaient capables de développer une arborisation axonale massive remontent à la fin des années 1990 avec les travaux d'André Parent chez le rat (Gauthier et al., 1999; Prensa and Parent, 2001). Par la suite, les travaux du groupe de Kaneko ont révélé qu'un seul neurone DAergique issu de la SNc chez le rat pouvait développer en moyenne ~45 cm de prolongements axonaux [Figure 14; (Matsuda et al., 2009)]. Également, une étude très intéressante a estimé chez le rat qu'un seul et unique neurone DAergique avait la capacité de former de ~100 000 à ~245 000 terminaisons axonales (Bolam and Pissadaki, 2012). Ces données démontrant que les neurones DAergiques ont une capacité à développer une arborisation axonale très dense et très fournie en terminaisons axonales, a mené à l'hypothèse d'un lien entre cette caractéristique morphologique et leur vulnérabilité dans le contexte de la maladie de Parkinson. Les neurones DAergiques et tout particulièrement ceux de la SNc, seraient plus vulnérables de par la taille très importante de leur

arborisation axonale qui nécessiterait une forte demande énergétique associée à de hauts niveaux de stress oxydatif (Choi et al., 2011; Pacelli et al., 2015).

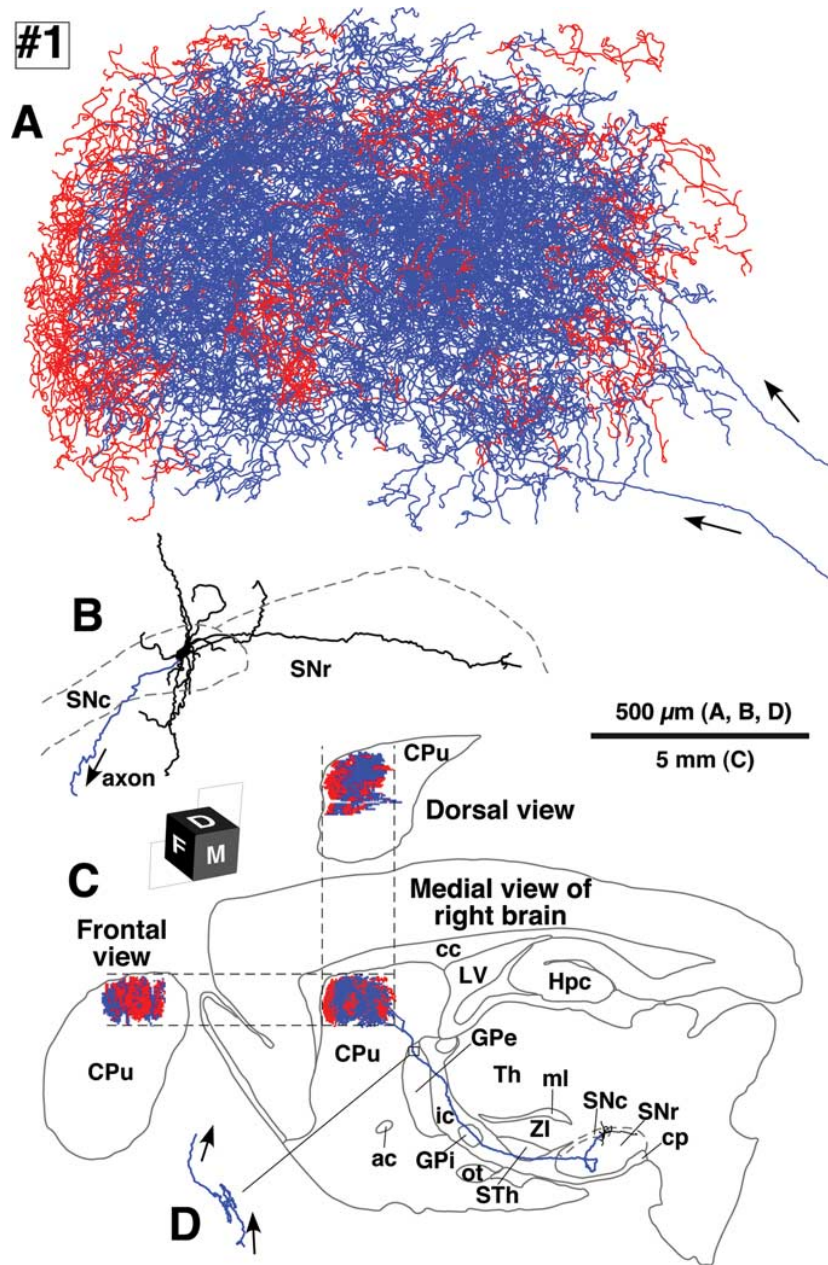


Figure 14 - Représentation de l'arborisation axonale d'un neurone dopaminergique issu de la SNc après utilisation de la technique de la chambre claire (Matsuda et al., 2009)

4.2. Un neurone multilingue

Le phénomène de co-libération, qui se définit comme étant la capacité pour un neurone à pouvoir libérer plus d'un type de neurotransmetteurs, est une découverte relativement récente avec la co-libération d'ATP et d'acétylcholine par les motoneurones à la jonction neuromusculaire (Silinsky and Ginsborg, 1983). Le système DAergique n'est pas en reste et est lui aussi doté d'une capacité de co-libération. Une première étude, à la fin des années 90, a suggéré que les neurones DAergiques étaient capables de former *in vitro* des terminaisons pouvant co-libérer du glutamate. Des expériences électrophysiologiques ont en effet décrit qu'une stimulation des terminaisons DAergiques pouvaient générer des courants excitateurs postsynaptiques bloqués par des antagonistes de récepteurs ionotropes du glutamate (Sulzer et al., 1998). Par la suite, des immunomarquages ont révélés l'expression du transporteur vésiculaire au glutamate de type 2 dans ces neurones, donnant ainsi une explication logique de cette capacité de libérer du glutamate [VgluT2; **Figure 15** (Dal Bo et al., 2004)]. Ces premières observations ont par la suite été confirmées par des études *in vivo*, où les axones des neurones DAergiques stimulés par optogénétique généraient des courants glutamatergiques excitateurs et ce spécifiquement au niveau du striatum ventral (Stuber et al., 2010).

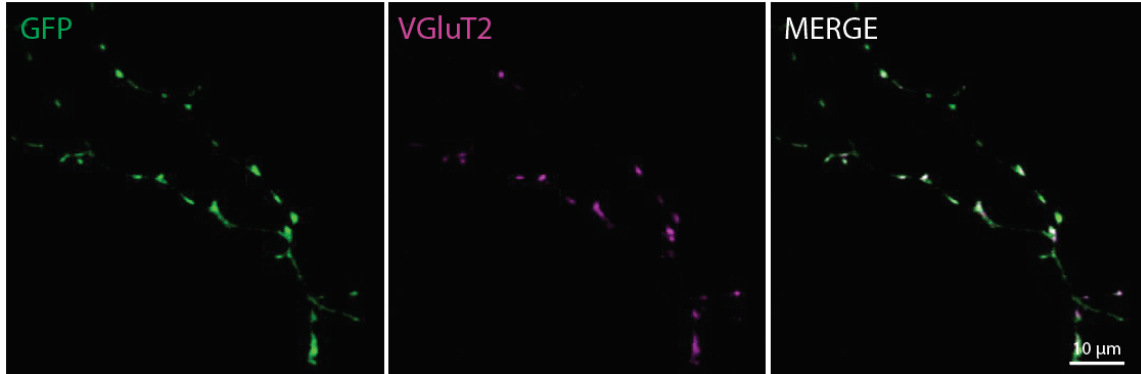


Figure 15 - Immunomarquage dirigé contre la protéine VGlut2 au niveau de terminaisons axonales d'un neurone DA (GFP) en culture (Ducrot et al., microscopie confocale X60, images non publiées).

Chez l'animal intact, le rôle de Vglut2 dans les neurones DAergiques a été étudié et documenté depuis 2010. Il a été démontré qu'une délétion conditionnelle du gène encodant pour Vglut2 dans les neurones DAergiques affectait la survie neuronale, diminuait la croissance axonale et réduisait la libération évoquée de DA (Hnasko et al., 2010; Fortin et al., 2012). Également, une suppression de l'expression de Vglut2 par les neurones DAergiques affecte la réponse comportementale aux psychostimulants comme l'amphétamine (Birgner et al., 2010).

En plus de co-libérer du glutamate, les neurones DAergiques du mésencéphale ventral sont aussi capables de co-libérer du GABA (Tritsch et al., 2012). D'une façon générale, au sein des neurones GABA du SNC, ce neurotransmetteur est synthétisé via l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD65 et GAD67) à partir de l'acide glutamique (i.e. glutamate). Quant à l'emmagasinage du GABA au sein des vésicules synaptiques, il se fait via le transporteur vésiculaire du GABA (VGAT). Cependant, de façon surprenante, dans les neurones DAergiques, il semble que l'emmagasinage du GABA dans des vésicules synaptiques soit indépendant du transporteur VGAT (Tritsch et al., 2012). En effet, les auteurs de ces travaux ont mis en avant qu'une délétion conditionnelle de VGAT dans les neurones DAergiques n'affecte en rien les courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) enregistrés au niveau des MSNs suite à la stimulation

optogénétique des neurones DAergiques. Cependant, un traitement pharmacologique avec un inhibiteur au VMAT2, la réserpine, abolie les IPSC évoqués dans les MSNs après stimulation des terminaisons axonales DAergiques (Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2016). Par ailleurs, il a été montré qu'environ 10% seulement des neurones DAergiques du mésencéphale ventral exprime GAD65 et GAD67, suggérant que la majorité des neurones DAergiques n'ont pas la capacité de synthétiser le GABA par la voie classique (Gonzalez-Hernandez et al., 2001). Des travaux *in vitro* réalisées au sein de notre laboratoire mais non publiés, ont cependant démontré la présence de l'enzyme GAD65 dans certains neurones DAergiques de l'ATV et de la SNc (**Figure 16**). Il a été proposé que le GABA libéré par les neurones DAergiques pourrait en grande partie d'une recapture du GABA extracellulaire via le transporteur membranaire du GABA (Tritsch et al., 2014).

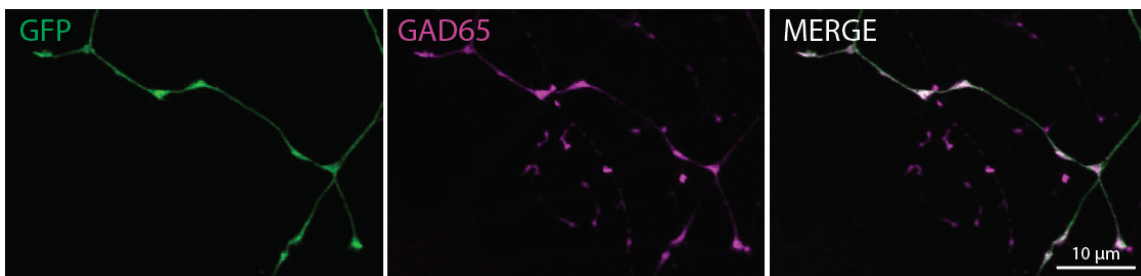


Figure 16 - Immunomarquage dirigé contre l'enzyme GAD65 au niveau de terminaisons axonales d'un neurone DA (GFP) en culture (Ducrot et al., microscopie confocale X60, images non publiées).

4.3. De la transmission synaptique à la transmission volumique

La troisième et dernière particularité de ces neurones concerne leur capacité à développer deux types de terminaisons, donnant ainsi lieu à deux modes de communication : **1)** Une transmission localisée au niveau de la fente synaptique via des terminaisons synaptiques et **2)** Une transmission volumique où le neurotransmetteur diffuse aux alentours du site de relâche via des

terminaisons dites non-synaptiques. Dans cette section, sans aucun doute l'une des plus importantes pour cette thèse de doctorat, nous reviendrons dans un premier temps sur les caractéristiques des terminaisons synaptiques, puis dans un second temps, nous aborderons en détails les travaux pionniers de Laurent Descarries et Kjell Fuxe sur les terminaisons non-synaptiques.

4.3.1. Terminaisons synaptiques : découverte et caractérisation

Temporellement tout commence en 1897 avec les travaux de Charles Scott Sherrington (**Figure 20**), médecin britannique qui inventa le terme « synapse » pour définir le lien anatomique entre deux neurones contigus. Du grec « *Syn* » et « *Haptein* » qui signifie « connexion », ce nouveau terme avait pour but de décrire le lien étroit entre deux cellules nerveuses. Sherrington introduit ainsi le concept de synapse dont la description fut publiée en 1897 dans la revue *The Textbook of Physiology* :

« There are reasons for believing, though the matter is not one definitely proved, that in the ordinary action of the cell, nervous impulses pass along the axon centripetally to the body of the cell surrounding the nucleus. Hence we may suppose that nervous impulses or influences sweeping along the axon of one cell are brought to bear through the terminal arborization of the axon or that of a collateral, on the dendrites of another cell, setting up in those dendrites nervous changes, which passing to the body of that cell issue in turn along its axon. And it has been suggested that the lack of continuity between the material of the arborization of the one cell and that of the dendrite (or body) of the other cell offers an opportunity for some changes in the nature of the nervous

influence as it passes from one cell to the other. But this must be regarded at present as a useful suggestion rather than as a definitely proved truth».

Sherrington's concept of the synapse,
Textbook of Physiology (Vol.3, Foster & Sherrington, 1897)

Les toutes premières observations de « synapses » remontent au début des années 1940 et ce grâce à une révolution technologique, celle associée au développement de la microscopie électronique. Cette invention est dû au génie d'un physicien allemand, le Dr Ernest August Friedrich Ruska, qui se rendit compte que la longueur d'onde d'un électron était bien plus courte que celle d'un photon, conférant ainsi une résolution bien meilleure en comparaison des microscopes optiques. C'est entre les années 1931 et 1933 qu'il développa et mis au point le premier microscope électronique à transmission (MET) donnant la possibilité d'observer l'infiniment petit. Les travaux d'Ernest Ruska ont permis d'avoir pour la première fois l'outil nécessaire à la visualisation de l'ultrastructure des terminaisons nerveuses.

Ainsi en 1944, il a été possible d'observer pour la première fois une « synapse » grâce aux travaux de René Cousteaux sur la jonction neuromusculaire. Ce dernier observa une terminaison nerveuse qui était étroitement proche, mais sans interaction directe, avec le domaine postsynaptique (dans cette étude il s'agissait d'une fibre musculaire striée). De plus, grâce à l'utilisation d'une quinone, le vert Janus b, il lui a été possible de visualiser l'ultrastructure de la terminaison où les organites comme les mitochondries étaient marqué d'un bleu vif (Cousteaux et al., 1944).

Par la suite, les premières observations de synapses au niveau du SNC remontent au début des années 1950 avec les travaux des Drs George Palade et Sanford L. Palay (**Figure 19**). Leurs travaux ont permis pour la première fois de donner une définition d'un point de vue morphologique de la synapse grâce à une caractérisation anatomique précise :

1. On retrouve un élément présynaptique qui se caractérise par la présence de vésicules synaptiques et de mitochondries ;
2. Il y'a la présence d'un élément postsynaptique qui fait partie intégrante d'un neurone (corps cellulaire ou dendrites);
3. Une fente synaptique entre l'élément présynaptique et l'élément postsynaptique dont la taille est d'environ 20 à 30 nm.

Avec l'évolution de la microscopie électronique (ME) et l'amélioration des méthodes de préservation des tissus biologiques dans les années 1960, il a été possible d'observer la morphologie des synapses de plus en plus précisément. Cela a ainsi donné lieu à une classification en deux catégories : les synapses de type I ou asymétriques et les synapses de type II ou symétriques (Gray, 1959; Peters and Palay, 1996).

Les **synapses asymétriques (Figure 17)** se caractérisent par les points suivants :

- La présence d'un domaine postsynaptique bien établi (densité bien visible)
- Impliquent la partie distale des épines dendritiques ou de l'arbre dendritique,
- Possèdent une fente synaptique d'environ 30 nm
- Sont généralement excitatrices (ex : glutamatergique)

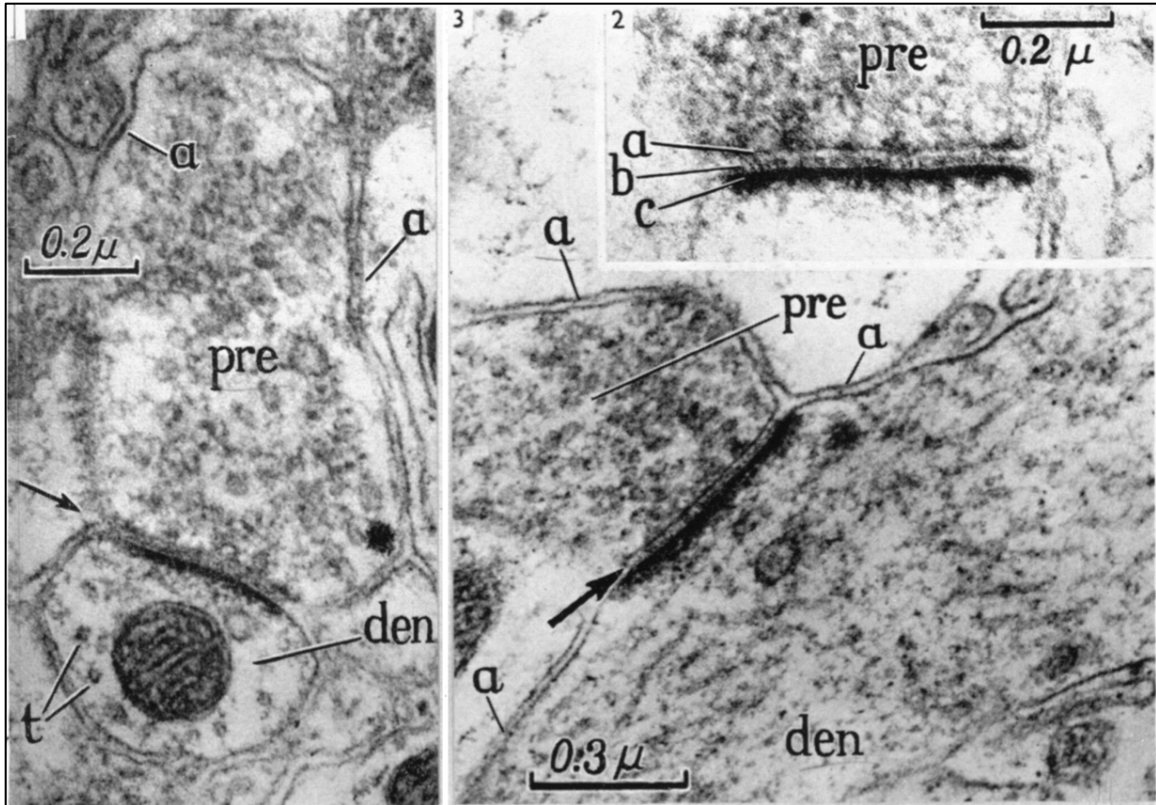


Figure 17 - Exemple de synapses de type 1, dites asymétriques [images 1, 2 et 3; (Gray, 1959)].

À l'inverse, les **synapses symétriques (Figure 18)** se définissant par les éléments suivants :

- Une faible présence du domaine postsynaptique (densité peu ou pas visible)
- Impliquent le tronc des dendrites et le soma des neurones
- Possèdent une fente synaptique d'environ 20 nm
- Sont généralement inhibitrice (ex : GABAergique ou glycinergique)

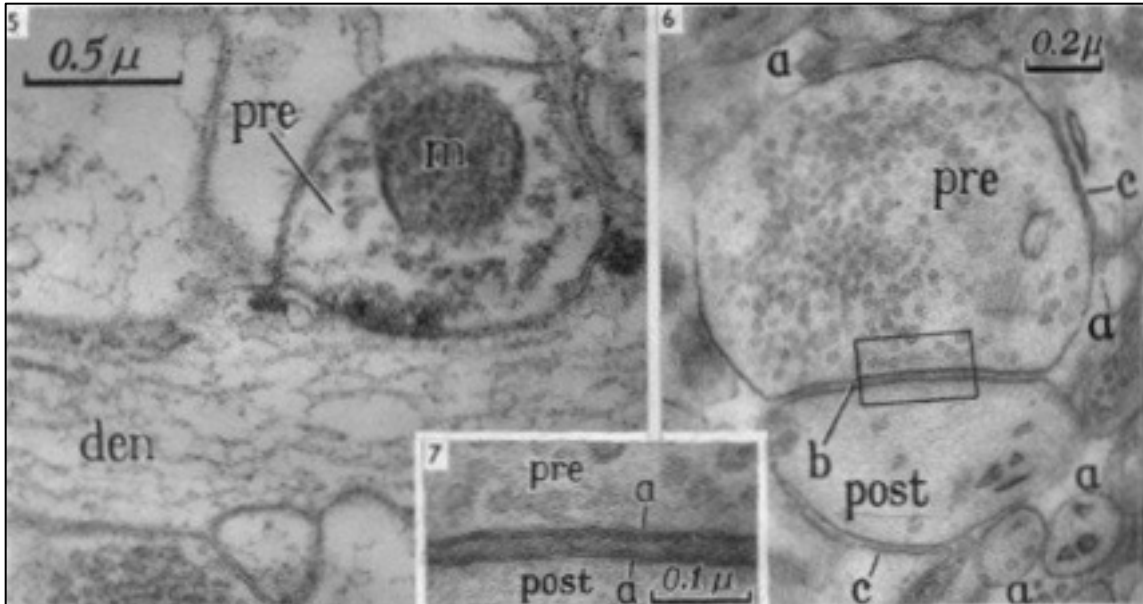


Figure 18 - Exemple de synapses de type 2, dites symétriques [images 5 et 6; (Gray, 1959)].

Un autre critère qui entre en jeu dans la caractérisation des synapses (asymétriques et symétriques) est la taille et la forme des vésicules synaptiques. Au début des années 1960, ces vésicules ont d'abord été décrites comme étant de forme différentes dépendamment du type de synapse (Peters and Palay, 1996). Au niveau des synapses asymétriques, on observait des vésicules sphériques, alors qu'on retrouvait un mélange de vésicules sphériques et aplaties (pléiomorphiques) dans les synapses symétriques. Cependant en 1971, Oswaldo Valdivia a démontré que la morphologie des vésicules pouvait être affectée par l'osmolarité du fixateur, notamment l'aldéhyde, rendant impossible l'utilisation de cette caractéristique pour déterminer le type de synapse (Valdivia, 1971; Siksou et al., 2013). Il a alors fallu attendre le développement de la méthode dite « d'immobilisation par congélation » où le tissu était mis en contact avec un bloc de métal refroidi à -270°C pour observer des vésicules de morphologie sphérique « stable » d'une taille variant entre 30 nm et 50 nm (Heuser et al., 1979). Ainsi avec cette méthode de préservation, il a été possible de distinguer trois types de vésicules :

- Les petites vésicules sphériques à centre clair, dont le contenu est transparent aux électrons, referment généralement de l'acétylcholine (ACh) ou du glutamate.

- Les vésicules synaptiques à cœur dense qui renferment les catécholamines (DA, NAD et AD) et qui sont généralement de grosses taille (~50 nm).
- Les vésicules ovales à centre clair qui renferment les neurotransmetteurs inhibiteurs tel que le GABA ou la glycine.

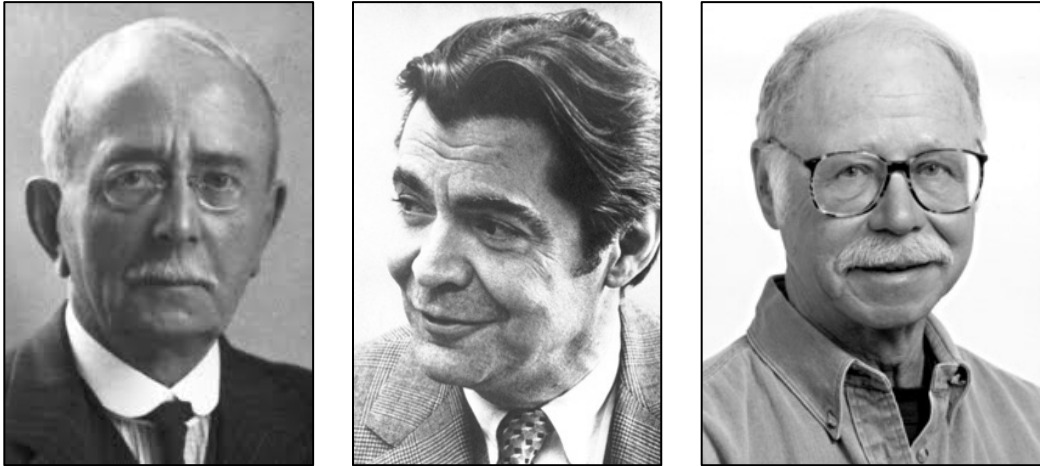


Figure 19 - Dans l'ordre des photos, les Drs Charles Sherrington, George Palade et Sanford Palay (Nobelprize.org et Harvard University).

4.3.2. Synaptique ou non-synaptique ? Quand la connectivité des neurones à dopamine joue double jeu.

Au milieu des années 1970, alors que les bases de la communication neuronale semblaient être solidement établies, un nouveau concept neuronal émergeât, celui de la transmission volumique. En effet, la découverte de terminaisons complètement dénuées de toute apposition avec un domaine postsynaptique est venue redistribuer les cartes de la neurotransmission.

Chronologiquement, tout commence au milieu des années 1970 avec les travaux de Laurent Descarries qui observe pour la première fois des terminaisons nerveuses totalement dépourvues de jonction membranaire [i.e. domaine postsynaptique (Descarries et al., 1975; Descarries et al., 1977;

Beudet and Descarries, 1978)]. Dans ces travaux, Laurent Descarries découvre alors que la grande majorité des terminaisons axonales sérotoninergiques et noradrénergiques localisées au niveau du cortex de rat ne sont pas en apposition avec un domaine postsynaptique. Cette découverte pour le moins surprenante a alors soulevé une interrogation quant aux autres populations neuronales monoaminergiques. Très rapidement, une première étude s'est portée sur le système DAergique et a démontré une absence de complexes jonctionnels au niveau des terminaisons axonales établies par les neurones DAergiques (Pickel et al., 1976). Au début des années 1980, le groupe de Laurent Descarries décide d'orienter également ses recherches sur les terminaisons DAergiques. Curieusement, les premières observations de Laurent Descarries sont venues contredire celles de Virginia M. Pickel et ont révélées que bon nombre de terminaisons DAergiques présentaient de petites spécialisations membranaires sur certaines branches ou épines dendritiques pouvant suggérer une incidence synaptique importante (Descarries et al., 1980). Par la suite, une seconde étude de Virginia M. Pickel a finalement suggéré l'existence de deux catégories de terminaisons DAergiques au niveau du striatum avec une terminaison plus large qu'à l'habitude dépourvue de toute zone jonctionnelle et avec une seconde plus petite, dotée d'un domaine postsynaptique ayant les caractéristiques d'une synapse symétrique (Pickel et al., 1981).

À l'époque, l'existence de conclusions divergentes sur l'ensemble des travaux ciblant le système DAergique souleva certaines critiques au sein de la communauté scientifique allant même jusqu'à remettre en doute l'hypothèse d'une transmission volumique. Plusieurs groupes de recherche ont également suggéré qu'à cause de limitations techniques et d'un nombre de sections incomplètes pour l'observation en TEM, il était difficile voire impossible, de déterminer correctement si les varicosités observées étaient de nature synaptique ou non-synaptique. Finalement, il a fallu attendre des travaux chez le primate non-humain pour confirmer l'idée que les neurones DAergiques (mais aussi l'ensemble des populations monoaminergiques) avaient la capacité de développer des terminaisons synaptiques et non-synaptiques (**Tableau 2**). Ainsi, avec

l'ensemble de ces travaux, la communauté scientifique était unanime pour dire que la transmission monoaminergique dans sa globalité était de type volumique et a été défini comme étant « *une diffusion du neurotransmetteur bien au-delà de son site de libération avec la possibilité d'atteindre des cibles relativement éloignées dotées d'éléments récepteurs* » (Descarries and Mechawar, 2000).

Régions cérébrales	Sous-structures	DA	NA	5-HT	ACh
Cortex cérébral					
<i>Rat</i>	Préfrontal	93%	-	-	-
	Frontal	-	7%	22%	14%
<i>Singe</i>	Préfrontal	39%	18%	23%	44%
<i>Humain</i>	Temporal	5-10%	-	-	67%
Néostriatum					
<i>Rat</i>		30-40%	-	10-13%	9%

Tableau 2 - Incidence synaptique des terminaisons axonales monoaminergiques dans le SNC du rat, du singe et chez l'homme. Pour revue (Descarries and Mechawar, 2000).

Pour l'ensemble de ces travaux, et tout particulièrement pour ceux réalisés sur le système DAergique, un des points essentiels est celui de la méthode de quantification utilisée pour calculer l'incidence synaptique. En effet, l'ensemble de ces études ont été réalisées avec comme seule technique la MET. La disponibilité et le nombre de sections utilisées pour les observations reste un point central pour la fiabilité des études. Pour ce faire, trois moyens ont été utilisés pour estimer la proportion de terminaisons synaptiques en fonction du nombre de sections disponibles pour l'observation en MET (**Figure 20**).

Terminaison axonale dopaminergique

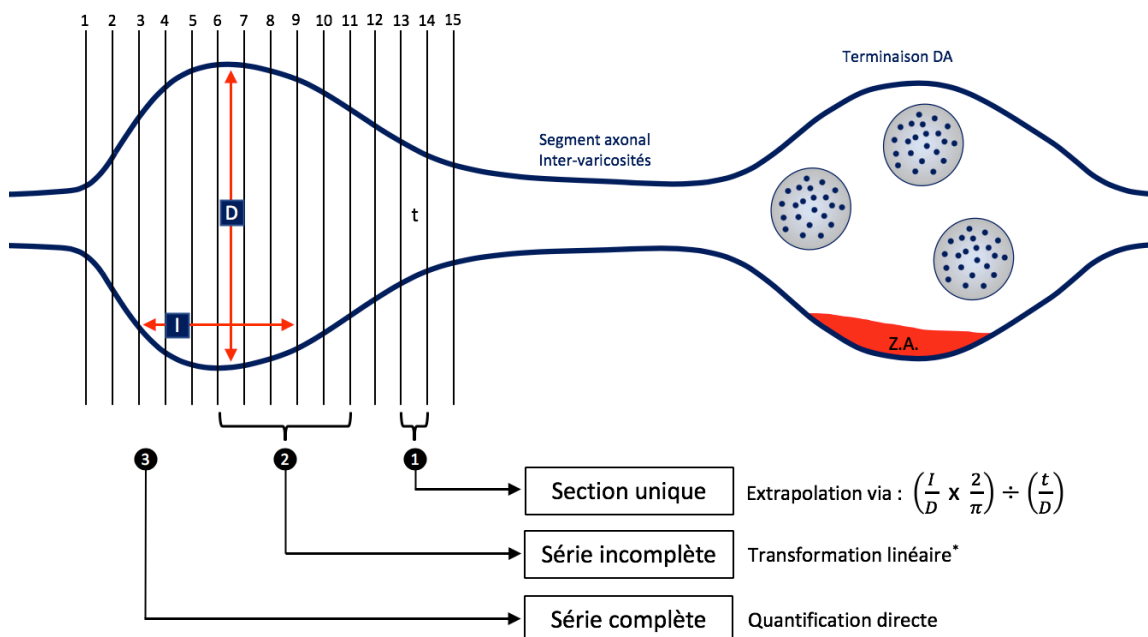


Figure 20 - Représentation schématique des différents modèles permettant de quantifier la proportion de terminaisons synaptiques (incidence synaptique) en fonction du nombre de sections disponibles pour l'observation en microscopie électronique. Formule d'extrapolation, D= diamètre de la varicosité ; t=épaisseur de la section et I=Surface de la varicosité occupée par le complexe jonctionnel, lorsque présent. [Adapté de (Descarries and Mechawar, 2000)]. * voir le texte pour plus de détails.

Dans le détail, la première méthode consiste à une extrapolation mathématique de l'incidence synaptique à partir d'une seule section issue d'une varicosité. Il s'agit de la formule des Drs Beudet et Sotelo (Beudet and Sotelo, 1981). Cette formule prend en considération la taille moyenne des varicosités, la surface en contact avec le complexe jonctionnel (si présent) ainsi que l'épaisseur des sections. Cela permet d'estimer la proportion de contacts synaptiques à partir des échantillons observés. La seconde méthode consiste à faire la transformation linéaire entre la fréquence à laquelle on observe une jonction synaptique et le nombre de sections disponible pour

l'observation (Seguela et al., 1988). Enfin, la troisième méthode est celle de l'observation directe. Lorsque la série de sections est complète, il est possible de déterminer directement l'incidence synaptique. En lien avec ces trois méthodes de quantifications, les travaux du groupe de L. Descarries et J. Antonopoulos ont donné lieu à différentes incidences synaptiques pour le système DAergiques. Il est intéressant de noter que l'incidence semble plus forte dans la coquille du NAc par rapport au cœur du NAc. Quant au striatum dorsal, l'incidence synaptique est globalement faible (**Tableau 3**).

Structures cérébrales	Section unique	Sections sériées	Extrapolation
Néostriatum	-	-	-
Marquage DAB-DA (Descarries et al., 1996)	12.3%	35%	40%
Marquage DAB-DA (Antonopoulos et al., 2002)	11%	-	35%
Noyaux Accumbens	-	-	-
Cœur NAc (Antonopoulos et al., 2002)	14%	-	47%
Coquille NAc (Antonopoulos et al., 2002)	20%	-	71%
Cœur NAc (Bérubé-Carrière et al., 2007)	11%	-	34%

Tableau 3 - Comparaison de l'incidence synaptique chez le rat entre le striatum dorsal et le striatum ventral (Antonopoulos et al., 2002; Descarries et al., 2008).

Finalement, tout comme pour les terminaisons synaptiques, les terminaisons non synaptiques ont été définies par un ensemble de critères :

- Une structure présynaptique dotée de vésicules synaptiques et de mitochondries
- Une circonférence plus importante que les terminaisons synaptiques
- L'absence de domaine post-synaptique (aucune densité post-synaptique)
- Une absence de fente synaptique.

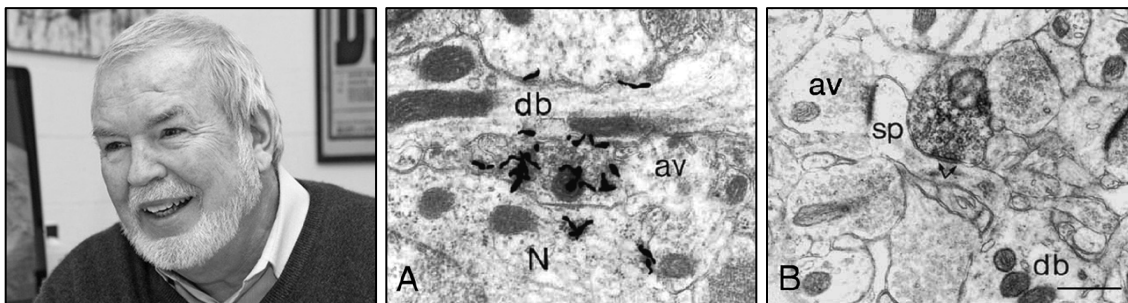


Figure 21 - Photo de Laurent Descarries et illustration d'une terminaison dopaminergique non-synaptique (**A**) et synaptique [**B**; (Descarries et al., 2008)]. Db : branche dendritique ; av : varicosité axonale ; sp : épine dendritique. Crédits : Claude Lacasse, Université de Montréal.

4.3.3. Quel rôle pour cette double connectivité dopaminergique ?

Cette double connectivité établie par les neurones du système monoaminergique et tout particulièrement pour ceux du système DAergique, a bien entendu soulevé la question du rôle et de l'importance d'avoir à la fois des terminaisons synaptiques et non-synaptiques. À la fin des années 1990, il a été démontré que les neurones DAergiques étaient capables de co-libérer du glutamate. En effet, suite à certains travaux plus qualitatifs ayant montré que certains neurones DAergiques exprimaient la glutaminase, une enzyme impliquée dans la synthèse du glutamate (Kaneko et al., 1990), des enregistrements électrophysiologiques sur des neurones DAergiques isolés ont démontrés

l'existence de courants postsynaptiques excitateurs (i.e. autapses) évoqués par des potentiels d'action (Sulzer et al., 1998). Puis d'autres groupes de recherche ont clairement démontré la présence d'ARNm encodant pour VGLUT2, confirmé par immunomarquage pour la protéine par la suite *in vitro* (Dal bo et al., 2004). Cependant, il est apparu clairement que l'immunoréactivité pour la glutaminase ou le glutamate lui-même n'étaient pas suffisante pour démontrer qu'il y avait de la co-relâche. Des résultats électrophysiologiques sont vite venus confirmer la présence de glutamate avec l'observation de réponses synaptiques excitatrices rapide au niveau du striatum et ce après stimulation des neurones DA (Sulzer et al., 1998). Des résultats *in vitro* ont par la suite démontré la même chose avec la présence de VgluT2 dans les neurones DA (Dal Bo et al., 2004). Basé sur cet ensemble, des groupes de recherche de Laurent Descarries et Louis-Éric Trudeau ont alors réalisé des observations en TEM où un double marquage TH/VGluT2 a permis de découvrir que les terminaisons VGluT2 positives au sein des neurones DAergiques étaient exclusivement synaptiques. En effet, l'incidence synaptique calculé par méthode d'extrapolation a révélé que 100% des terminaisons DAergiques VGluT2 positives était de type synaptique chez des animaux adultes au niveau du NAc avec des valeurs allant jusqu'à 125% s'expliquant par le fait que plusieurs synapses pouvaient être établies par une même terminaison [**Figure 22**; (Descarries et al., 2008)].

En lien avec ces résultats, il est légitime d'affirmer que le rôle des terminaisons synaptiques et non-synaptiques est différente. En effet, l'existence de deux types de terminaisons spécialisées pour la libération de deux classes de neurotransmetteurs ouvre la porte à plusieurs spéculations : 1) une neurotransmission synaptique rapide avec une relâche de glutamate localisée et, 2) une neurotransmission lente non-synaptique avec une libération diffuse de DA.

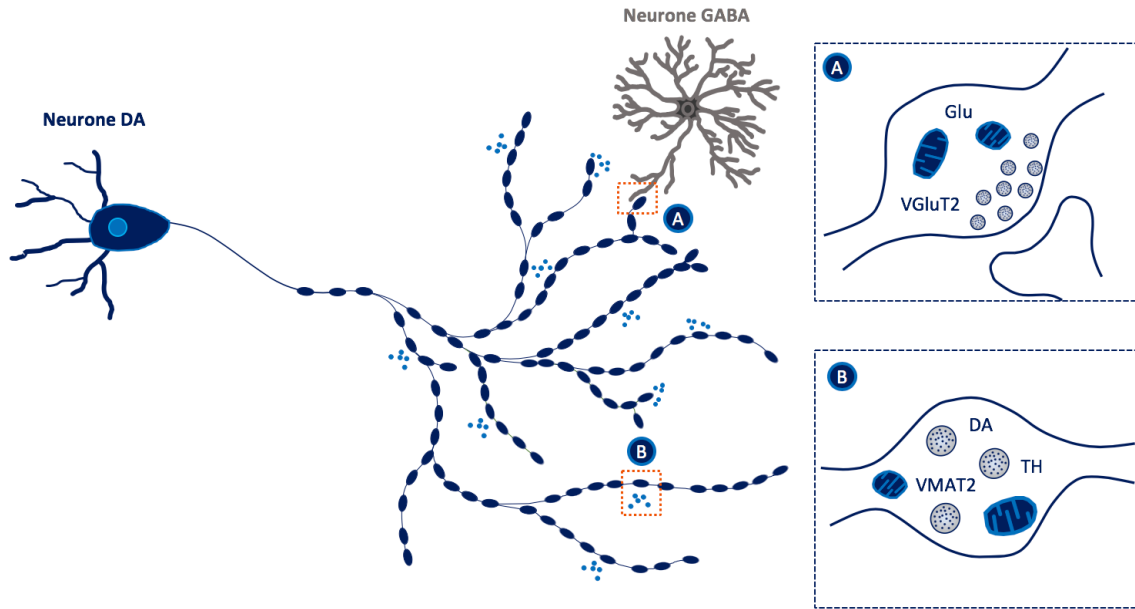


Figure 22 - Représentation schématique des terminaisons axonales libres et synaptiques d'un neurone DA. Les terminaisons libérant le glutamate ont une structure synaptique (A), alors que les terminaisons libérant la DA ont une structure non-synaptique (B) [adapté de (Descarries et al., 2008)].

Également sur la base de ces informations, nous sommes en droit de nous poser les questions suivantes : comment les neurones DA ont-ils la capacité de former deux types de terminaisons. Par quels mécanismes moléculaires certaines varicosités seront de type synaptique et d'autres de type non-synaptique ? Aussi, est-ce que l'ensemble de ces terminaisons ont la même structure moléculaire et la même capacité de relâche de neurotransmetteurs ? Pour répondre à ces différentes questions, il est important de comprendre dans un premier temps comment la neurotransmission est régulée, et quelles sont les protéines impliquées dans l'exocytose d'une façon générale (**partie 5**).

5. Neurotransmission

De par le caractère de cette thèse ciblant spécifiquement les terminaisons axonales DAergiques, il semblait essentiel d'aborder la neurotransmission en décrivant par quels moyens les neurones, incluant les neurones DAergiques sont capables de libérer les neurotransmetteurs. Également, en lien avec la dualité de cette connectivité DAergique, il semblait indispensable de décrire les connaissances sur les protéines de structures retrouvées à la zone active. Après une courte partie sur le mécanisme d'exocytose, nous reviendrons sur les protéines de zone active avec une emphase sur trois d'entre elles.

5.1. Mécanisme d'exocytose

Dans le SNC, la neurotransmission chimique est généralement un processus très rapide et très efficace et où le délai entre le potentiel d'action présynaptique et l'activation du récepteur ionotrope postsynaptique est inférieur à 2ms. En accord avec cette cinétique rapide, les observations ultrastructurelles des synapses classiques en ME, ont montré que l'élément présynaptique et l'élément post-synaptique sont étroitement juxtaposés et séparés par une fente synaptique de quelques dizaines de nanomètres. Au niveau mécanistique, la libération des neurotransmetteurs est déclenchée par la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique au niveau de la zone active (**voir partie 6.2**). Ce mécanisme d'exocytose comporte 4 grandes phases décrites ci-dessous (**Figure 23**) :

1. **Une phase d'assemblage** (en anglais : tethering) : où le complexe Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor (SNARE) qui regroupe les protéines : syntaxine, mammalian uncoordinated-18 (Munc-18), synaptobrevine (VAMP2) and synaptosomal-associated protein, 25kDa (SNAP-25) va pouvoir se former.

2. Une **phase d'arrimage** (en anglais : docking) : où la vésicule contenant les neurotransmetteurs va s'arrimer au complexe SNARE à l'aide des protéines **Rab-3 Interacting Molecule (RIM)** et **Mammalian uncoordinated-13 (Munc-13)**.
3. Une **phase d'activation** (en anglais : priming) : le complexe SNARE va être activé par le recrutement de la protéine complexine qui va venir s'intercaler dans le complexe SNARE.
4. Une **phase de fusion** (en anglais : fusion) : l'influx de Ca^{2+} intracellulaire suite à la dépolarisation neuronale va permettre à deux molécules de Ca^{2+} de venir se fixer sur le site C2A et C2B de la synaptotagmine 1 (Syt-1). La fixation du Ca^{2+} sur ces deux sites va alors induire un changement de conformation de la protéine Syt-1, permettant ainsi la fusion de la vésicule à la membrane présynaptique (Brose et al., 1992).

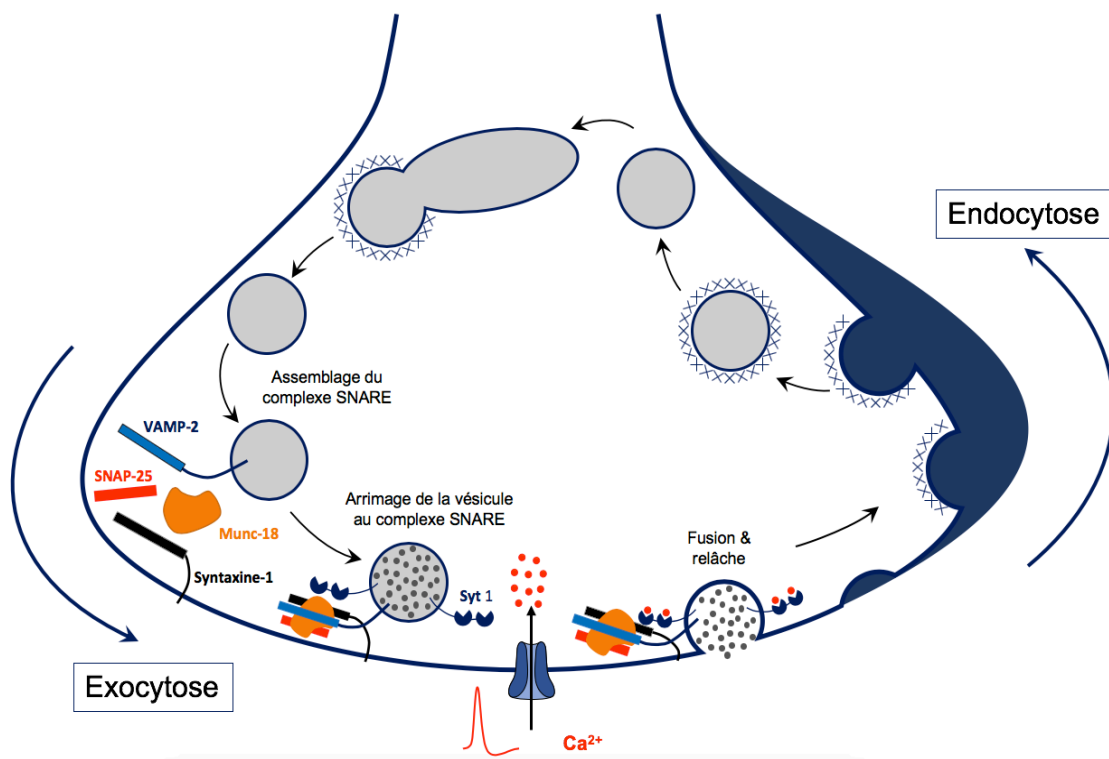


Figure 23 - Représentation schématique du processus d'exocytose d'un neurotransmetteur suite à un potentiel d'action.

5.2. La zone active et ses protéines, emphase sur Munc-13, RIM et Bassoon

Le processus d'exocytose, dont l'ultime étape est la fusion de la vésicule à la membrane, se fait au niveau d'un domaine bien particulier de la terminaison axonale que l'on appelle la ZA. D'une façon générale la ZA est composée d'un ensemble de protéines qui sont dotées de plusieurs sites d'interactions protéine-protéine [Figure 24; (Kaeser et al., 2011; Sudhof, 2012; Held and Kaeser, 2018; Liu et al., 2018)]. Dans cet ensemble on retrouve les éléments suivants :

- 1) La protéine **ELKS/RAB6-interacting/Cytomatrix at the active zone-Associated Structural protein (CAST)/ family member 1 (ERC-1)**
- 2) La protéine **RIM**
- 3) La protéine **RIM-Binding Protein (RIM-BP)**
- 4) La protéine **Munc-13**
- 5) Les protéines **Bassoon/Piccolo**
- 6) La protéine α -**Liprine**

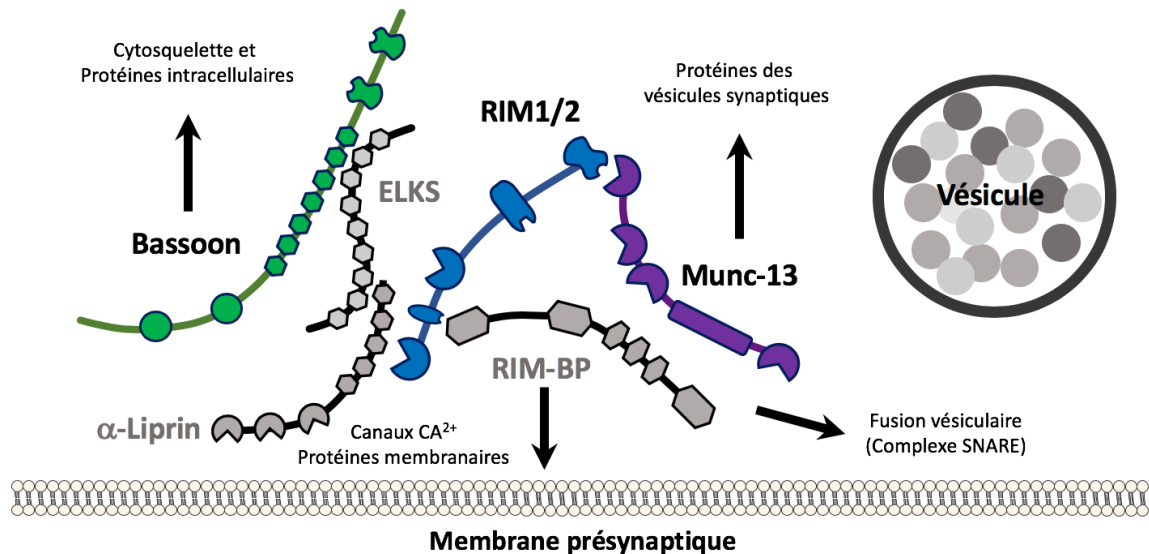


Figure 24 - Représentation schématique des différentes protéines qui composent la zone active (ZA) et leurs principales interactions.

De nombreuses études se sont intéressées au rôle de chacune de ces protéines notamment au niveau des terminaisons synaptiques excitatrices glutamatergiques du cortex ou de l'hippocampe. Cependant, à l'heure actuelle, peu d'études ont ciblé le mécanisme d'exocytose des neurones DAergiques. Dans cette partie nous mettrons l'emphase sur les protéines RIM, Munc-13 et Bassoon, qui de par leurs fonctions, semblent être plus importantes que les autres. Les protéines RIM et Bassoon font partie des protéines qui ont été étudiés au sein du système DAergique ont été étudiés durant cette thèse de doctorat.

5.2.1. Protéine de la zone active Munc-13

Une première protéine qui compose la ZA est la protéine Munc-13. Cette protéine existe sous trois isoformes, Munc-13.1, Munc-13.2 et Munc-13.3, et qui ont toutes un rôle dans l'exocytose des vésicules synaptiques (Brose et al., 1995; Augustin et al., 2001). Les isoformes majoritaires sont Munc-13.1 et Munc-13.2 et contiennent le plus grand nombre de domaines d'interactions. Ces deux isoformes auront toute notre attention dans cette sous-section. Malgré tout, il existe une 4^e isoforme, Munc-13.4, mais qui n'est pas retrouvée dans les terminaisons axonales (Feldmann et al., 2003).

Munc-13 est l'une des protéines les plus importante de la ZA et est indispensable pour l'exocytose. Cette protéine a la capacité d'interagir directement avec le complexe SNARE via la syntaxine-1, et ce grâce à son domaine « Mun » [Figure 25; (Betz et al., 1997)]. Une des caractéristiques de cette protéine est sa dépendance vis à vis de la protéine RIM. En effet, via son domaine C2A la protéine Munc-13 se lie au domaine doigt de zinc de RIM pour former un complexe hétérodimérique fonctionnel (Figure 27). Ainsi, la seule présence de Munc-13 au niveau des terminaisons axonales n'est pas suffisante pour que le processus d'exocytose évoqué soit fonctionnel et inversement. Quant aux domaines C₁, C₂A et C₂C ils ne sont pas capables de lier le Ca²⁺ contrairement au domaine C₂B. Une étude publiée au début des années 2000 a démontré

qu'une délétion de Munc-13 inhibe complètement la relâche évoquée et spontanée des neurotransmetteurs. Cependant et de façon surprenante, la synaptogénèse semblait être normale malgré l'absence d'amorçage vésiculaire (Varoqueaux et al., 2002).

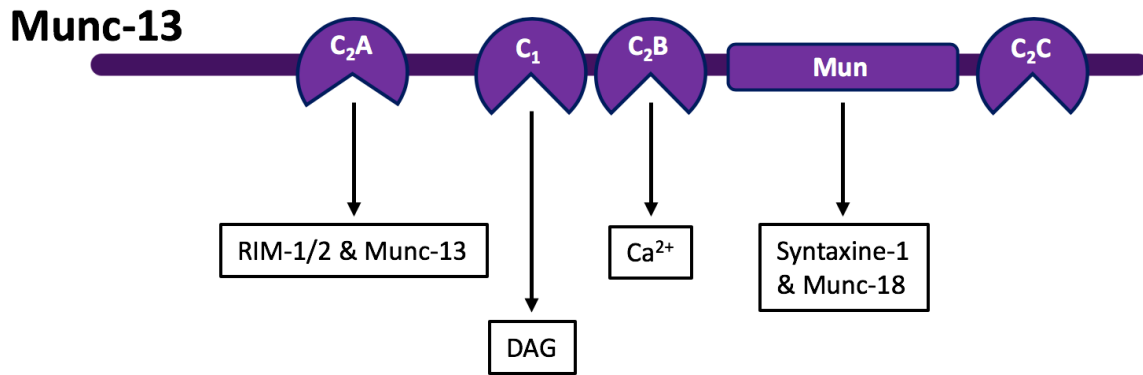


Figure 25 - Structure de la protéine Munc-13 et de ses différents domaines d'interactions avec d'autres protéines de ZA tel que RIM-1/2, Syntaxine-1 et Munc-18.

5.2.2. Protéine de la zone active RIM

Les protéines RIM sont des protéines localisées à la zone active et interviennent directement, et de plusieurs manières, dans le mécanisme d'exocytose. Cette fonction est due à leurs interactions avec des protéines du complexe SNARE, des protéines de la ZA ainsi qu'avec des canaux calciques voltages dépendants (Wang et al., 1997). Chez les mammifères, on retrouve 4 gènes qui encodent pour les protéines RIM (RIM-1; RIM-2; RIM-3 et RIM-4) et qui chacune d'entre elles peuvent être exprimées sous 3 isoformes différentes : α , β et γ . Dans les terminaisons axonales, on retrouve uniquement la protéine RIM-1, qui est la forme majoritaire, et la protéine RIM-2. Dans cette sous-section nous nous intéresserons uniquement aux protéines RIM-1/2 de l'isoforme α , puisqu'elles sont les plus exprimées, et possèdent le plus grand nombre de sites

d'interactions impliqués dans la régulation de l'exocytose [Figure 26; (Kaeser et al., 2011)]. Ainsi, on retrouve les sites d'interactions suivants :

- 1) Un domaine en doigt de zinc (Zn) qui interagit avec Munc-13
- 2) Un domaine en hélice-alpha (H- α), qui interagit avec la petite protéine Rab-3
- 3) Un domaine de densité postsynaptique (PDZ) qui permet une liaison avec les canaux calciques qui dépendent du voltage
- 4) Un domaine C2A qui interagit avec SNAP-25 et Syt-1
- 5) Un domaine C2B qui interagit avec SNAP-25 et Syt-1
- 6) Un domaine riche en proline (PxxP) qui interagit avec la protéine RIM-BP

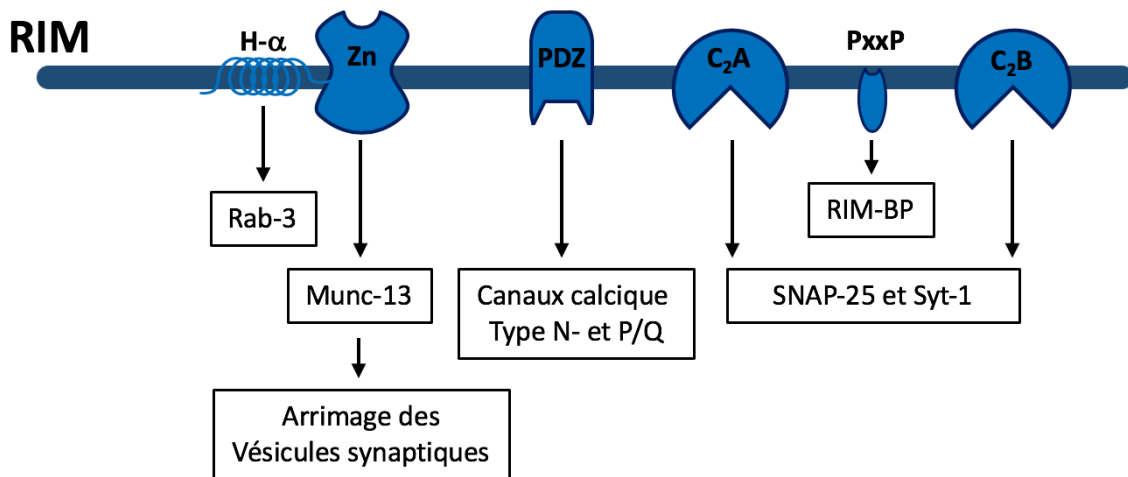


Figure 26 - Structure de la protéine RIM et de ses différents domaines d'interactions.

Dans cet ensemble d'interactions possible, l'une est particulièrement fondamentale pour la libération de neurotransmetteurs. En effet, la protéine RIM-1/2 α a la capacité d'interagir avec la protéine Munc-13, conférant à la protéine RIM le statut de régulateur de la neurotransmission. Une étude particulièrement intéressante a montré qu'une délétion du gène qui encode RIM fait en sorte que la protéine Munc-13 adopte une conformation sous forme d'homodimère via son site C2A localisé dans la partie N-terminale (Figure 27). L'homodimérisation de Munc-13 a alors pour

conséquence de s'auto-inactiver et d'inhiber ainsi l'interaction avec la protéine syntaxine-1 du complexe SNARE [voir partie 5.2.1 (Lu et al., 2006; Deng et al., 2011)].

Une seconde interaction protéique avec RIM-1/2 α permettant aussi de réguler l'exocytose, est celle avec la protéine Rab3, qui intervient dans la fusion des vésicules synaptiques. Cette petite protéine de la famille de Ras serait impliquée dans la formation du complexe SNARE et dans la régulation de l'exocytose (Wang et al., 1997; Yamaguchi et al., 2002).

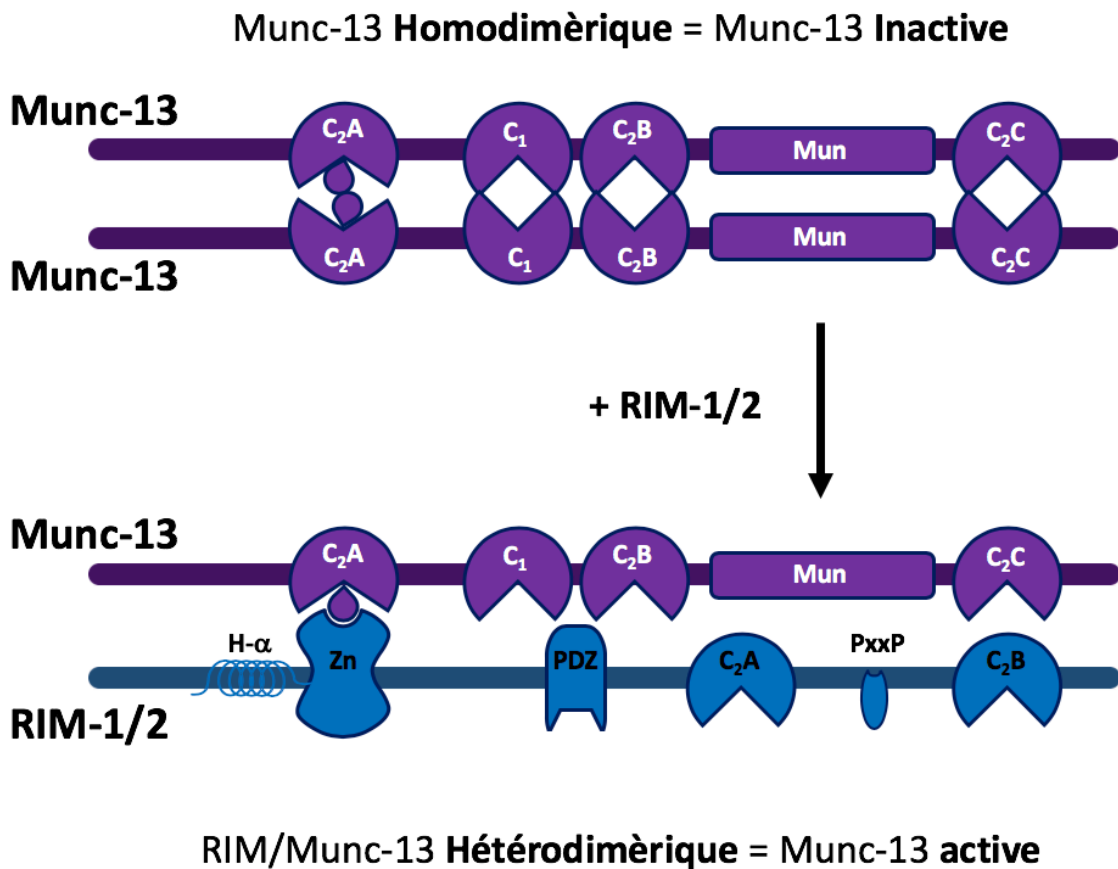


Figure 27 - Représentation schématique de l'interaction entre RIM et Munc-13 et de son importance dans la régulation de l'exocytose [Adapté de (Lu et al., 2006; Deng et al., 2011)].

5.2.3. Protéine de la zone active Bassoon

La protéine Basson a été découverte à la jonction neuromusculaire et a été catégorisée comme protéine de structure des terminaisons neuronales (tom Dieck et al., 1998). Chez les vertébrés, la protéine Basson est localisée à la zone active et contient plusieurs sites d'interactions protéine-protéine. D'une façon générale, la protéine Basson est couplée à son partenaire préférentiel Piccolo (Fenster et al., 2000). La protéine Basson contient plusieurs domaines d'interactions nécessaires pour le processus d'exocytose :

- 1) Deux domaines en doigt de zinc (Zn) qui interagissent avec l'ubiquitine ligase E3
- 2) Cinq domaines homologue Piccolo/Bassoon (PBH^{*}) qui permettent une forte interaction entre les protéines Basson et Piccolo. Le 5^e domaine PBH situé dans la partie C-terminal domaine interagit avec la protéine Munc-13
- 3) Trois domaines en super hélice (Coiled-coil ; CC) qui permettent une interaction avec :
 - Pour le domaine CC2 : Piccolo
 - Pour le domaine CC3 : ELKS & CAST

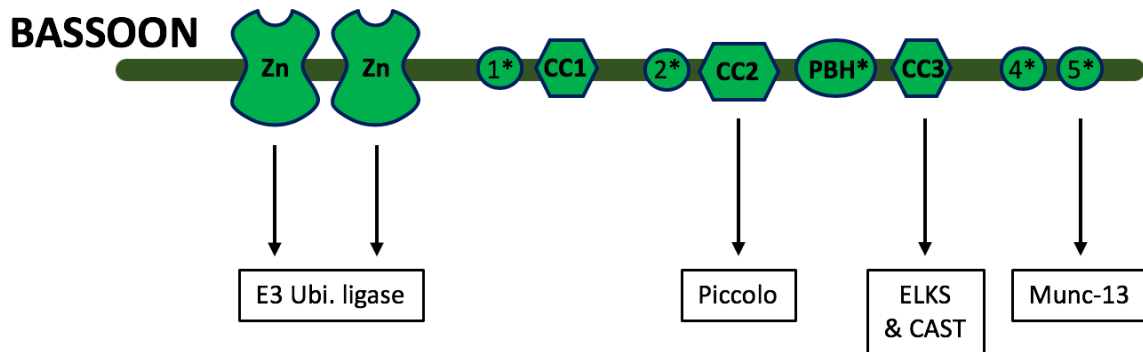


Figure 28 - Structure de la protéine Basson et de ses différents domaines d'interactions.

Plusieurs études ont spécifiquement ciblé la protéine Basson pour étudier son rôle dans la neurotransmission. Trois de ces études ont attiré notre attention dont une première qui démontre le

rôle majeur de la protéine Bassoon dans la mise en place des protéines de structure lors de la synaptogénèse. En effet, les auteurs ont rapporté que la protéine Bassoon est essentiellement impliquée dans l'homéostasie protéique en régulant le processus d'ubiquitinylation (Waites et al., 2013; Ivanova et al., 2016). De par son domaine d'interaction avec l'ubiquitine ligase E3 (**Figure 28**), la protéine Bassoon est capable d'induire la protéolyse des protéines non-nécessaires et tout particulièrement lors des processus de plasticité synaptique. Il a également été démontré que les neurones déficients pour la protéine Bassoon avaient une accumulation d'endolysosome et de vésicules synaptiques hypertrophiées (Waites et al., 2013). De plus, et tel que décrit dans la section **6.1.**, la protéine Bassoon est l'une des premières à être recrutée lors de la mise en place des contacts synaptiques, lui conférant ainsi un rôle déterminant dans l'intégrité des synapses dès les premières étapes de la synaptogénèse (Gundelfinger et al., 2015). Finalement, deux autres études ont mis en avant l'importance de Bassoon dans la neurotransmission. L'une a suggéré l'implication de Bassoon dans la mise en place des canaux Ca^{2+} voltage dépendant au niveau des terminaisons présynaptiques (Frank et al., 2010). La seconde a démontré qu'une délétion de piccolo associée à des ARNs interférant dirigés contre Bassoon diminue significativement le nombre de vésicules localisées au niveau à la ZA (Mukherjee et al., 2010).

5.3. Neurotransmission dopaminergique, que savons-nous ?

Bien qu'étudié depuis plus de 40ans, le système DAergique comporte encore de nombreuses zones d'ombres et tout particulièrement : **1)** Au niveau de la composition moléculaire des terminaisons axonales et **2)** Au niveau de la fonction des protéines qui se retrouvent dans les terminaisons axonales. En parallèle de cette thèse, quelques études ont malgré tout été publiés sur l'expression, le rôle et la fonction de certaines protéines impliquées dans la neurotransmission DAergique. Dans cette sous-section nous retiendrons spécifiquement deux études publiées par le groupe de Pascal Kaeser de l'Université d'Harvard. Dans une première étude, les auteurs ont ciblé

tout particulièrement le censeur calcique Syt-1 permettant d'enclencher la fusion vésiculaire à la membrane plasmique présynaptique. En réalisant un KO conditionnel du gène encodant pour la Syt-1 dans les neurones DAergiques, les auteurs ont observé une abolition complète de la libération évoquée de DA. Malgré tout, il a été rapporté que les niveaux extracellulaire de DA étaient inchangé suggérant que les neurones DAergiques déficient pour la protéine Syt-1 pouvaient toujours libérer de façon spontanée via un mécanisme indépendant de la protéine Syt-1 (Banerjee et al., 2020a). Dans une seconde étude, et en lien avec les protéines de ZA, le groupe de Pascal Kaeser a étudié le rôle des protéines RIM1/2 et ELKS. Dans cette seconde étude, les auteurs ont tout d'abord rapporté que seules ~30% des terminaisons DAergiques étaient positives pour RIM1/2. De façon surprenante, les auteurs ont démontré que le double KO conditionnel de RIM1/2 dans les neurones DAergiques inhibait complètement la relâche évoquée de DA, mais pas la relâche spontanée (Liu et al., 2018). Ces travaux suggèrent clairement une organisation moléculaire différentes au sein des terminaisons axonales DAergiques différentes en comparaison des neurones plus conventionnels qui ont été étudiés précédemment pour caractériser la neurotransmission synaptique classique. Ainsi, ces travaux suggèrent l'existence de deux mécanismes de libération de DA : un qui dépendant et un second qui est totalement indépendant de RIM1/2. Pour terminer, ces travaux ont également révélé que l'absence de RIM1/2 au niveau des terminaisons DAergiques axonales perturbait le regroupement et l'expression de la protéine Bassoon démontrant un rôle fondamental de cette protéine dans l'organisation moléculaire de la zone active. Cependant, aucune étude n'a jusqu'à maintenant examiné la présence de protéines telles que RIM1/2, Syt-1 ou Bassoon en tentant de distinguer entre les terminaisons synaptiques et non-synaptiques.

6. Formation des synapses

La formation et le maintien des synapses est un processus relativement complexe et particulièrement régulé mais dont le mécanisme complet n'est pas encore totalement connu. Malgré tout, il est bien établi que la synaptogénèse se déroule en trois grandes étapes : **1)** Le cône de croissance axonal reconnaît la cellule cible, **2)** La jonction synaptique se forme à la suite du recrutement des protéines d'adhésion cellulaire (i.e. protéines transynaptiques), **3)** La maturation et le maintien de la synapse se fait grâce à ses propriétés particulières dépendamment de la nature excitatrice ou inhibitrice de la synapse (Ziv and Garner, 2004). Dans ce chapitre, notre attention se portera sur les protéines d'adhésion cellulaire et nous essaierons de comprendre en quoi elles sont indispensables au bon fonctionnement d'une synapse. Mais avant tout, bien que non étudié directement pendant cette thèse de doctorat, il semble important d'évoquer très brièvement par quels mécanismes moléculaires les boutons terminaux s'établissent au niveau de l'axone.

6.1. Établissement des boutons axonaux

Durant la croissance et la maturation neuronale, une des étapes fondamentales est celle de l'établissement des boutons terminaux au niveau de l'axone. Il s'agit là d'une étape qui intervient relativement tôt dans le processus de maturation neuronale. Dans un premier temps, des facteurs de guidage axonal, tels que les éphrines et les cadhérines, vont exercer une influence sur le cône de croissance axonal, ce qui va aboutir à la formation « spontanée » de boutons axonaux. Par la suite, il y'a le recrutement puis la mise en place de protéines de structure via des vésicules de transport qui vont acheminer ces éléments depuis le soma. Ces vésicules de transport sont de deux types : il s'agit des **Piccolo/Bassoon Transport Vesicles (PTVs)** ainsi que les **Synaptic vesicle Transport Vesicle (STVs)**. Les STVs vont être les premières à arriver au niveau du bouton axonal naissant et

vont permettre une forte accumulation de vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur. Par la suite, les PTVs (Piccolo/Bassoon Transport Vesicles) vont être recrutées au site de libération naissant. Ces PTVs contiennent de nombreux éléments de zone active, tel que les protéines de structure Bassoon et Piccolo, mais également des éléments indispensables au processus d'exocytose comme les protéines SNAP-25, Munc-18 ou encore la protéine Syntaxine-1 [voir partie 5 (Ziv and Garner, 2004; Garner et al., 2006; Gundelfinger et al., 2015)]. Cette mise en place des boutons axonaux naissant peut-être résumée en 3 grandes phases :

- a) L'axone en développement contient plusieurs groupes de vésicules de transport qui vont permettre l'assemblage de la structure présynaptique. Cela inclus les PTVs et les STVs.
- b) De façon spontanée, certaines varicosités (ou renflements) vont se former le long de l'axone et où une forte accumulation de vésicules synaptiques va s'opérer.
- c) Le contact entre l'élément présynaptique et postsynaptique va pouvoir se faire grâce au recrutement d'autres vésicules contenant des protéines de zones actives et des protéines impliquées dans l'exocytose des neurotransmetteurs.

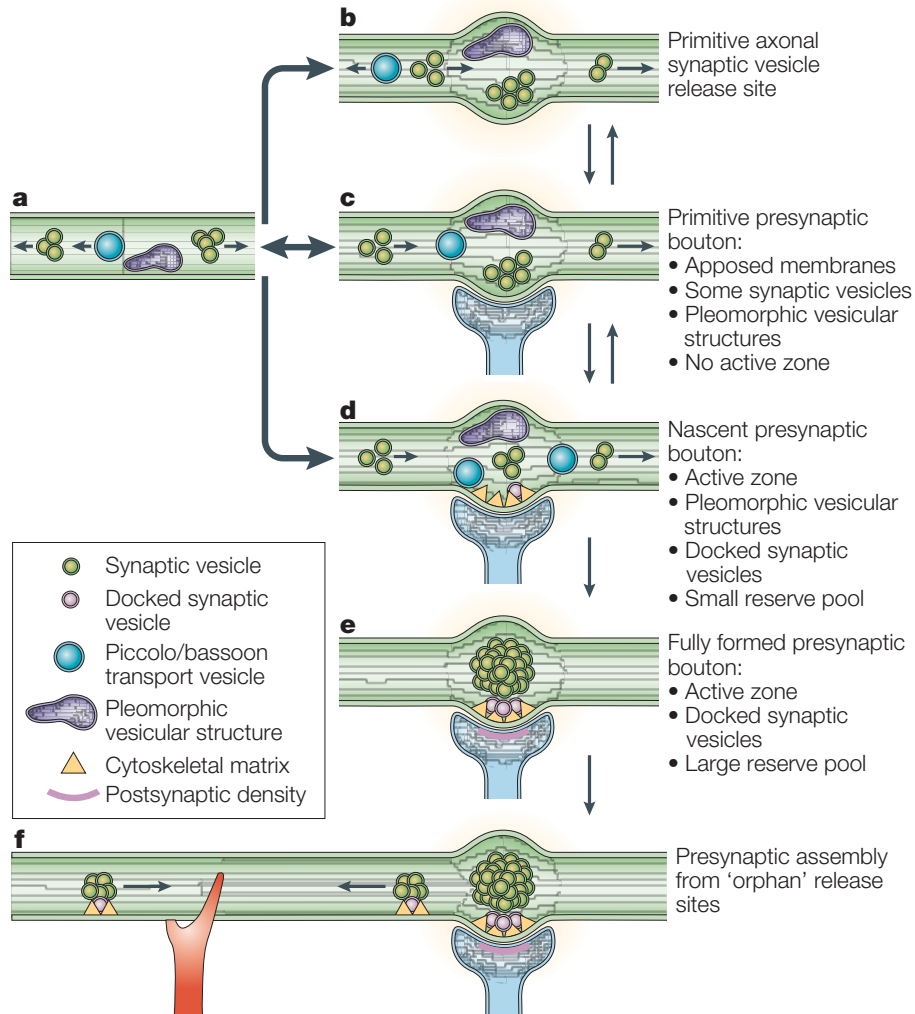


Figure 29 - Représentation schématique de la mise en place d'un bouton axonal (Ziv and Garner, 2004).

6.2. Protéines trans-synaptiques

D'une façon générale, le développement, la maturation et le maintien des synapses font intervenir plusieurs grandes familles de protéines transsynaptiques dont les plus importantes sont les neurexines (Nrxns), les neuroligines (Nlgn), les protéines Leukocyte common antigen-related receptor protein tyrosine phosphatase (LAR-PTPs), les récepteurs à tyrosine kinase de type-C (TrK-

C) ou encore les protéines transmembranaires à domaines riches en leucine (LRRTMs). Dans cette partie nous reviendrons sur leurs caractéristiques ainsi que leur rôle dans la formation et le maintien des synapses avec une emphase sur les Nrtns et les Nlgn3.

6.2.1. Les neurexines : découverte et caractéristiques

Les Nrtns ont été découvertes en 1992 avec les travaux de Yuri Ushkaryov, alors dans le laboratoire de Thomas Sudhöf. Pour comprendre comment ces protéines transsynaptiques ont été mise au jour il faut remonter quelques années en arrière.

Chronologiquement tout commence au début des années 1970, avec l'utilisation de l'alpha latrotoxine (α -LTX) dans le cadre d'études portant sur le processus d'exocytose. L' α -LTX, molécule qui compose le venin de l'araignée veuve noire, possède la propriété d'induire une relâche massive de neurotransmetteur en se fixant à son récepteur, la latrophiline [LPH; (Longenecker et al., 1970)]. Il a été démontré que ce récepteur était spécifiquement exprimé au niveau des terminaisons axonales de certains neurones (Valtorta et al., 1984). Durant plusieurs années, l' α -LTX a été utilisée comme outil moléculaire pour étudier le mécanisme d'exocytose au niveau des terminaisons neuronales (Augustine et al., 1987). Une des questions abordées par le laboratoire de Thomas Sudhöf a été de comprendre si ce récepteur à l' α -LTX pouvait être impliqué dans la formation et le maintien des synapses. Pour les besoins expérimentaux, Sudhöf réalisa un clone du récepteur LPH à partir de peptides purifiés de cerveau de bovin. De façon surprenante, le produit de clonage révéla alors deux autres complexes protéiques liant l' α -LTX avec une haute affinité et dont une partie des séquences nucléotidiques étaient similaires. Ces deux autres complexes se sont révélés être les protéines Nrtn-1 et Nrtn-2 (Ushkaryov et al., 1992; Sugita et al., 1999).

Chez les mammifères, il existe 6 isoformes de Nrnx encodées par trois gènes, les gènes de la Nrnx-1, Nrnx-2 et Nrnx-3, mais transcrits par deux promoteurs, Alpha (Nrnx- α) et Bêta (Nrnx- β), donnant ainsi lieu aux Nrnxns 1 α , 2 α , 3 α et 1 β , 2 β , 3 β (Tabuchi and Sudhof, 2002). Les Nrnx sont très majoritairement exprimées au niveau des terminaisons neuronales présynaptiques (Graf et al., 2004). Cependant, une étude rapporte qu'une expression des Nrnx au niveau du domaine postsynaptique est possible (Taniguchi et al., 2007). Il est à noter qu'on retrouve aussi bien les Nrnx aux synapses excitatrices qu'inhibitrices bien que les Nrnx-1 et Nrnx-3 soient retrouvées préférentiellement aux synapses excitatrices et que la Nrnx-2 soit majoritairement retrouvée aux synapses inhibitrices (Graf et al., 2004). Les Nrnx- α et Nrnx- β se différencient uniquement par leur domaine extracellulaire puisque leur domaine intracellulaire est identique. Les Nrnx- α comportent 6 domaines extracellulaires **L**aminin, **N**eurexin, **S**ex hormon-binding domain (LNS) intercalés par 3 domaines **E**pidermal **G**rowth **F**actor (EGF) alors que les Nrnx- β n'en comportent qu'un seul [**Figure 30**; (Missler and Sudhof, 1998)]. Les domaines LNS permettent aux Nrnx d'interagir avec leurs ligands postsynaptiques tel que les Nlgn ou des protéines LRRTMs. Au niveau de leur domaine intracellulaire, l'ensemble des Nrnx ont la capacité, via leur domaine **P**ostsynaptic density 95, **D**iscs large, **Z**onula occludens-1 (PDZ), de se lier à des protéines d'échafaudage telles que la **C**alcium/calmodulin-dependent **S**erine protein **K**inase (CASK), et dont l'interaction favorise la phosphorylation au niveau intracellulaire. Certaines études suggèrent notamment que l'activité phosphorylante de CASK sur les Nrnx serait fondamentale et maximale durant le développement neuronal pour la formation des synapses mais que cette activité diminuerait une fois les synapses développées (Hata et al., 1996; Atasoy et al., 2007; Mukherjee et al., 2008).

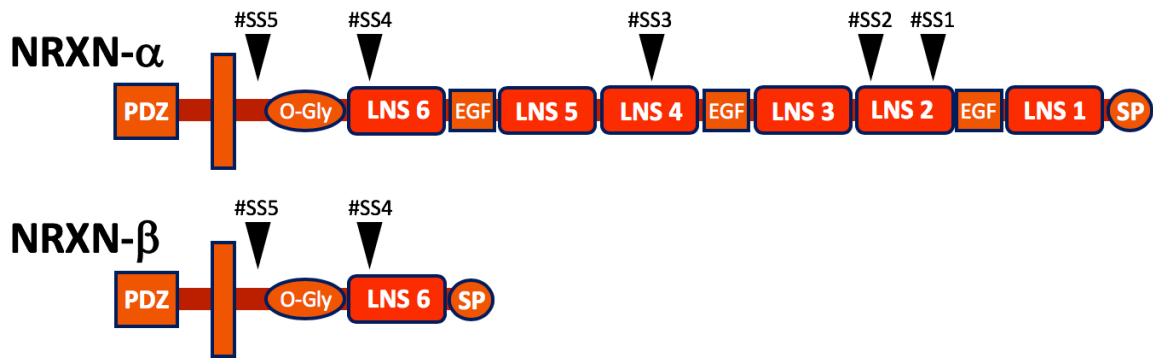


Figure 30 - Représentation schématique de la structure moléculaire des neurexines- α et - β .

6.2.2. Neurexines et synaptogénèse, que savons-nous ?

Les Nrnxn sont maintenant étudiées depuis plus de 30 ans et sont bien connues pour être essentielles à la neurotransmission. Cependant, il n'est pas encore bien établi si les Nrnxns ont un rôle identique à toutes les synapses ou si leur rôle est spécifique à un type de synapse donné. Les principaux travaux qui ont permis de mesurer l'importance des Nrnxns dans la formation des synapses ont été ceux portant sur une délétion (Knock-Out, KO) des gènes encodant les Nrnxns ou suite à une surexpression dans des modèles *in vitro*. Dans cette sous-section nous reviendrons sur les principaux travaux réalisés avec des simple, double ou triple KO pour les gènes encodant les Nrnxns.

Les premières études se sont principalement portées sur des triples KO constitutifs des Nrnxn- α puis des Nrnxn- β . Le triple KO constitutif des Nrnxn- α a révélé que ce dernier n'était pas viable sur le long terme (les animaux ne survivant qu'un ou deux jours après la naissance), suggérant un rôle fondamental des Nrnxn- α dans la neurotransmission. Malgré tout dans cette étude, les auteurs ont rapporté que les animaux P0-P2 avaient une baisse notable de la densité des synapses inhibitrices d'environ 50% alors que le nombre de synapses excitatrices était quant à lui inchangé. L'ultrastructure des synapses KO pour les Nrnxn- α n'a pas montré de différence au niveau de la

taille de la ZA ni au niveau du nombre de vésicules synaptiques par rapport aux synapses des animaux de génotype sauvage. Cependant, les auteurs ont clairement mis en évidence que la fonction synaptique excitatrice et inhibitrice était très affectée dû à une perte de l'influx de Ca^{2+} au niveau présynaptique. Ces travaux ont révélé un couplage fonctionnel entre les Nrnx- α et les canaux calciques intervenant dans le processus d'exocytose (Missler et al., 2003). Du côté des Nrnx- β , un triple KO ne montre aucun changement dans la formation des synapses aussi bien excitatrices qu'inhibitrices. Cependant, des enregistrements électrophysiologiques ont mis en évidence une baisse de la neurotransmission excitatrice au niveau de certaines structures cérébrales (Anderson et al., 2015). À l'inverse des Nrnx- α , la délétion des gènes encodant pour les Nrnx- β s'est révélée être viable sur le long terme. Ceci peut être explicable par la plus faible expression des Nrnx- β au niveau de l'encéphale, en comparaison avec les Nrnx- α (Ullrich et al., 1995). Bien qu'essentiels, ces travaux ne permettent malheureusement pas de comprendre le rôle spécifique de chacune des Nrnx. De ce fait, certaines études se sont aussi portées sur des délétions individuelles. À ce jour, il existe des études complètes pour la Nrnx-1 α , la Nrnx-2 α , la Nrnx-3 α et la Nrnx-3 β mais les populations neuronales ciblées par ces délétions ne sont pas toujours les mêmes, donnant lieu à des conclusions qui ne peuvent être généralisées. Nous savons qu'un KO constitutif de la Nrnx-1 α est viable mais perturbe très fortement la transmission excitatrice au niveau de l'hippocampe de par le couplage fonctionnel avec les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant démontrant une importance majeure pour le fonctionnement des synapses (Etherton et al., 2009). Le KO constitutif de la Nrnx-2 α est également viable mais l'expression de la protéine Munc-18 du complexe SNARE est fortement réduite aboutissant à une baisse importante de la neurotransmission (Dachtler et al., 2014). Quant à la Nrnx-3, une étude au niveau de l'hippocampe a rapporté qu'un KO constitutif des deux isoformes aboutit une réduction forte de la transmission excitatrice médiée par les récepteurs AMPA ainsi qu'un blocage complet de la potentialisation à long terme modulée par les récepteurs NMDA (Aoto et al., 2015). Finalement, un tout nouveau

modèle d'étude permet de réaliser des suppressions conditionnelles de l'ensemble des Nrnx au niveau d'une population neuronale déterminée. Dans cette étude, la première du genre, les auteurs ont réalisé dans un premier temps une délétion de l'ensemble des Nrnx de façon conditionnelle (cKO) au sein des cellules de Purkinje localisées dans le cervelet, puis dans un second temps, au niveau des interneurons exprimant la parvalbumine ou la somatostatine du cortex préfrontal (Chen et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs ont observé plusieurs phénotypes différents en fonction du type de cellules, allant d'une perturbation importante dans la distribution et la fonction des cellules de Purkinje à une très forte baisse du nombre de synapses pour les neurones positifs à la parvalbumine ou alors à une atteinte dans la genèse des potentiels d'actions pour les neurones positifs à la somatostatine (Chen et al., 2017). Ces résultats permettent de se rendre compte de la complexité à déterminer la fonction précise des Nrnx dans la formation, le maintien et la fonction des synapse puisque d'un type cellulaire à un autre les résultats diffèrent.

Une des autres caractéristiques des Nrnx, sans aucun doute la plus fascinante, est leur capacité d'épissage alternatif qui peut aboutir à la formation de centaines de variant. Les Nrnx- α possèdent 5 sites d'épissages alors que les Nrnx- β en possèdent deux. L'un des sites les plus intéressants est le site #SS4 commun entre les Nrnx- α et - β et qui est impliqué dans la régulation des interactions avec les partenaires postsynaptiques comme les Nlgn, LRRTMs ou encore les Cerebellins (Ullrich et al., 1995; Boucard et al., 2005). Dans le tableau ci-dessous, nous avons compiler les spécificités d'interaction des Nrnx en fonction de la présence ou de l'absence du site #SS4. (**Tableau 4**).

	α -Nrxn SS4 ⁺	α -Nrxn Δ SS4	β -Nrxn SS4 ⁺	β -Nrxn Δ SS4
Nlgn 1A	-	+	+	+
Nlgn 1B	-	-	-	+
Nlgn 1AB	-	-	+	+
Nlgn 1Δ	-	-	-	+
Nlgn 2	+	+	+	+
Nlgn 3	-	+	+	+
Nlgn 4	-	+	+	+
Cerebellins	+	-	+	-
LRRTM	-	+	-	+

Tableau 4 - Interactions des Nrxn avec leur partenaire postsynaptique en fonction de la présence ou non du site d'épissage #SS4.

6.2.3. Les neuroligines, caractéristiques et rôle dans la synaptogénèse

Dans la foulée de l'identification des Nrxn, les Nlgn ont été découvertes trois années plus tard par le même laboratoire, celui de Thomas Südhöf. Ces protéines d'adhésion cellulaire sont considérées comme étant les partenaires postsynaptiques par excellence des Nrxns. Lors de leur identification, trois gènes ont été mis en évidence chez les mammifères donnant lieu à trois protéines : la Nlgn-1, Nlgn-2, Nlgn-3 (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996). Au début des années 2000, une quatrième Nlgn a été identifiée et est exprimée aussi bien chez le rongeur que chez l'Homme [Nlgn-4; (Bolliger et al., 2001)].

Tout comme pour les Nrnxns, les différentes protéines Nlgn sont exprimées en fonction du type de synapse (excitatrice ou inhibitrice). La Nlgn-1 est presque exclusivement retrouvée au niveau des synapses excitatrices (Irie et al., 1997; Song et al., 1999; Budreck et al., 2013; Espinosa et al., 2015). La Nlgn-2 est exprimée aux synapses inhibitrices, cholinergiques et dopaminergiques (Graf et al., 2004; Uchigashima et al., 2016) alors que la Nlgn-3 est localisée aussi bien aux synapses excitatrices qu'inhibitrices (Varoqueaux et al., 2004; Varoqueaux et al., 2006; Budreck and Scheiffele, 2007; Pouloupoulos et al., 2009). La structure moléculaire des Nlgns, elle est relativement simple et se résume principalement au niveau extracellulaire à un long domaine nommé **Cholinestérase Like Domain (CLD)** permettant d'interagir notamment avec les partenaires présynaptiques. Au niveau intracellulaire, les Nlgns possèdent un domaine de liaison à la protéine Géphyrine (**Gephyrin Binding Domain ; GBD**) suivi d'un domaine PDZ permettant un lien avec la protéine PSD95 (**Figure 30**).

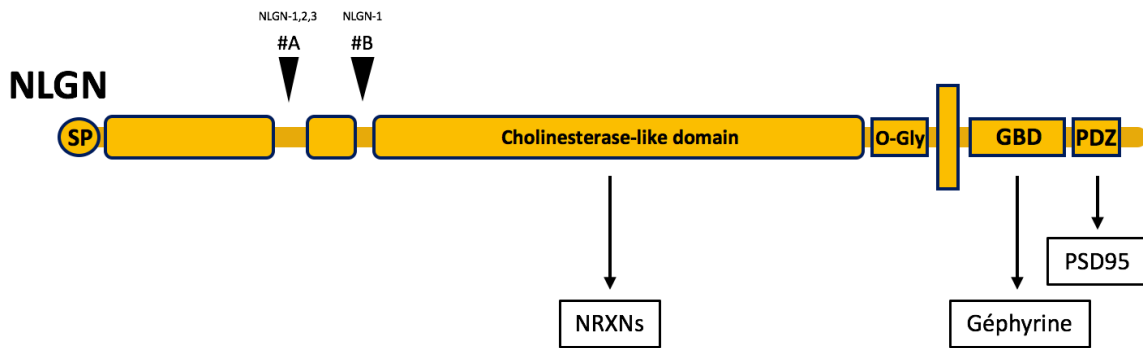


Figure 31 - Représentation schématique de la structure des neuroligines avec les deux sites d'épissages retrouvés sur la Nlgn-1.

Si on s'intéresse de plus près à cette structure moléculaire il est intéressant de noter qu'au niveau intracellulaire, c'est bel et bien l'ensemble des Nlgns qui est doté de ces deux domaines GBD et PDZ. Le domaine GBD permet de lier spécifiquement la géphyrine, une protéine

d'échafaudage localisée exclusivement aux synapses inhibitrices. De même, le domaine PDZ, permet d'interagir avec des protéines d'échafaudages comme PSD95 ou PSD93 localisées spécifiquement au niveau des synapses excitatrices. Avec ces observations il est légitime de s'interroger sur l'adressage des Nlgn au sein des différents types de synapses. En effet, par quel mécanisme la Nlgn-1 se retrouve spécifiquement aux synapses excitatrices alors qu'elle possède un domaine lui permettant d'interagir avec la géphyrine ? Il en est de même pour la Nlgn-2, qui est principalement retrouvée au niveau des synapses inhibitrices alors qu'elle possède un site lui permettant de se lier à PSD95. Un des éléments de réponse se trouve dans une étude publiée en 2013, montrant que le lien préférentiel entre la Nlgn-1 et PSD95 (au détriment de la géphyrine) serait régulé par voie de phosphorylation. En effet, le domaine GBD qui est conservé dans toutes les Nlgns possède une tyrosine en position 782 (Y782) qui lorsque phosphorylée favoriserait l'interaction de la Nlgn-1 avec PSD95. À l'inverse, les auteurs de cette étude ont démontré que la Y782 non-phosphorylée favorisait le lien de la Nlgn-1 avec la géphyrine, ce qui a pour but d'encombrer le site PDZ et donc de le rendre inaccessible pour une interaction avec PSD95. Ces travaux suggèrent ainsi que la balance excitation-inhibition pourrait être en partie régulée par l'état de phosphorylation des Nlgns [**Figure 31**; (Giannone et al., 2013)].

En ce qui concerne le domaine extracellulaire CLD, il semble que ce dernier soit impliqué dans l'induction de la formation des synapses. Brièvement, nous savons que la Nlgn-1 est localisée aux synapses excitatrices et interagit, via PSD95, avec les récepteurs AMPA et NMDA. Quant à la Nlgn-2 elle est localisée aux synapses inhibitrices et interagit, via la géphyrine, avec les récepteurs GABA_A (Poulopoulos et al., 2009). Ainsi, une expérience intéressante utilisant des Nlgns chimériques a mis en avant le rôle prépondérant du domaine CLD dans le recrutement d'éléments permettant l'établissement des synapses. Dans ces travaux les auteurs ont transplanté le domaine extracellulaire de la Nlgn-1 avec la partie intracellulaire de la Nlgn-2 donnant lieu à la Nlgn-1-2 ou inversement, où le domaine extracellulaire de la Nlgn-1 a été transplanté avec le domaine

intracellulaire de la Nlgn-2 aboutissant à la Nlgn-2-1 (**Figure 32**). Cette étude a révélé que la Nlgn-1-2 est capable d'induire le recrutement des récepteurs AMPA/NMDA alors que la Nlgn-2-1 chimérique n'en est pas capable bien que possédant le domaine intracellulaire de la Nlgn-1 (Budreck et al., 2013).

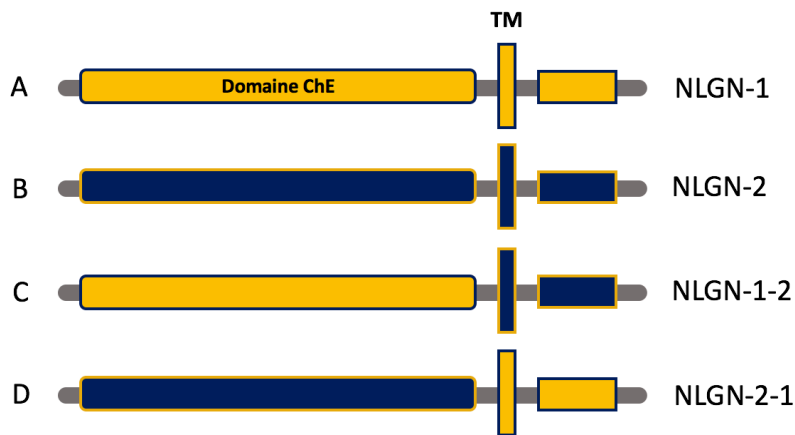


Figure 32. Expérience des neuroligines chimériques démontrant le rôle fondamental du domaine extracellulaire dans l'établissement des synapses.

L'une des explications réside dans les interactions avec les partenaires présynaptiques tels que les Nrnx. En effet plusieurs expériences *in vitro* ont démontré que les protéines impliquées dans l'intégrité de la synapse (ex : bassoon) étaient recrutées bien avant les protéines de structures localisées au niveau du domaine postsynaptique [ex : PSD95 (Irie et al., 1997; Song et al., 1999; Budreck et al., 2013; Espinosa et al., 2015)]

6.2.4. Synaptogénèse et Neuroligines, quel rôle pour chacune d'entre elles ?

Tout comme pour les Nrnx, les expériences qui ont permis de démontrer le rôle fondamental des Nlgns dans la synaptogénèse ont été celles portant sur des simple, double ou triple KO. De plus, les travaux remarquables de Peter Scheiffele sur les synapses artificielles ont permis

de donner aux Nlgn le statut de protéines indispensables à la formation et au bon fonctionnement des synapses. Dans cette partie nous décrierons les travaux les plus importants en lien avec les expériences de délétions des Nlgn et évoquerons quelques travaux *in vitro* obtenus à l'aide du modèle de synapses artificielles.

Pour commencer, une première étude a mis en avant qu'un triple KO constitutif de l'ensemble des Nlgn n'était pas viable sur le long terme, les animaux ne survivant qu'un ou deux jours. Malgré tout, les auteurs ont étudié le cerveau des animaux à P0-P2 et ont observé que la densité synaptique n'était pas affectée aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. De plus, les auteurs n'ont pas observé de différence dans l'ultrastructure des synapses dépourvues de Nlgn et ce en comparaisons avec les animaux de génotype sauvage. Cependant, les études électrophysiologiques ont révélé une diminution de la neurotransmission plus importantes aux synapses excitatrices qu'inhibitrices (Varoqueaux et al., 2006). Ces résultats suggèrent un rôle important des Nlgn dans le fonctionnement des synapses mais curieusement, tout comme pour les Nrxns, les Nlgn semblent avoir une importance plus limitée dans la formation et le maintien des contacts synaptiques. Par la suite, une étude utilisant un triple KO conditionnel des Nlgn au sein des cellules de Purkinje dans le cervelet a révélé une atteinte de la neurotransmission excitatrice et inhibitrice mais pas de diminution majeure dans la densité synaptique (Zhang et al., 2015a). Par la suite, plusieurs études se sont portées sur des délétions individuelles dans le but de mieux comprendre le rôle spécifique de chacune des Nlgn. Ainsi, une délétion constitutive de la Nlgn-1 diminue les réponses associées aux récepteurs NMDA et AMPA mais n'a aucun effet sur les réponses inhibitrices (Chanda et al., 2017). Puis une étude portant spécifiquement sur la délétion de la Nlgn-2 a révélé une diminution des réponses synaptiques inhibitrices mais aucun changement n'a été constaté dans la transmission excitatrice (Chubykin et al., 2007; Pouloupoulos et al., 2009). Finalement une délétion unitaire de la Nlgn-3 semble produire un phénotype plus léger en lien avec la neurotransmission que pour les délétions associées à la Nlgn-1 et à la Nlgn-2. Cependant, des effets intéressants ont été rapporté

au niveau du striatum. Au sein du striatum, les auteurs d'une étude publiée en 2014 ont majoritairement rapporté une modification de l'amplitude des IPSCs évoqués au niveau des MSNs. De plus dans cette même étude, des analyses comportementales ont révélé un phénotype intéressant où les animaux KO pour la Nlgn-3 avaient un comportement stéréotypique exacerbé suggérant un rôle inhibiteur de la Nlgn-3 dans la neurotransmission (Rothwell et al., 2014). Finalement, des études complémentaires à celles réalisées *in vivo*, ont également permis d'étudier le rôle des Nlgn dans la synaptogénèse. Un système *in vitro* particulièrement ingénieux, dit des « synapses artificielles » permet d'évaluer la capacité d'une protéine transynaptique à induire une différenciation présynaptique au niveau de neurones primaires. Le système consiste à la mise en co-culture de neurones avec des cellules non neuronales (par exemple des Human Embryonic Kidney; HEK) exprimant une molécule d'adhésion cellulaire tel que les Nlgn (Scheiffele et al., 2000; Biederer et al., 2002; Fu et al., 2003; Biederer and Scheiffele, 2007; Kwon et al., 2012).

6.2.5. Neurexines et neuroligines, état des connaissances actuelles au niveau du système dopaminergique

Bien que majoritairement non-synaptique, les neurones DAergiques établissent une petite proportion de terminaisons purement synaptiques représentant ~20% de l'ensemble de leurs terminaisons, et dont la plupart co-libèrent du glutamate ou du GABA. Avec l'ensemble des éléments décrit dans la section 6. de cette thèse, il est légitime de se questionner sur le rôle des Nrxns - Nlgn dans la neurotransmission DAergiques. Ainsi, trois questions émergent : **1)** les Nrxns sont-elles exprimées au sein des neurones DAergiques ? si oui, **2)** ont-elles une fonction essentielle dans la formation et le maintien des synapses établies par les neurones DAergiques ? **3)** Qu'en est-il des Nlgn dans la formation des synapses DAergiques ? A ce jour absolument aucune étude n'a étudié le rôle des Nrxns dans la synaptogénèse DAergique. Des expériences de RT-qPCR réalisées

au sein de notre laboratoire ont démontré que l'ensemble des ARNm encodant pour les différentes isoformes étaient bien présent dans les neurones DAergiques de l'ATV et de la SNc suggérant que les Nrns sont présentes aux niveau de certaine terminaisons axonales DAergiques. Quant au rôle des Nlgn dans le développement des synapses DAergiques, il existe une seule étude montrant le rôle prépondérant de la Nlgn-2 (Uchigashima et al., 2016).

6.2.6. Autres protéines transynaptiques

Dans cette section, bien que non étudiées pendant ce doctorat, nous donnerons un bref aperçu des autres protéines transynaptiques potentiellement intéressante pour ce projet de doctorat. Nous reviendrons sur les protéines à tyrosine phosphatases ou Leukocyte common antigen-related receptor protein tyrosine phosphatase (LAR-PTPs) une famille relativement large composée de protéines localisées au niveau présynaptique.

Dans l'ensemble de ces familles protéiques, celle des LAR-PTPs est sans aucun doute la plus intéressante de par la diversité des isoformes qui la compose. On retrouve dans cette famille trois isoformes qui sont LAR, PTP- δ et PTP- σ . Des études précédentes de caractérisation ont démontrés que l'isoforme PTP- σ est spécifiquement retrouvée aux niveau des synapses glutamatergiques alors que les isoformes LAR et PTP- δ sont exprimées aux synapses glutamatergiques et GABAergiques. Les LAR-PTPs ont une structure moléculaire commune comprenant une partie extracellulaire qui se compose de 3 domaines immunoglobulines et de 4 à 8 domaines fibronectines qui donnent la spécificité des interactions avec les partenaires postsynaptiques correspondant (**Figure 33**).

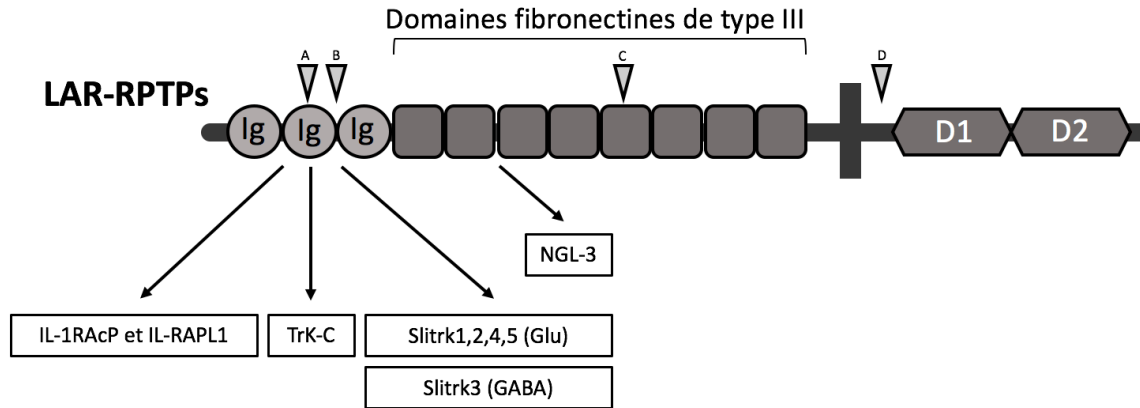


Figure 33 - Structure moléculaire des protéines LAR-RPTPs et leur principales interactions [adapté de (Um and Ko, 2013)].

Les principaux travaux qui ont permis de mesurer l'importance des LAR-PTP dans la formation des synapses ont été ceux portant sur une délétion complète ou partielle des gènes encodant ces protéines. Dans un premier temps, plusieurs études ont démontré le rôle essentiel des LAR-PTPs pour la fonction et la structure des terminaisons présynaptiques (Um and Ko, 2013). En effet, une baisse simultanée de l'expression des 3 isoformes aboutit à une réduction drastique de la densité synaptique (tout type confondu) d'environ 70% (Dunah et al., 2005). À l'inverse, une baisse individuelle des différentes isoformes diminue la densité de synapses excitatrice d'environ 25%. Également, une étude utilisant le système de synapses artificielles a révélé que les 3 isoformes induisent la différenciation présynaptique (Woo et al., 2009; Kwon et al., 2010). Une étude réalisée sur des neurones cholinergiques est tout particulièrement intéressante pour nous puisque la connectivité de ces neurones est majoritairement non-synaptique. Dans cette étude, les auteurs ont réalisé un KO constitutif de la protéine LAR et ont étudié l'innervation du gyrus dentelé par les neurones cholinergiques. Les résultats ont mis en avant que le KO constitutif de cette protéine diminue le nombre et la taille des neurones cholinergiques du cerveau antérieur suggérant un rôle prépondérant dans le développement, notamment dans le guidage et la croissance axonale (Van Lieshout et al., 2001). Finalement, l'ensemble de ces résultats est appuyé par des études *in vitro*

utilisant le système de synapses artificielles et avec lequel une différenciation postsynaptique lorsque des cellules HEK expriment les protéines LAR-PTP (Biederer et al., 2002; Takahashi et al., 2011).

CHAPITRE 2

Problématiques et objectifs de ces travaux de recherche

Au début des années 1970, les travaux de Laurent Descarries et de quelques autres chercheurs tels que Kjell Fuxe ont permis de faire émerger un tout nouveau concept, celui de la transmission volumique ou diffuse. Ce postulat, pour le moins surprenant, faisait suite à l'observation de terminaisons non-synaptiques établis par les neurones monoaminergiques et tout particulièrement par les neurones DAergiques. Cependant très peu d'études se sont intéressées par la suite à l'origine moléculaire et aux implications fonctionnelles de cette double connectivité. Ainsi, cette thèse s'inscrit dans la continuité des travaux pionniers de Laurent Descarries à l'Université de Montréal. Le contexte scientifique décrit dans les sections précédentes soulève quatre grandes questions fondamentales : **1)** La connectivité majoritairement non-synaptique des neurones dopaminergiques est-elle une propriété intrinsèque « cell-autonomous » de ces neurones ? **2)** Existe-il une ou plusieurs différences dans la structure moléculaire entre les terminaisons synaptiques et non-synaptiques établies par les neurones DAergiques ? **3)** Est-ce que l'ensemble de ces terminaisons, synaptiques et non-synaptiques, est fonctionnelle ? **4)** Les protéines transynaptiques classiques telles que les Nrns et les Nlgn ont-elles un rôle dans la formation des synapses excitatrices et inhibitrices établies par les neurones DAergiques ?

Sur la base de ces quatre grandes problématiques, nous avons élaboré plusieurs objectifs pour y répondre. Ainsi, le premier objectif de cette thèse a été de développer un modèle *in vitro* basé sur des cultures primaires de neurones DAergiques. Cela avait pour but d'établir un système fiable et efficace permettant une caractérisation exhaustive de l'arborisation axonale DAergique. Pour ce faire, nous avons utilisé une souris transgénique dans laquelle les neurones DAergiques expriment une protéine fluorescente verte sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (TH-GFP). Par la suite, nous avons pris avantage de la technique d'immunohistochimie associée à la microscopie confocale pour caractériser et quantifier l'expression de protéines telles que VMAT2, Syt-1, TH avec des marqueurs postsynaptiques comme PSD-95, géphyrine ou D2R. En parallèle, nous avons tiré profit de la microscopie électronique à balayage et à transmission pour

visualiser directement ces terminaisons non-synaptiques. Le second objectif a été de déterminer si les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la formation des terminaisons synaptiques et non synaptiques pouvait être différents. Sur la base de la littérature, nous avons ainsi sélectionné certaines protéines clés retrouvées au niveau des ZA telle que RIM1/2 et Bassoon, et en avons quantifié leur expression dans les terminaisons synaptiques et non synaptiques DAergiques. Le troisième objectif de cette thèse de doctorat a été d'étudier la fonctionnalité de l'ensemble ces terminaisons. Pour ce faire, nous avons tiré profit de l'utilisation de la sonde fluorescente FM1-43 permettant de mesurer l'activité d'endocytose et d'exocytose de l'ensemble des terminaisons DAergiques. Finalement, le quatrième et dernier objectif de ce projet a été d'évaluer si des protéines aussi importantes que les Nrxns et les Nlgn ont un rôle prépondérant dans la formation, le maintien et la fonctionnalité des synapses DAergiques. Il s'agit là sans aucun doute de l'objectif le plus ambitieux de cette thèse de doctorat. Pour ce faire et dans un premier temps, nous avons modulé l'expression des Nrxns via une approche utilisant des vecteurs viraux pour en mesurer l'impact sur la proportion de terminaisons synaptiques établies par les neurones DAergiques. Dans un second temps, par l'entremise de synapses artificielles, nous avons évalué la capacité des Nlgn à induire une différenciation présynaptique au niveau des terminaisons DAergiques. Dans une seconde partie du projet, toujours pour ce quatrième objectif, nous avons pris avantage d'un modèle animal totalement inédit où l'expression de l'ensemble des Nrxns a été abolie de façon conditionnelle dans les neurones DAergiques (cKO). Après avoir évalué l'impact de la suppression de l'expression des Nrxns sur le développement des terminaisons DAergiques, nous avons évalué la physiologie de ces terminaisons en utilisant la voltamétrie cyclique ainsi que le patch-clamp associé à l'optogénétique. Finalement, un ensemble de tests comportementaux est venu clôturer l'ensemble de cette thèse de doctorat où la capacité locomotrice des animaux cKO a été évaluée, leur coordination motrice et leur réponse à un psychostimulant.

CHAPITRE 3




Résultats publiés

Article original I

Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals

RESEARCH ARTICLE

Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals

Charles Ducrot^{1,2,3}  | Marie-Josée Bourque^{1,2,3} | Constantin V. L. Delmas⁴ | Anne-Sophie Racine^{1,2,3} | Dainelys Guadarrama Bello⁵ | Benoît Delignat-Lavaud^{1,2,3}  | Matthew Domenic Lycas⁶ | Aurélie Fallon^{7,8,9} | Charlotte Michaud-Tardif^{1,2,3} | Samuel Burke Nanni^{1,2,3} | Freja Herborg⁶ | Ulrik Gether⁶ | Antonio Nanci⁵ | Hideto Takahashi^{7,8,9} | Martin Parent⁴ | Louis-Eric Trudeau^{1,2,3} 

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

²Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³CNS Research Group (GRSNC), Montréal, QC, Canada

⁴Department of Psychiatry and Neurosciences, Faculty of Medicine, CERVO Brain Research Centre, Université Laval, Québec, QC, Canada

⁵Department of Neuroscience, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

⁶Department of Stomatology, Faculty of Dental Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁷Synapse Development and Plasticity Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁸Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁹Integrated Program in Neuroscience, McGill University, Montréal, QC, Canada

Correspondence

Louis-Eric Trudeau, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.
 Email: louis-eric.trudeau@umontreal.ca

Funding information

Gouvernement du Canada | Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Grant/Award Number: MOP106556, MOP153068 and PJT159588; Lundbeckfonden (Lundbeck Foundation), Grant/Award Number: 2018-792, 2017-4331, 2016-3154, 2017-4331 and 2016-3154; Krembil Foundation; Fondation Brain Canada (Brain Canada); Henry and Berenice Kaufmann Foundation; Parkinson Canada

Abstract

Chemical neurotransmission typically occurs through synapses. Previous ultrastructural examinations of monoamine neuron axon terminals often failed to identify a pre- and postsynaptic coupling, leading to the concept of “volume” transmission. Whether this results from intrinsic properties of these neurons remains undefined. We find that dopaminergic neurons *in vitro* establish a distinctive axonal arbor compared to glutamatergic or GABAergic neurons in both size and propensity of terminals to avoid direct contact with target neurons. While most dopaminergic varicosities are active and contain exocytosis proteins like synaptotagmin 1, only ~20% of these are synaptic. The active zone protein bassoon was found to be enriched in dopaminergic terminals that are in proximity to a target cell. Finally, we found that the proteins neurexin-1^{SS4-} and neuroligin-1^{A+B} play a critical role in the formation of synapses by dopamine

Abbreviations: D2R, D2 type dopamine receptor; DA, dopamine; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DIV, days *in vitro*; DS, dorsal striatum; dSTORM, stochastic optical reconstruction microscopy; FACS, fluorescence-activated cell sorting; hSYN, human synapsin; NA, numeric aperture; NL-1, neuroligin 1; Nrxn, neurexin; OB, olfactory bulb; PFA, paraformaldehyde; PFC, prefrontal cortex; PSD, postsynaptic density; ROI, region of interest; SEM, scanning electron microscopy; SNc, substantia nigra pars compacta; Syt1, synaptotagmin 1; TEM, transmission electron microscopy; TH, tyrosine hydroxylase; VGluT1, type 1 vesicular glutamate transporter; VGluT2, type 2 vesicular glutamate transporter; VMAT2, vesicular monoamine transporter 2; VTA, ventral tegmental area.

© 2021 Federation of American Societies for Experimental Biology

(DA) neurons. Our findings suggest that DA neurons are endowed with a distinctive developmental connectivity program.

KEYWORDS

active zone, axon terminals, dopamine, exocytosis, synapse, volume transmission

1 | INTRODUCTION

Chemical synaptic neurotransmission in the central nervous system, such as found at glutamate and GABA synapses, is typically a fast and efficient process, with a delay between presynaptic action potential and postsynaptic activation of ionotropic receptors below 1 ms. In keeping with this fast kinetic, classical ultrastructural examination of synapses with electron microscopes has revealed that pre- and postsynaptic elements are typically in close juxtaposition, only separated by a narrow synaptic cleft of less than 50 nm. At these synapses, the release of neurotransmitter is due to the docking and fusion of vesicles to the presynaptic membrane through a mechanism triggered by Ca^{2+} influx into the presynaptic terminal, activation of the Ca^{2+} sensor synaptotagmin 1 (Syt1),¹ and recruitment of soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex proteins (for review, see Ref. [2]). Docking and fusion of synaptic vesicles occurs at domains called active zones, that contain scaffolding proteins including bassoon, RIM1/2, and ELKS.³ The identity of the proteins that are necessary and sufficient to establish the tight pre- and postsynaptic configuration of synapses is still unclear. However, synapses are regulated by transsynaptic proteins including neurexins (Nrxns) and neuroligins (NLs). The NL family comprises postsynaptic adhesion molecules that form transsynaptic contacts with presynaptic Nrxns.⁴⁻⁹

The axonal connectivity of the dopamine (DA) system is particularly intriguing due to the hyperdense nature of its axonal arbor, containing a very large number of release sites, and to the ability of some of these neurons to release glutamate and GABA at a small subset of these.¹⁰⁻¹⁶ Strikingly, ultrastructural examination of the axon terminals established by monoamine and cholinergic neurons in the central nervous system of rodents, primates, and humans failed to identify a tight pre- and postsynaptic coupling at most release sites, giving rise to the concept of “diffuse” or “volume” transmission, whereby neurotransmitter release from non-synaptic axon terminals leads to the activation of metabotropic receptors on target cells located at a distance, within a sphere of a few tens of microns.¹⁷⁻²⁴

The molecular mechanisms determining the ability of DA neurons to establish synaptic and non-synaptic terminals are presently unknown. Midbrain DA neurons from the ventral tegmental area (VTA) project to the ventral

Significance statement

In the present study, we provide new evidence highlighting the unique ability of dopamine (DA) neurons to establish a very large and heterogeneous axonal arbor with terminals that, in striking contrast with glutamate and GABA neurons, actively avoid contact with target cells. Most synaptic and non-synaptic terminals contain exocytosis proteins and show activity-dependent vesicular cycling. Furthermore, we find that $\text{NL-1}^{\text{A+B}}$ and $\text{Nrxn-1}\alpha^{\text{SS4-}}$ play a critical role in the formation of synapses by DA neurons. Our findings suggest that DA neurons are endowed with a distinctive developmental connectivity program.

striatum (VS) and to the prefrontal cortex (PFC), whereas DA neurons from the substantia nigra (SNc) project densely to the dorsal striatum (DS).^{12,25,26} The striatum is also densely innervated by glutamate neurons from the cortex and thalamus that are thought to establish purely synaptic contacts. Interestingly, the formation of excitatory glutamate synapses is mainly regulated by the presynaptic protein Nrxn-1 and the postsynaptic protein NL-1,^{8,9,27-30} raising the hypothesis that the small subset of synaptic terminals established by DA neurons also depends on this pair of transsynaptic proteins.

Here we developed an *in vitro* primary coculture system to test the hypothesis that DA neurons are characterized by an intrinsic and distinctive propensity to establish an axonal arbor with limited synaptic connectivity with striatal neurons. With this system, comparing DA neurons with cortical and striatal neurons, we confirm the unique ability of DA neurons to develop a majority (~80%) of non-synaptic terminals. Strikingly, non-synaptic axonal varicosities were found to be distinctive from the small subset of synaptic terminals in that most of them lack the active zone scaffolding proteins bassoon and RIM1/2. The majority (~80%) of both synaptic and non-synaptic varicosities were found to be functional. Finally, using an artificial synapse formation assay, we found that $\text{NL-1}^{\text{A+B}}$ and $\text{Nrxn-1}\alpha^{\text{SS4-}}$ play a critical role in the formation of synapses by DA neurons.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | 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 12-hours light/dark cycle with food water available ad libitum.

2.2 | Primary neuronal co-cultures

Primary VTA and SNc DA neurons (60 000 cells/mL) were prepared from transgenic mice expressing the green fluorescent protein (GFP) gene in catecholamine neurons under control of the tyrosine hydroxylase (TH) promoter (TH-GFP mice³¹) and placed in coculture with VS or DS neurons (60 000 cells/mL), respectively, prepared from C57BL/6J mice or from transgenic mice expressing the GFP protein fused to the DA D2 receptor (D2R) (D2R knock-in mice, GFP-D2³²). Depending on the experiment, mesencephalic DA neurons from TH-GFP mice were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) as previously described.³³ Primary cultures of olfactory bulb (OB) DA neurons from TH-GFP mice were also prepared. As a point of comparison with DA neurons, we also prepared primary cultures of cortical glutamatergic neurons from C57BL/6J mice and dorsal striatal neurons from transgenic mice expressing GFP in neurons containing the DA D2 receptor (D2-GFP; 120 000 cells/mL).^{32,34} For artificial synapse coculture assays with HEK293T cells, primary VTA and SNc DA neurons were prepared from transgenic mice conditionally expressing the red fluorescent protein tdTomato in DA neurons (DATcre-AI9 mice). For all experiments, postnatal day 0-3 (P0-P3) mice were cryoanesthetized, decapitated, and used for cocultures and cultures according to a previously described protocol.³⁵

2.3 | Immunocytochemistry on cell cultures

Cultures were fixed at 14 DIV with 4% paraformaldehyde (PFA; in PBS, pH 7.4), permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 20-minutes, and nonspecific binding sites were blocked with 10% bovine serum albumin during 10 minutes. Primary antibodies were as follows: chicken anti-GFP (1:2000, Aves Laboratories), rabbit anti-RFP (1:1000, Rockland Immunochemicals), mouse anti-TH (1:2000,

Millipore), rabbit anti-Syt1 (1:1000, Synaptic Systems), rabbit anti-VMAT2 (1:4000, gift of Dr Gary Miller, Colombia University), mouse anti-MAP2 (1:2000; Millipore), guinea pig anti-VGluT1 (1:4000, Abcam), and mouse anti-HA (1:500; Roche). To improve the immunoreactivity of some synaptic markers, a set of cultures were fixed with 4% PFA together with 4% sucrose, in PBS without potassium (pH 7.4). This was the case for experiments with the following primary antibodies: mouse anti-PSD-95 (1:1000 Pierce antibody), mouse anti-gephyrin (1:1000, Synaptic Systems), guinea pig anti-bassoon (1:1000, Synaptic Systems), rabbit anti-RIM-1/2 (1:1000, Synaptic Systems). These were subsequently detected using Alexa Fluor-488-conjugated, Alexa Fluor-546-conjugated, Alexa Fluor-568-conjugated and Alexa Fluor-647-conjugated secondary antibodies (1:500, Invitrogen).

2.4 | Image acquisition with confocal microscopy

All in vitro fluorescence imaging quantification analyses were performed on images acquired using an Olympus Fluoview FV1000 point-scanning confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Images were scanned sequentially to prevent nonspecific bleed-through signal using 488, 546, and 647-nm laser excitation and a 60X (NA 1.42) oil immersion objective.

2.5 | Image analysis

All image quantification was performed using ImageJ (National Institute of Health, NIH) software. A background correction was first applied at the same level for every image analyzed before any quantification. A macro developed in-house was used to perform all quantifications except the bassoon distribution analysis, performed with the 3D ROI Manager plugin.

2.6 | FM1-43 loading and destaining

To quantify if DAergic terminals were capable of activity-dependent neurotransmitter release and vesicular cycling, we used the FM1-43 dye (Thermo Fisher Scientific). FM1-43 release in response to KCl depolarization (40 mM) was monitored by time-lapse imaging using an epifluorescence microscope (Nikon TE2000) equipped with a Hamamatsu flash camera. FM1-43-labeled terminals were imaged using blue light 488-nm excitation and a 520-nm bandpass emission filter. High KCl-induced destaining of FM1-43 was performed by switching the

perfusion solution (containing in mM: NaCl, 140; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glucose, 10; sucrose, 6) to a saline solution containing 40 mM KCl for 2 minutes. Images were acquired every 15 seconds, with a 450-ms exposure time using a 100× 1.30 numeric aperture (NA) oil objective (Olympus, Tokyo, Japan). After each recording, coverslips were fixed with 4% PFA and stained for GFP, Syt1, and VMAT2 to confirm that the experiment was performed exclusively on axonal varicosities established by DA neurons. GFP terminals positive for Syt1 or VMAT2 were considered as potential DA neuron release sites and included in the analysis. GFP terminals negative for Syt1 or VMAT2 were considered as potentially noncompetent and excluded from the analysis. With the ImageJ software, a region of interest (ROI) was created for each GFP varicosity positive for Syt1 to quantify signal intensity during the time-lapse. The GFP signal was subtracted from each picture to keep only the FM1-43 signal. Axonal varicosities established by GFP-positive neurons were considered FM1-43 positive when their fluorescence intensity was twofold greater than the background signal. We measured FM1-43 fluorescence level before and after KCl depolarization for each GFP varicosity positive for Syt1 or VMAT2. Only puncta destaining by more than 20% were considered as active varicosities. For all data presented, at least five coverslips were analyzed from VTA DA neurons and six coverslips from SNc DA neurons. Each coverslip was only used for one experiment.

2.7 | Scanning electron microscopy

Neurons were cultured on titanium disks, according to the methods previously described,³⁶ at a cell density of 60 000 cells/mL. After a period of 14 DIV, cells were fixed for 30 minutes at 4°C in 0.5% glutaraldehyde (EMS, Hatfield, USA). The characterization of cell morphology was carried out in a JEOL JSM-7400F (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) field emission scanning electron microscope (FE-SEM) operated at 2 kV. Commercially pure grade II titanium disks (Firmetal Co., Ltd., Shanghai, China) of approximately 12 mm diameter and 2 mm thickness were polished, sonicated in distilled water and air-dried. Before seeding the cells, disks were sterilized using 70% ethanol and UV light. Following glutaraldehyde fixation, samples were rinsed three times with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), and postfixed for 1 hour in 1% osmium tetroxide at 4°C. The cells were then dehydrated through a graded ethanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 95%, and two times 100%; 15 minutes each) followed by critical point drying using a Leica EM CPD300 (Leica EM, Morrisville, USA).

2.8 | Transmission electron microscopy

Cells were cultured in a Lab-Tek II permanox chamber slide system (Thermo Fisher) at 240 000 cells/mL (120 000 cells/mL from VTA or SNc with 120 000 cells/mL from ventral striatum or dorsal striatum). Cells were fixed at 14 DIV for 1 hour in 1% glutaraldehyde (EMS, Hatfield, USA) diluted in 0.1 M cacodylate buffer. To identify specifically the ultrastructure of DA varicosities we performed a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) immunostaining against GFP protein. Sections were first rinsed in 0.1 M cacodylate, then in 0.1 M cacodylate + 30% H₂O₂ for 10 minutes. Neurons were then rinsed three times in 0.1 M cacodylate and then incubated in rabbit GFP antibody (1:2000; Abcam) for 24 hours at RT. After rinsing in 0.1 M cacodylate (3X for 10 minutes), neurons were incubated for 3 hours at RT in biotin-streptavidin-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (1:200; Jackson Immunoresearch), washed three times with 0.1 M cacodylate and then incubated for 3 hours at RT in streptavidin HRP conjugate (1:200; GE Healthcare). Cultures were visualized after a 90-seconds DAB (Sigma-Aldrich)/glucose oxidase reaction. Next, cells were incubated in osmium solution with potassium ferrocyanide for 1 hour (2% each) and rinsed with distilled water (3X for 10 minutes). Cells were dehydrated through an ethanol series (two times 30%, 50%, 70%, 90%, 95%, and two times 100%; 10 minutes each) and embedded in Durcupan ACM resin. Neurons were incubated in a solution containing 50% of Durcupan ACM resin (Component A, 48.78%; Component B, 48.78%; Component C, 1.46%; and Component D, 0.98%) and 50% of pure ethanol for 1 hour. Cells were then incubated in pure solution of Durcupan ACM resin overnight at room temperature. Then, 12 hours later, cells were incubated at 60°C for 48 hours allowing polymerization of the resin. After being glued, samples were unmolded and cut at 80 nm with an ultramicrotome (model EM UC7, Leica). Ultrathin sections were collected on bare 150 mesh per inch copper grids, stained with lead citrate, and examined with a transmission electron microscope (Tecnaei 12; Philips Electronic, 100 kV) and an integrated digital camera (XR41, Advanced Microscopy Techniques).

2.9 | Stochastic optical reconstruction microscopy

Cultures were fixed for 30 minutes in 4% PFA and washed with 0.1 M PBS (3 × 5 minutes). Following permeabilization with 0.1% Triton for 20 minutes, primary antibodies for GFP and PSD-95 were applied for 1 hour. Stochastic

optical reconstruction microscopy (dSTORM) imaging was performed, essentially as described in,^{37,38} using a Nikon N-STORM system. Imaging was carried out in a buffer containing 10% (w/v) glucose, 1% (v/v) beta-mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM NaCl, 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ catalase, and 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ glucose oxidase. Two-color dSTORM images of synaptic and non-synaptic DAergic varicosities were acquired by labeling cultured mesencephalic neurons derived from TH-GFP mice. GFP was labeled with CF568 and PSD-95 with Alexa Fluor-647. During image acquisition, the 561-nm and 647-nm lasers were held constant at 0.6 and 1.1 kW cm^{-2} , respectively, while a 405-nm laser was gradually increased to $<0.1 \text{ kW cm}^{-2}$ to switch on only a fraction of the fluorophores to give an optically resolvable set of active fluorophores. For each image, 20 000 cycles of one frame of 561-nm laser activation followed by one frame of 647-nm laser were acquired at a rate of 16 Hz per cycle. Localizations were fit with fit3Dc-spline and drift was corrected for with redundant cross correlation as previously described.^{38,39} Localization and visualization of single particle were done as previously published.⁴⁰

2.10 | Construction of expression vectors

The NL expression vector contained cDNA encoding the mature form of full length of Human NL-1 with splice inserts A and B with an added extracellularly HA-tagged, under control of a cytomegalovirus enhancer fused to the chicken beta-actin (CAG) promoter in a pcDNA3 vector. The extracellular HA-tagged CD4 control construct was expressed from a CMV promoter, also in a pcDNA3 vector. The plasmid encoding ECFP-tagged ectodomains of mouse *Nrxn-1 α* (splice variant SS4-) under control of a CMV promoter in a pECFP-N1 vector was obtained from Dr Ann-Marie Craig (University of British Columbia). To overexpress *Nrxn-1 α* ^{SS4-} specifically in neurons, the CMV promoter was excised and replaced by the human synapsin (hSYN) promoter. The ECFP tag was also replaced by DsRED2. The sequence of all plasmids was verified by Sanger sequencing. For overexpression of *Nrxn-1 α* ^{SS4-}, a plasmid containing the full sequence of *Nrxn-1 α* ^{SS4-} was packaged into a lentiviral vector under control of the CMV promoter (Viral core, Université Laval, Qc, Canada). For these experiments, primary DA neuron cocultures were infected 3 days after plating. Cells were then fixed and immunolabeled at 14 DIV. For mitochondrial network quantification, mitochondria were labeled by infecting neurons with an adeno-associated virus encoding Mito-RoGFP (mitochondrial targeted green fluorescent protein) at 3 DIV and fixed at 14 DIV.

2.11 | Artificial synapse formation assay

Artificial synapse formation assays were performed using HEK293T cell line as described previously.⁴¹ HEK293T cells were maintained in DMEM supplemented with FBS and penicillin/streptomycin and transfected using TransIT-LT1 (Mirus Bio. LLC) with the plasmid containing the sequence of NL-1 or CD4 and incubated overnight at 37°C. HEK293T cells were trypsinized (0.05%), washed, and then cocultured (30 000 cells/mL) with VTA or SNc DA neurons (120 000 cells/mL) from P0-P3 DATcre-AI9 pups at 9 DIV. HEK293T cells were also cocultured (30 000 cells/mL) with cortical neurons (120 000 cells/mL) as a positive control for the artificial synapse formation assay. Cocultures were fixed 24 hours later (10 DIV) with 4% PFA for 30 minutes, followed by permeabilization with 0.1% Triton for 20 minutes and incubation with blocking solution (5% BSA) for 10 minutes. Immunolabeling was performed as described previously.

2.12 | Reverse transcriptase-quantitative PCR

We used RT-qPCR to quantify the amount of mRNA encoding *Nrxn-1 β* and *Nrxn-1 α* and to validate the overexpression of *Nrxn-1 α* in primary neurons. The calculation of relative mRNA levels was performed by using the $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ formula.⁴² Coverslips containing neurons were trypsinized (2.5%) at 14 DIV and then RNA extraction was performed with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of the RNA from DA neurons were determined using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA USA). Total purified RNA (40 ng) was reverse-transcribed in a total of 20 μL including 1 μL of dNTP, 1 μL of random hexamer, 4 μL of 5X buffer, 2 μL of dithiothreitol (DTT), 1 μL of RNaseOUT, and 1 μL of the Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase enzyme (MML-V). Quantitative PCR was carried out in a total of 15 μL consisting of 3 μL cDNA, 7.5 μL SYBER green PCR master mix (Quanta Biosciences), 10 μM of each primer, completed up to 15 μL with RNA-free water. qPCR was performed on a LightCycler 96 machine (Roche) using the following procedure: 10 minutes at 95°C; 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 40 seconds at 57°C, and 40 seconds at 72°C; and 1 cycle of 15 seconds at 95°C, 15 s at 55°C, and 15 seconds at 95°C. Results were analyzed with LightCycler 96 software and Excel. The efficiency of the reaction ($E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$) was calculated from the slope of the linear relationship between the log values of the RNA quantity and the cycle number (Ct) in

a standard curve. The calculation of relative mRNA levels was performed by using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ formula, where the Ct value of the mRNA level for *Nrxn-1 α* was normalized

to the Ct value of *GAPDH* in the same sample. Ct values used were the mean of duplicate repeats. Melt curves of tissue homogenate indicated specific products after

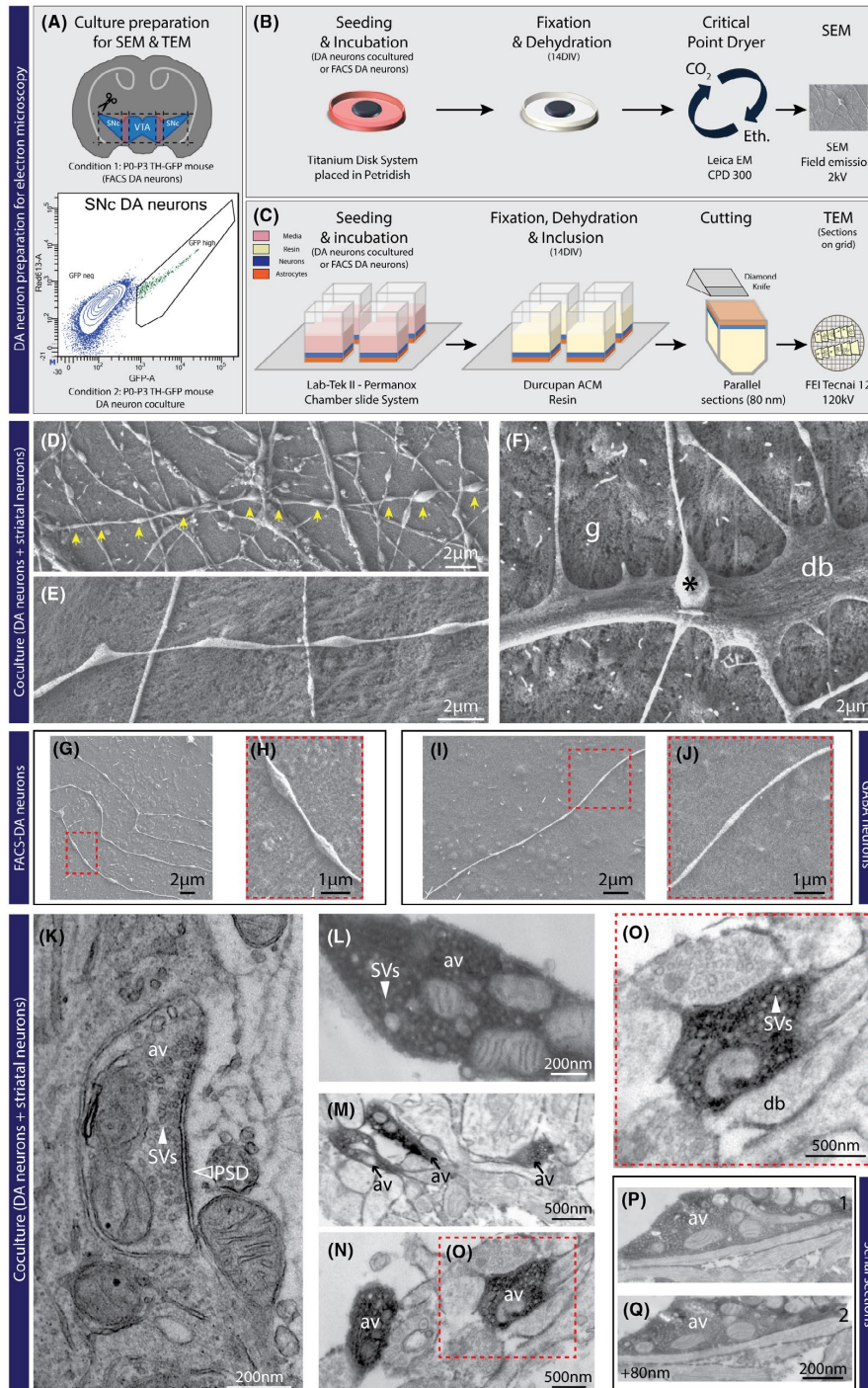


FIGURE 1 Ultrastructural evidence for functional non-synaptic terminals established by DA neurons. A, Schematic representation of the midbrain dissection. The dashed lines represent the parts used to prepare the primary VTA and SNc neuron cultures. The red rectangles represent parts that were excluded. FACS plot showing that cells were selected based on a high level of GFP signal. B and C, Schematic representation for SEM and TEM experiments (see Materials And Methods for details). D and E, Electron micrographs from SEM showing free varicosities (yellow arrows) established by VTA neurons cocultured with ventral striatal neurons. F, Electron micrograph from SEM showing a direct apposition between a terminal (*) and a dendrite (d), in close interaction with glial cells (g). G and H, Electron micrographs from SEM showing non-synaptic DA varicosities from FACS-purified DA neurons. I and J, SEM image from an axonal field of a GABA neuron showing the absence of free varicosities compared to DA neurons. K, Electron micrograph from TEM showing a synaptic terminal established by a non-DA neuron, associated with a PSD domain (black arrow) and filled with synaptic vesicles (SVs). L, Electron micrograph from TEM showing a TH immunoreactive varicosity containing a substantial pool of vesicles (see white arrow) and a cluster of four mitochondria. M and N, Electron micrographs from TEM showing GFP immunoreactive non-synaptic DAergic axonal varicosities (AV) established by VTA DA neurons cocultured with ventral striatal neurons. O, Electron micrograph from TEM. P and Q, Series of two consecutive ultrathin sections across a GFP immunoreactive non-synaptic DAergic varicosity established by a VTA DA neuron cocultured with ventral striatal neurons. Observations for TEM and SEM were performed by sampling multiple fields from two and three independent neuronal cocultures, respectively

Nrxn-1 α qPCR mRNA amplification, attesting of the adequate quality of the primers chosen. Primer sequences for Nrxn-1 α and Nrxn-1 β were obtained from the Sudh \ddot{o} f Lab and primers for GAPDH were designed with the Primers 3 and Vector NTI software. Primers were synthesized by Alpha DNA (Montreal, QC). Primers for qPCR were as follows: Nrxn-1 α : 5' CAACACAAATCACTGCGGG 3' and 5' TTCAAGTCCACAGATGCCAG 3'; Nrxn-1 β 3' TTGCAA TCTACAGTCCACCAG 5' and 3' CCTGTCTGCTGTGT ACTG 5'; GAPDH 5' GGAGGAAACCTGCCAAGTATGA 3' and 5' TGAAGTCGCAGGAGACAACC 3'. Primers were tested by comparing primers sequences to the nucleotide sequence database in GenBank using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.13 | Experimental design and statistical analyses

Data were always obtained from three separate sets of experiments and presented as mean \pm standard error of mean (SEM). The level of statistical significance was established at $P < .05$ in one-way ANOVAs and two-tailed t tests, performed with Prism 6 software (GraphPad, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$).

3 | RESULTS

3.1 | Dopaminergic neurons in vitro establish mostly non-synaptic terminals

Previous work using transmission electron microscopy (TEM) demonstrated that in the intact rodent brain, the axon terminals of DA neurons in the striatum are only rarely found in synaptic contact with target cells, the directly apposed cellular membrane being typically devoid of a postsynaptic density (PSD).⁴³ Whether this represents

an intrinsic property of mesencephalic DA neurons or requires complex signals received in vivo during development is unknown. To begin exploring this key question, we first used scanning electron microscopy (SEM) to visualize the external morphology of axonal varicosities in cocultures of VTA or SNc DA neurons, obtained from TH-GFP transgenic mice, growing with VS or DS neurons, respectively, as well as astrocytes. Neurons were grown on surface-optimized titanium disks and examined by SEM after 14 days (Figure 1A,B). We observed that in such cultures, some of the neurons, likely DAergic, established a complex array of oblong axonal varicosities in close contact with the underlying astrocytes, but without direct contact with dendrites or neuronal cell bodies (Figure 1D,E). These varicosities have an average length of 1.4 μ m with an average inter-varicose interval of 2.6 μ m, highlighting the high density of varicosities along the axon (Figure 1D). We found that only a very small contingent of varicosities along such axons established synaptic-like contacts with neuronal dendrites (Figure 1F). Globally in these cocultures, only a small subset of neurons developed axonal arbors with a majority of non-synaptic contacts, in line with the typical proportion of DA neurons in such cultures. To confirm that this apparently non-synaptic connectivity originated from DA neurons, we prepared a second set of cultures in which FACS-purified DA neurons were grown without striatal neurons. In such monocultures, we observed a large predominance of free axonal varicosities (Figure 1G,H), confirming that DA neurons have an intrinsic propensity to develop a large and complex axonal arbor, with most varicosities being non-synaptic. As a point of comparison, we also examined striatal cultures, containing more than 95% GABAergic medium spiny neurons. In this system, we found a large predominance of axonal varicosities establishing synaptic-like contacts, with most axons being non-varicose and containing only a small subset of free axonal varicosities (Figure 1I,J). Although accounting for less than 5% of striatal neurons, some of these free

varicosities could also originate from the axons of striatal cholinergic neurons, previously reported to also establish mostly non-synaptic terminals in the striatum.²¹

We then used TEM (Figure 1C) to visualize the internal organization of axonal varicosities in cocultures of VTA or SNc DA neurons, growing with VS or DS neurons, respectively, on astrocytes. Using DAB, we performed

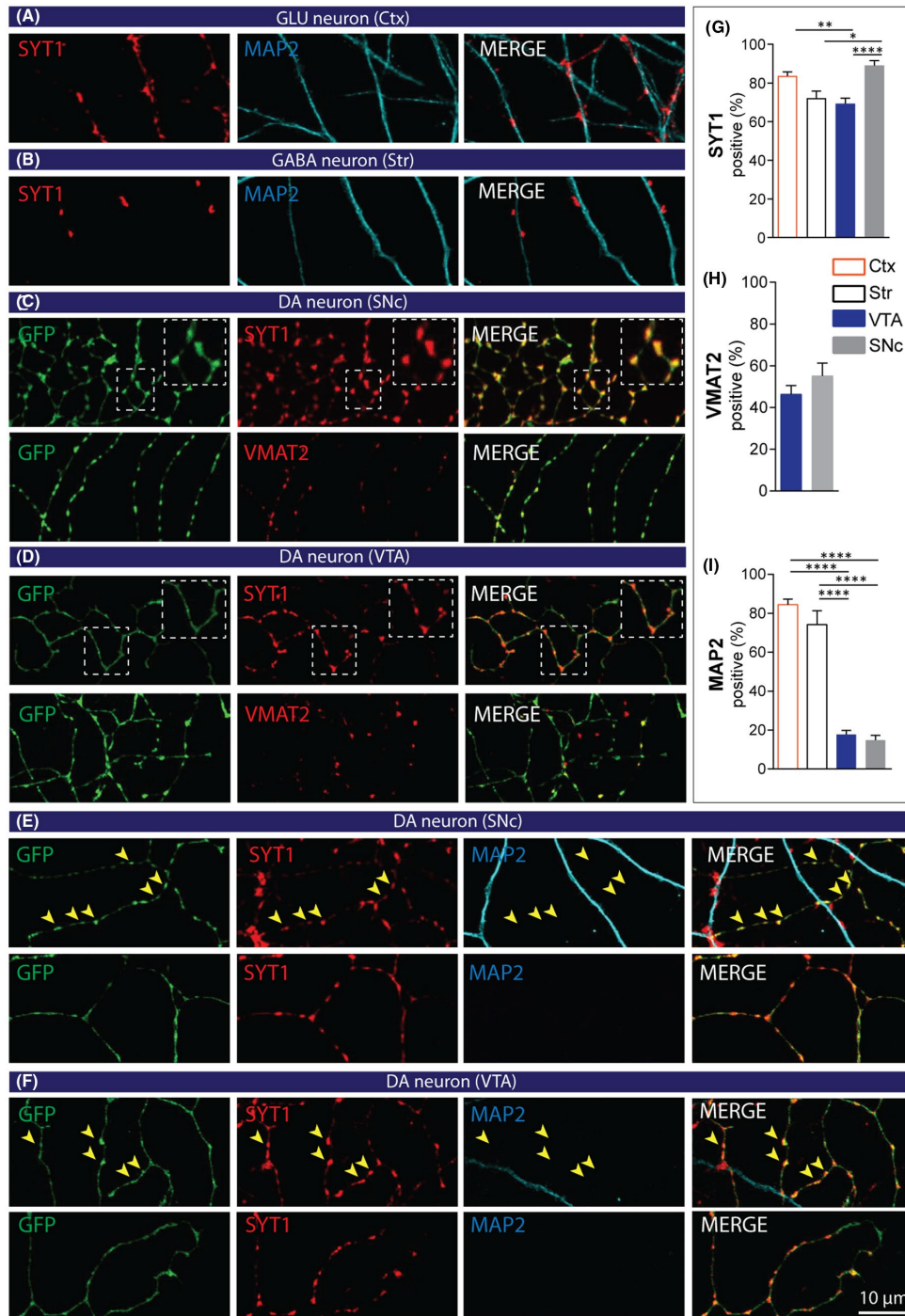


FIGURE 2 Dopaminergic neurons establish a majority of axon terminals that are not in contact with target cells. A, Photomicrographs illustrating Syt1-positive terminals established by a glutamatergic (GLU) neuron in a cortex-striatum coculture, in contact with a MAP2-positive dendritic process from a target cell. B, Photomicrographs illustrating Syt1-positive terminals established by a GABAergic striatal neuron in contact with a MAP2-positive dendrite from a target cell. C, Photomicrographs illustrating GFP-positive axonal varicosities established by a SNc DA neuron, that contain Syt1 (upper panel) or VMAT2 (lower panel). D, Photomicrographs illustrating GFP-positive axonal varicosities established by a VTA DA neuron, that contain Syt1 (upper panel) or VMAT2 (lower panel). E, Photomicrographs illustrating GFP terminals positive for Syt1 established by a SNc DAergic neuron in coculture with striatal neurons, in a field with (upper panel) or without any target cell (lower panel). F, Photomicrographs illustrating GFP terminals positive for Syt1 established by a VTA DAergic neuron in coculture with striatal neurons, in a field with (upper panel) or without any target cell (lower panel). G, Bar graph representing the quantification of the proportion (%) of GFP-positive varicosities that co-express Syt1 for both VTA and SNc DA neurons and compared to glutamatergic and GABAergic neurons from cortex and striatum, respectively. The graphs represent the mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. H, Bar graph representing the quantification of the proportion (%) of GFP-positive varicosities established by VTA and SNc DA neurons that co-express VMAT2. I - Bar graph representing the proportion of Syt1 varicosities established by VTA or SNc DAergic neurons that are in close proximity to MAP2-positive dendrites, compared to glutamatergic and GABAergic neurons from cortex and striatum, respectively. The graphs represent the mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. For all analyses, the data represent the mean \pm SEM, $n = 19-49$ neurons from a minimum of two independent neuronal cocultures. The number of observations represents the number of fields from individual neurons examined

immunostaining against GFP to distinguish DA and non-DA terminals. In our in vitro system, we easily found DAB-negative synaptic terminals, identified by the presence of a postsynaptic domain as illustrated in Figure 1K. We then identified multiple sets of DAergic terminals, all filled with large pools of synaptic vesicles, arguing that they possess the capacity to package and release neurotransmitters (Figure 1L-N). However, none were found in close proximity to a postsynaptic domain, revealing the asynaptic nature of DAergic terminals (Figure 1O). Due to the possibility that some of these terminals may show a postsynaptic domain in another plane of the varicosity, we searched for the same axon varicosity on different ultrathin sections. Even in such case, no postsynaptic domains were observed in close proximity to DAergic terminals (Figure 1P,Q).

3.2 | Non-synaptic dopaminergic axonal varicosities express distinct sets of presynaptic markers and appear to actively avoid target cells

Although SEM and TEM analyses revealed the non-synaptic nature of DAergic axonal varicosities, it was unclear if all such morphologically identified varicosities represented actual axon terminals endowed with the molecular machinery required for neurotransmitter release. We next used immunocytochemistry coupled to confocal microscopy to examine the axonal varicosities established by DA neurons from TH-GFP mice. We compared these to axonal varicosities established by glutamate neurons from cortex (Figure 2A) and by GABA neurons from the striatum (Figure 2B), two populations of neurons well known to be synaptic in their mode of connectivity. The ubiquitous exocytosis Ca^{2+} sensor Syt1 was found in most

axonal varicosities. However, the extent of colocalization of terminals with Syt1 varied across neuronal subtypes [main effect of region, $F(3, 168) = 11.72$, $P < .0001$] and was higher in SNc DA neurons compared to VTA DA neurons (Tukey's multiple comparisons test, SNc vs VTA, $P < .0001$). Indeed, double labeling for GFP, to visualize all varicosities and Syt1, we found that $89.0 \pm 2.5\%$ of varicosities established by SNc DA neurons were positive for Syt1 (Figure 2C,D,G). This proportion was slightly but significantly smaller for VTA DA neurons ($69.3 \pm 2.8\%$) in comparison to SNc DA neurons (Figure 2G). In comparison, $83.58 \pm 2.15\%$ of cortical glutamatergic terminals, identified by the presence of the type 1 vesicular glutamate transporter VGLUT1 (results not shown), and $72.12 \pm 3.60\%$ of striatal GABAergic terminals, identified by the presence of GFP (not shown), contained Syt1 (Figure 2A,B,G). To gain further insight into the neurochemical identity of these DA axon terminals, we next examined the presence of the vesicular monoamine transporter VMAT2, necessary for the vesicular packaging and release of DA, and the type 2 vesicular glutamate transporter VGLUT2, necessary for glutamate release by DA neurons.^{14,44-46} Double-labeling DA neuron cocultures for GFP and VMAT2 revealed no significant difference between VTA and SNc DA neurons, with $46.4 \pm 4.04\%$ and $55.2 \pm 6.1\%$ ($t_{43} = 1.23$, $P = .22$) of VTA and SNc DA neuron terminals, respectively, containing VMAT2 (Figure 2C,D). Similar double-labeling experiments evaluating VGLUT2 expression revealed a small proportion of GFP-positive glutamatergic terminals established by DA neurons (Figure S1 see also⁴⁷). These results indicate that most GFP-positive axonal varicosities are likely to represent sites allowing the release of DA, as well as other neurotransmitters by DA neurons.

As our results to this point suggested that most DAergic terminals were non-synaptic in nature and thus tended to

spontaneously avoid interacting with the otherwise numerous striatal medium spiny neurons, we next aimed to examine more directly the interaction of DAergic terminals with the somatodendritic domain of medium spiny neurons, visualized here using a MAP2 antibody. Using triple-labeling for GFP, Syt1, and MAP2, we compared random fields of SNc or VTA DAergic axonal domains with axonal fields acquired from striatal and cortical cultures, thus providing a comparison with neuronal populations known to be essentially completely synaptic in their connectivity (Figure 2A,B,E,F). The quantification of Syt1/MAP2 colocalization revealed a difference across neuronal subtype [main effect of region, $F(3, 78) = 80.64$, $P < .0001$], with the extent of colocalization being strikingly more important in glutamatergic and GABAergic terminals compared to VTA and SNc DAergic terminals (Tukey's multiple comparisons test, cortex vs VTA, cortex vs SNc, striatum vs VTA and striatum vs SNc: $P < .0001$) (Figure 2I). We calculated the proportion of GFP/Syt1 double-positive varicosities that were also in direct contact with MAP2-positive elements, thus providing an index of the propensity of terminals to be in close contact with the dendritic or somatic membrane of target cells. Strikingly, we found that only $14.9 \pm 2.4\%$ of axon terminals established by SNc DA neurons were in contact with target cells (Figure 2I). This proportion was not significantly different for VTA DA neurons ($17.8 \pm 2.1\%$) (Figure 2I). In marked contrast, $84.5 \pm 2.7\%$ of terminals in cortical cultures (Figure 2A,I) and $74.2 \pm 7.1\%$ of terminals in striatal cultures (Figure 2B,I) were found to be in close proximity to target cells. These findings bring to light the very different mode of connectivity of DA neurons and their main

target cells compared to that of classical glutamatergic and GABAergic neurons.

3.3 | Hyperdense nature of the axonal domain of DA neurons compared to glutamate and GABA neurons

Another intriguing aspect of the connectivity of DA neurons is the very dense, highly complex and branched nature of their axonal compartment.^{12,15,16,48} As we examined the distribution of presynaptic markers along the axonal domain of DA neurons, we observed that the density of axonal varicosities along DAergic axons appeared to be higher compared to other types of neurons. We therefore quantified the distribution of Syt1-positive axonal varicosities along the axonal domain of VTA and SNc DAergic neurons and compared this to striatal GABA and cortical glutamate neurons (Figure 3A-C). The density quantification of Syt1-positive terminals revealed a difference across neuronal subtypes [main effect of region, $F(3, 44) = 10.76$, $P < .0001$], with VTA and SNc DA neurons showing a higher density compared to glutamatergic and GABAergic neurons (Tukey's multiple comparisons test; cortex vs VTA $P = .0005$; cortex vs SNc, $P < .0001$; striatum vs VTA, $P = .0282$ and striatum vs SNc, $P = .0076$). The inter-varicosity distance was $9.0 \pm 1.8 \mu\text{m}$ and $10.9 \pm 2.2 \mu\text{m}$ for SNc and VTA DA neurons, respectively. This value was twofold larger and significantly different compared to GABA and glutamate neurons, for which the inter-varicosity distance was $22.1 \pm 3.6 \mu\text{m}$ and $27.6 \pm 2.9 \mu\text{m}$, respectively (Figure 3D). This observation

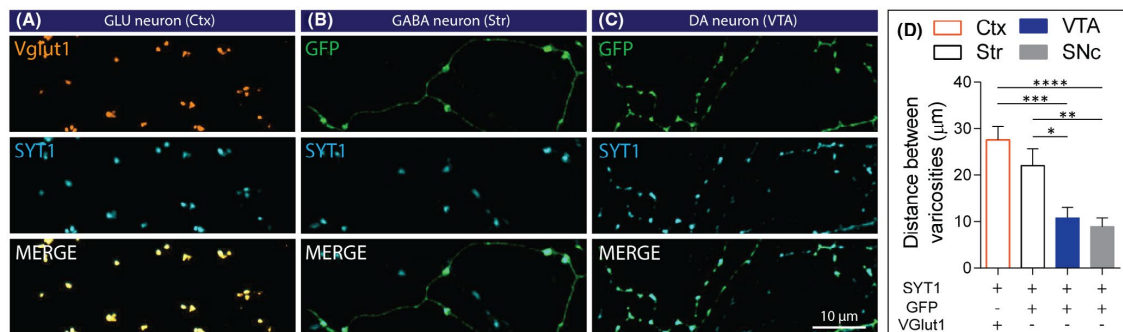


FIGURE 3 Dopaminergic neurons establish a high density of axonal varicosities along their axonal domain. A, Photomicrographs illustrating the distribution of VGLUT1/Syt1-positive varicosities along the axonal domain of a glutamatergic (GLU) neuron from cortex. B, Photomicrographs illustrating the distribution of GFP/Syt1-positive axonal varicosities along the axonal domain of a GABAergic D2-GFP striatal neuron. C, Photomicrographs illustrating the distribution of GFP/Syt1-positive axonal varicosities along the axonal domain of a VTA DAergic neuron. D, Bar graphs representing the distance (μm) between Syt1-positive varicosities along the axonal domain of VTA and SNc DAergic neurons compared to glutamatergic and GABAergic neurons from cortex and striatum, respectively. Bar graphs present the mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. Cortex $n = 12$; striatum $n = 12$; VTA $n = 12$; SNc $n = 12$; from three different cultures. The number of observations represents the number of fields from individual neurons examined

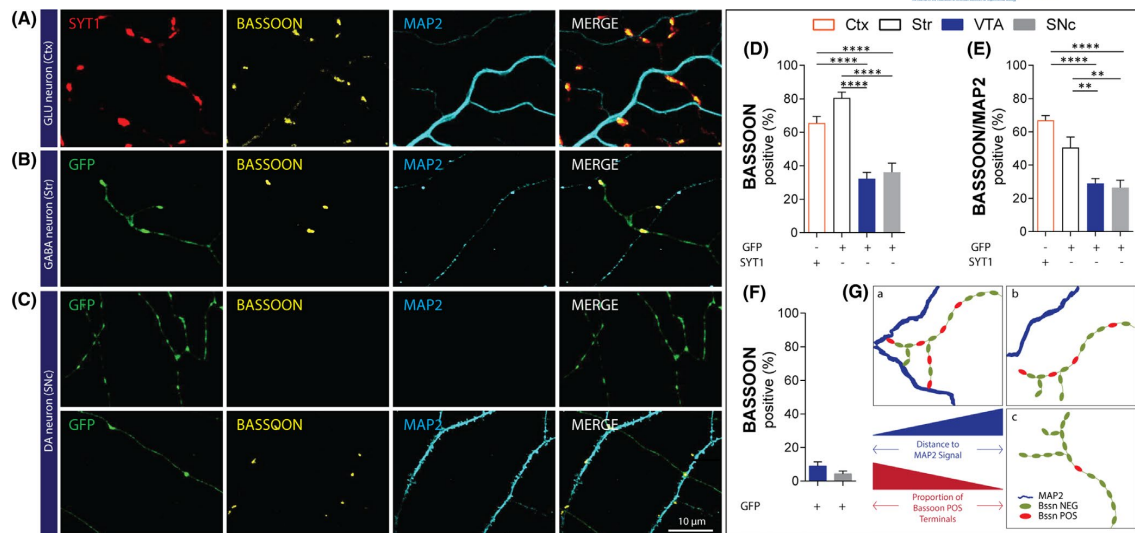


FIGURE 4 The active zone protein bassoon is enriched in DA terminals that are in close proximity to dendrites. A, Photomicrographs illustrating that most Syt1-positive axonal varicosities established by a cortical glutamatergic neuron co-express bassoon and are localized in proximity to MAP2-positive dendrites. B, Photomicrographs illustrating that most GFP-positive axonal varicosities established by a striatal GABAergic neuron co-express bassoon and are localized close to MAP2-positive dendrites. C, The top set of photomicrographs illustrates that GFP-positive axonal varicosities established by a SNc DA neuron are negative for bassoon and distant from any MAP2-positive dendrites. The bottom set of photomicrographs illustrates that a larger subset of GFP-positive axonal varicosities established by a SNc DA neuron is positive for bassoon when localized close to MAP2-positive dendrites. D, Bar graphs representing the proportion of GFP-positive axonal varicosities established by VTA and SNc DAergic neurons that co-express bassoon, compared to Syt1-positive axonal terminals from cortical glutamatergic neurons and striatal GABAergic neurons. E, Bar graphs representing the proportion of axonal varicosities established by VTA and SNc DAergic neurons that co-express bassoon and are in contact with MAP2-positive dendrites, compared to glutamatergic and GABAergic neurons from cortex and striatum, respectively. F, Bar graph representing the proportion of axonal varicosities established by VTA and SNc DAergic neurons that co-express bassoon in a context of absence of a target cell in the field. G, Schematic representation of bassoon-positive DA terminals based on the localization of a target cell, represented by the MAP2 signal. Bar graphs represent the mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. Cortex $n = 40$; striatum $n = 23$; VTA $n = 30$; SNc $n = 22$ from two different cultures. The number of observations represents the number of fields from individual neurons examined

further highlights the fundamentally different nature of DAergic axonal arbors compared to those of GABA and glutamate neurons.

3.4 | Limited expression of the active zone scaffolding proteins bassoon and RIM

Because axon terminals established by DA neurons clearly differed in their mode of connectivity compared to GABA and glutamate neurons, we sought to further examine some key active zone components known to be important for the neurotransmitter release machinery of neurons. At classical fast synapses, active zones are typically characterized by the expression of specific scaffolding proteins such as bassoon and RIM1/2.⁴⁹ Interestingly, recent work showed that only ~30% of DAergic terminals in vivo express the active zone proteins bassoon and RIM1/2.⁵⁰ However, it has not been determined whether

synaptic and non-synaptic DA terminals differentially contain such scaffolding proteins. We hypothesized that synaptic DA neuron terminals might be more likely to express active zone scaffolding proteins compared to the non-synaptic DA neuron terminals because of the necessity to maintain a stable pre- and postsynaptic complex. Confirming previous results, bassoon was differentially expressed across neuronal cell type [(Figure 4A-D) main effect of region, $F(3, 111) = 27.88$, $P < .0001$], with higher expression in glutamatergic and GABAergic neurons compared to VTA and SNc DA neurons (Tukey's multiple comparisons test; cortex vs VTA, cortex vs SNc, striatum vs VTA, and striatum vs SNc: $P < .0001$). Only $36.0 \pm 5.5\%$ and $32.2 \pm 3.8\%$ of SNc or VTA DA terminals were positive for bassoon (Figure 4C,D). A striking observation was that the majority of bassoon-positive DAergic terminals was either in direct contact or in close proximity to a target cell. In axonal fields far removed from other neurons, axonal varicosities were typically completely devoid of bassoon

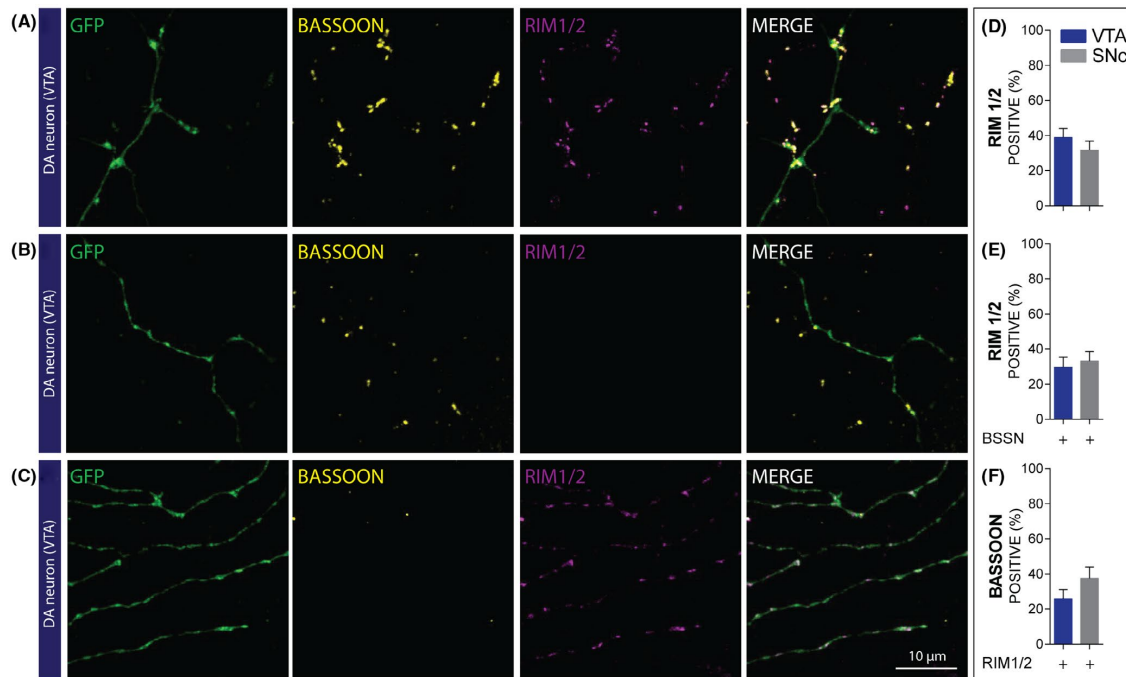


FIGURE 5 The active zone proteins RIM 1/2 and bassoon are partially segregated in distinct sets of DA terminals. A, Photomicrographs illustrating GFP-positive axonal varicosities established by VTA DA neurons expressing bassoon and co-expressing RIM1/2. B, Photomicrographs illustrating GFP-positive axonal varicosities established by VTA DA neurons expressing bassoon but not RIM1/2. C, Photomicrographs illustrating GFP-positive axonal varicosities established by VTA DA neuron expressing RIM1/2 but not bassoon. D, Bar graph representing the proportion (%) of VTA and SNc GFP-positive axonal varicosities expressing RIM1/2. E, Bar graph representing the proportion (%) of DAergic GFP-positive axonal varicosities positive for bassoon and colocalizing with RIM1/2. F, Bar graph representing the proportion (%) of DAergic GFP-positive axonal varicosities positive for RIM1/2 and colocalizing with bassoon. The bar graphs represent the mean \pm SEM. VTA n = 28 SNc n = 30; from two different cultures. The number of observations represents the number of fields from individual neurons examined

(Figure 4C, upper panels). Evaluation of the proportion of Bassoon-positive terminals that are in contact with MAP2 signal also revealed a difference across neuronal cell type [main effect of region, $F(3, 111) = 25.93$, $P < .0001$], with a higher proportion in cortical glutamatergic terminals and striatal GABAergic terminals compared to VTA and SNc DA neurons (Tukey's multiple comparisons test; cortex vs VTA, $P < .0001$; cortex vs SNc, $P < .0001$; striatum vs VTA, $P = .002$; striatum vs SNc: $P = .0013$; cortex vs Striatum, $P = .020$). We found that in axons closer to striatal neurons (Figure 4C, lower panels), approximately one third of varicosities in contact with MAP2-positive somatodendritic domains were bassoon positive ($26.5 \pm 4.3\%$ and $28.9 \pm 3.0\%$ for SNc and VTA DA neurons, respectively; Figure 4E). In these fields, bassoon was found in DA neuron varicosities that were located between 0.5 and 40 μm from MAP2-positive dendrites (Figures 4F and S2), as illustrated schematically (Figure 4G).

In striking contrast, most terminals established by striatal GABA neurons were positive for bassoon

($80.6 \pm 3.4\%$) (Figure 4A,B), while for cortical glutamate neurons, this was $65.5 \pm 4.0\%$ (Figure 4C,D). Furthermore, $66.8 \pm 2.9\%$ of bassoon-positive glutamatergic terminals and $50.5 \pm 6.4\%$ of striatal GABAergic terminals were in contact with MAP2-positive structures (Figure 4E).

We found RIM1/2 to also be sparsely expressed by DAergic terminals, unrelated to the presence of target cells. While in some fields, good colocalization of RIM1/2 and bassoon was observed (Figure 5A), in others, they were mostly segregated (Figure 5B,C). Globally, $31.7 \pm 5.1\%$ and $38.9 \pm 5.1\%$ ($t_{59} = 0.98$, $P = .33$) of SNc and VTA DAergic terminals contained RIM1/2 (Figure 5D). The proportion of bassoon-positive terminals expressing RIM1/2 was $33.2 \pm 5.4\%$ and $29.6 \pm 5.9\%$ ($t_{54} = 0.45$, $P = .65$), respectively, for SNc and VTA DA neurons (Figure 5E). Conversely, $37.6 \pm 6.3\%$ and $25.7 \pm 5.3\%$ ($t_{59} = 1.44$, $P = .16$) of bassoon-positive SNc and VTA DAergic terminals contained RIM1/2 (Figure 5F), highlighting their mostly segregated distribution.

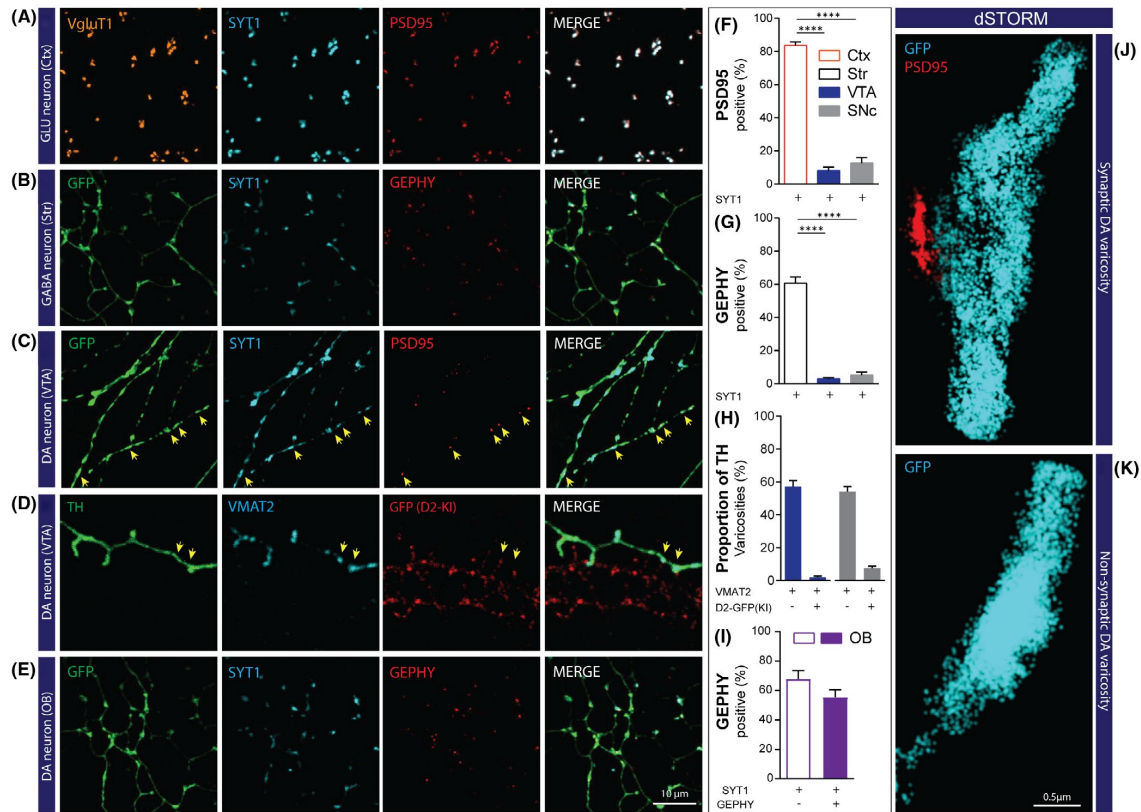


FIGURE 6 DA neurons develop only a small proportion of excitatory and inhibitory synapses in contrast to cortical and striatal neurons and a small subset of terminals in close proximity to D2R clusters. **A**, Photomicrographs illustrating VgluT1-positive varicosities along the axonal arborization of a cortical neuron expressing Syt1 and colocalizing with PSD-95. **B**, Photomicrographs illustrating GFP-positive varicosities in the axonal arborization of a GABAergic neuron expressing Syt1 and colocalizing with the postsynaptic marker gephyrin. **C**, Photomicrographs illustrating GFP-positive varicosities in the axonal arborization of a VTA DA neuron expressing Syt1 and colocalizing sparsely with the postsynaptic marker PSD-95. **D**, Photomicrographs illustrating TH-positive varicosities in the axonal arborization of a VTA DA neuron expressing VMAT2 and colocalizing sparsely with the D2R (yellow arrow). **E**, Photomicrographs illustrating GFP-positive varicosities along the axonal arborization of an olfactory bulb DA neuron expressing Syt1 and colocalizing with gephyrin. **F**, Bar graph representing the proportion (%) of axonal varicosities established by VTA, SNc, cortical and striatal neurons that are positive for Syt1 and colocalizing with PSD-95 at 14 DIV. **G**, Bar graph representing the proportion (%) of axonal varicosities established by VTA, SNc, cortical and striatal neurons that are positive for Syt1 and colocalizing with gephyrin at 14 DIV. **H**, Bar graphs representing the proportion (%) of TH-VMAT2-positive terminals colocalizing with D2R (GFP signal). **I**, Bar graph representing the proportion (mean \pm SEM (%)) of GFP/Syt1-positive axonal varicosities colocalizing with gephyrin (purple) or not colocalizing with gephyrin (white), established by olfactory bulb DA neurons. **J-K**, Representative dSTORM images showing a synaptic DA varicosity GFP-positive (cyan) (**J**) in close contact to a PSD-95 domain (red) and a non-synaptic GFP-positive (cyan) DAergic varicosity (**K**) without any contact to a postsynaptic domain. The bar graphs represent the mean \pm SEM, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. PSD-95/gephyrin experiments: Cortex $n = 25$; striatum $n = 25$; VTA $n = 25$ SNc $n = 25$; from three different cultures. D2-KI experiments: VTA $n = 35$ SNc $n = 33$; from four different cultures. The number of observations represents the number of fields from individual neurons examined

3.5 | Synaptic contacts established by DA neurons are neurochemically diverse

Our results thus far highlight the surprising propensity of DAergic neurons to establish a majority of neurotransmitter release sites that are not in direct contact with target cell dendrites is thus non-synaptic. This observation

contrasts with the opposite propensity of cortical glutamate or striatal GABA neurons. The small subset of synaptic-like release sites established by DA neurons could represent sites implicated in glutamate and GABA release because previous work has described that glutamate and GABA can act as additional co-transmitters in DA neurons.^{11,14,44,46,47,51,52} To gain further insight

into the nature of synaptic-like terminals detected in our model, we next examined the relationship between DAergic terminals and postsynaptic organizers associated with glutamatergic (PSD-95) and GABAergic (gephyrin) synapses.^{53,54} Here again, we used cortical glutamate neurons and striatal GABA neurons as a point of comparison (Figure 6A,B). We found that a small subset of Syt1-positive terminals established by SNc DA neurons was in close apposition to PSD-95 ($12.6 \pm 3.3\%$) or gephyrin ($5.2 \pm 1.8\%$). A similar low proportion of VTA DA neuron terminals were found in close proximity to PSD-95 ($8.0 \pm 2.3\%$) or gephyrin ($2.9 \pm 0.8\%$) (Figure 6C,F,G). The difference between SNc and VTA DA neurons was not significant. To visualize at higher resolution the molecular architecture of synaptic and non-synaptic terminals established by primary DA neurons, we used dSTORM super-resolution imaging. For the synaptic DA varicosities, the dSTORM images revealed a clear apposition between the DAergic varicosity, defined by GFP nanocluster signal, and the postsynaptic domain of a target cell, defined by PSD-95 nanocluster signal (Figure 6J). An example of a non-synaptic DAergic terminal visualized by super-resolution imaging is also illustrated, demonstrating the lack of proximity to a PSD domain (Figure 6K). In stark contrast, $83.6 \pm 2.2\%$ of VGluT1/Syt1 terminals established by cortical glutamate neurons colocalized with PSD-95, which represents a significant difference compared to VTA and SNc DA neurons [main effect of region, $F(2, 83) = 325.3$, $P < .0001$; (Tuckey's multiple comparisons test; cortex vs VTA and cortex vs SNc, $P < .0001$; Figure 6A,F)]. Similarly, the large majority ($60.6 \pm 3.7\%$) of terminals established by striatal GABAergic neurons were in close apposition to gephyrin postsynaptic clusters, representing a significant difference compared to DA neurons from VTA and SNc [main effect of region, $F(2, 91) = 179.1$, $P < .0001$; (Tuckey's multiple comparisons test; striatum vs VTA and striatum vs SNc, $P < .0001$; Figure 6B,G)]. Because previous work has suggested that olfactory bulb (OB) DA neurons release GABA as a co-transmitter at many of their release sites, we also examined synaptic release sites from such neurons. Interestingly, we found that $55.4 \pm 5.2\%$ of Syt1-positive DAergic terminals established by such neurons colocalized with gephyrin (Figure 6E,I).

Although evidence for DA receptor clusters at synaptic sites in the brain is limited,^{23,24} DA neurons could in principle also establish synaptic-like release sites that are in close apposition to postsynaptic DA receptors, independently from PSD-95 or gephyrin domains. To examine this, we took advantage of a knock-in mouse line expressing GFP-tagged D2 receptors and visualized release sites specialized for DA release using VMAT2 immunostaining. In cocultures of WT DA neurons together with striatal neurons

from GFP-D2 mice (Figure 6D), we found that $54.0 \pm 3.1\%$ of TH-positive terminals established by SNc DA neurons contained VMAT2 (Figure 6H). Similarly, $57.2 \pm 3.6\%$ of TH-positive DA terminals established by VTA DA neurons were VMAT2 positive (Figure 6H). Arguing here again for a strong propensity of DAergic axons to establish release sites that fail to seek out target cells, we found that only $7.6 \pm 1.2\%$ of TH/VMAT2 terminals established by SNc DA neurons contacted D2 receptor clusters, while this proportion was $2.0 \pm 0.8\%$ for VTA DA neurons (Figure 6H).

3.6 | Mitochondria are similarly distributed into synaptic and non-synaptic DA neuron release sites

As mitochondria are important for synaptic structure and function, and in particular to fuel vesicular cycling and neurotransmitter dynamics in axon terminals,⁵⁵ we wondered whether this organelle would be equally found in synaptic and non-synaptic axon terminals along DA neuron axons. We used viral-mediated overexpression of Mito-RoGFP to visualize mitochondrial distribution (Figure 7A) and found that $61.43 \pm 2.9\%$ of TH-positive terminals established by VTA DA neurons contained mitochondria (Figure 7B,D). Similarly, $56.45 \pm 2.9\%$ of TH-positive terminals developed by SNc DA neurons contained mitochondria (Figure 7C,D). Quantifying this proportion in terminals in contact with MAP2-positive domains (synaptic terminals) and in non-synaptic terminals, we found a tendency for an increased occurrence of mitochondria in non-synaptic terminals, although this was statistically significant only for VTA DA neurons (Figure 7E) [main effect of synaptic vs non-synaptic sites, $F(1, 191) = 10.85$, $P < .001$; Sidak's multiple comparisons test; synaptic vs non-synaptic VTA DA terminals and synaptic vs non-synaptic SNc DA terminals $P < .05$].

3.7 | FM1-43 imaging reveals a majority of active DA terminals

Considering the large heterogeneity of DAergic terminals identified in the present work, we wished to determine whether all or only a subset of morphologically defined axonal varicosities are functional and competent to release neurotransmitters by exocytosis. Here we used the activity-dependent uptake and release of the well-characterized endocytotic probe FM1-43, allowing us to examine activity-dependent vesicular cycling independently of the neurochemical phenotype of the varicosities. After the first round of FM1-43 uptake induced by high potassium induced membrane depolarization, the

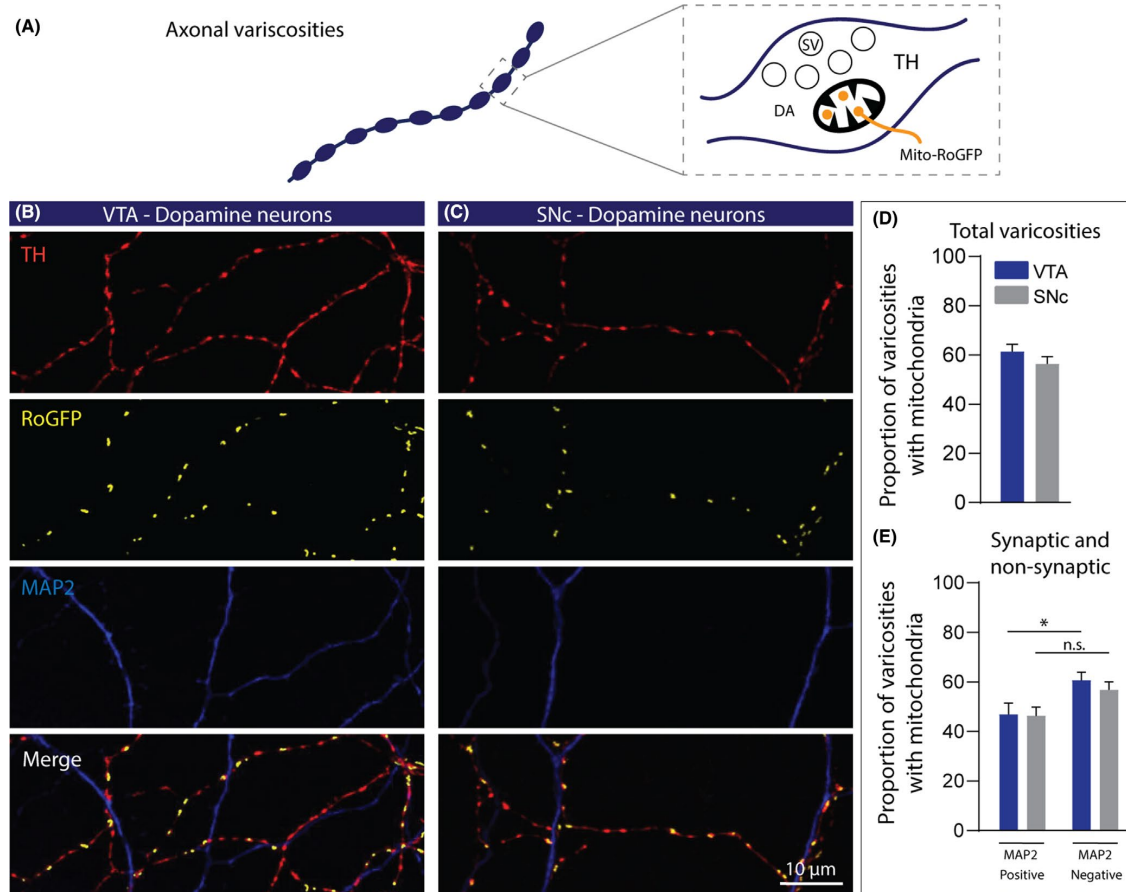


FIGURE 7 Mitochondria are similarly distributed into synaptic and non-synaptic DA neuron release. A, Principle of mitochondria labeling in dopamine axon terminals using AAV-mediated expression of Mito-RoGFP. B and C, Representative confocal images from VTA (B) and SNc (C) DA neurons immunolabeled for TH (red) and Mito-RoGFP (yellow). The presence and proximity to postsynaptic domains of target cells is identified with MAP2 immunolabeling (blue). D, Bar graphs representing the proportion (mean \pm SEM (%)) of TH-positive terminals colocalizing with mitochondria (GFP signal) in the total population of varicosities. E, Bar graphs representing the proportion (mean \pm SEM (%)) of TH-positive terminals colocalizing with mitochondria (GFP signal) for terminals that in contact with MAP2-positive structures (ie, synaptic terminals) or non-synaptic (not contacting a MAP2-positive structure). Two-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test, $*P < .05$; VTA $n = 48$ and SNc $n = 49$; from two different cultures. The number of observations represents the number of fields from individual neurons examined

second round of membrane depolarization was used to identify terminals that showed activity-dependent release of FM1-43 (Figure 8A,B). A total of 1091 SNc and 543 VTA varicosities were examined. To isolate activity-dependent release from spontaneous release or probe bleaching, we used as a criterion a minimal release of 20% of the initially up taken FM1-43 in response to the second round of membrane depolarization (Figure 8C). Post-experimental immunostaining of the same fields that were imaged revealed that a majority of FM1-43 puncta along DAergic axons contained Syt1 or VMAT2 (Figure 8D). We found that $84.62 \pm 4.60\%$ of SNc and

$77.58 \pm 9.62\%$ of VTA axonal varicosities, identified as potential release sites by the presence of Syt1 or VMAT2, were active, with no difference between the groups ($t_9 = 0.073$, $P = .94$) (Figure 8E).

3.8 | NL-1 induces presynaptic differentiation of DA neuron terminals

Because a subset of the synapses established by DA neurons is glutamatergic and striatal neurons act as postsynaptic recipients for a massive number of glutamatergic synapses

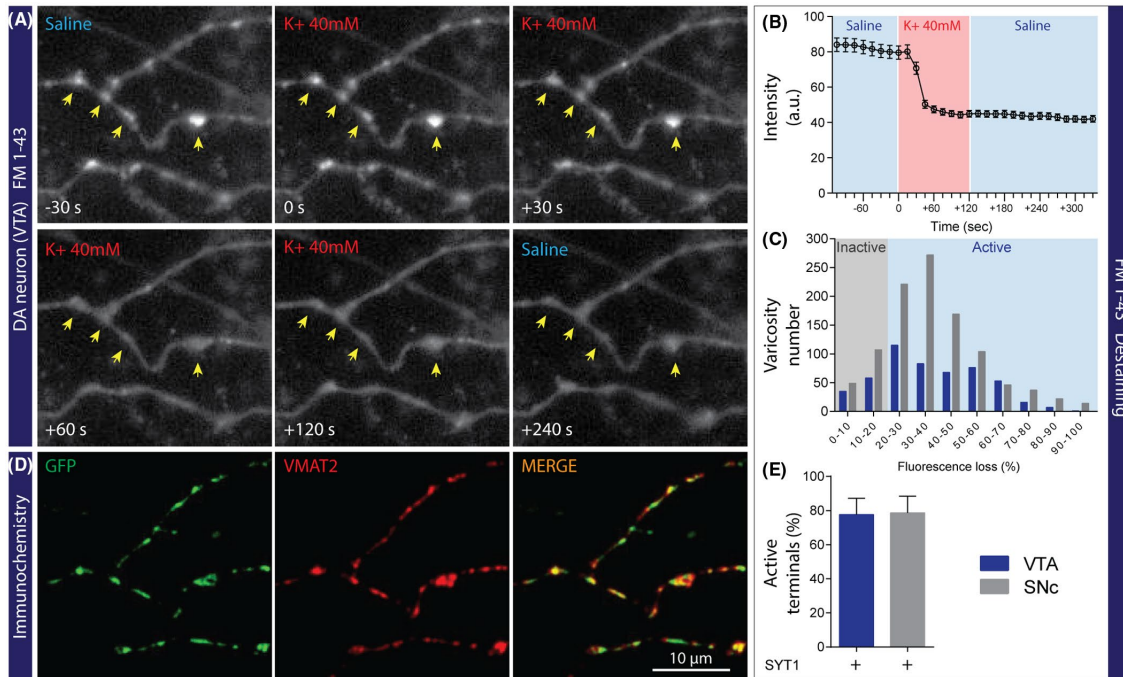


FIGURE 8 Most synaptic and non-synaptic dopaminergic terminals are active. **A**, Images of the axonal field from a VTA DA neuron labeled live with FM1-43. Representative images at the different indicated time points before, during, and after KCl-induced membrane depolarization and FM1-43 destaining. Time 0 seconds represents the last image before KCl stimulation. **B**, Intensity (arbitrary units— a.u.) versus time plot for FM1-43 puncta that destained by at least 20% in response to 40 mM KCl. **C**, Histogram showing the distribution of FM1-43 destaining levels in response to KCl depolarization ($n = 522$ puncta from five different VTA DA neurons and $n = 986$ puncta from six different SNc DA neurons). A loss of fluorescence $<20\%$ was considered as an inactive varicosity. **D**, Images of the same axonal field illustrated in panel A after postrecording fixation and immunostaining for GFP and VMAT2. **E**, Bar graph representing the proportion (mean \pm SEM (%)) of active varicosities established by VTA and SNc DA neurons. Analysis including FM1-43-positive and FM1-43-negative varicosities ($n = 543$ varicosities from five different VTA DA neurons; $n = 1091$ varicosities from six different SNc DA neurons)

from the cortex, we hypothesized that the transsynaptic protein NL-1, specifically expressed at the postsynaptic compartment of excitatory synapses,^{28,29,56,57} might play a role in regulating synapse formation by VTA and SNc DA neurons. We used an artificial synapse formation assay to test this hypothesis. Primary DA neurons derived from the VTA and SNc and expressing the red fluorescent protein tdTomato (RFP) were cocultured with HEK293T cells expressing the major form of NL-1 (splice variant A⁺B⁺; NL-1^{AB}) tagged with extracellular HA or a negative control membrane protein (CD4 with HA tag) and we examined whether DA axonal varicosities were recruited to establish synapse-like contacts (Figure 9A,B). We found that HEK293T cells expressing NL-1^{AB} were significantly more attractive for DA terminals, identified by the presence of RFP or VMAT2, compared to HEK293T cells expressing the control protein CD4 (Figure 9C). The quantification of the total intensity of RFP and VMAT2 puncta on HEK293T cells expressing NL-1^{AB} showed a fivefold and a 27-fold increase in signal,

respectively, compared to the CD4 control group, representing background signal due to the random distribution of axons (RFP, $t_{70.11} = 5.51$, $P < .0001$ and VMAT2, $t_{24.16} = 4.66$, $P < .0001$, Welch-corrected, Figure 9D,E). Cortical neurons were used in similar experiments to compare the results obtained with DA neurons to a population of neurons known to establish mostly synaptic-type terminals. We found that NL-1^{AB} also induced a robust recruitment of cortical terminals (Figure 9F) as previously reported.⁶ The quantification of the total intensity of VGluT1 puncta on HEK293T cells expressing NL-1^{AB} showed an 18-fold increase compared to the control CD4 condition ($t_{22.60} = 4.171$, $P = .0004$, Welch-corrected, Figure 9G). These results suggest that NL-1^{AB} has efficient synaptogenic activity to induce presynaptic differentiation of DA neurons, to a level comparable to that observed for cortical neurons. This observation suggests that the limiting factor preventing most of the numerous terminals established by DA neurons to form synapses is more likely to be at the presynaptic rather than at the postsynaptic level.

3.9 | Overexpression of Nrnx-1 α^{SS4-} promotes the formation of both excitatory and inhibitory synapses by DA neurons

One of the most important transsynaptic binding partners of NL-1 is the presynaptic protein Nrnx-1. This protein is also involved in glutamatergic synapse formation and has two versions: the long version, α -neurexin (Nrnx-1 α), and the short version, β -neurexin (Nrnx-1 β). Both Nrnx-1 α and Nrnx-1 β , regulate excitatory synapse formation and function.^{30,58} Considering that a subset of DA neurons uses glutamate as a second neurotransmitter, we first investigated the endogenous expression of Nrnx-1 in DA neurons. We found that both isoforms are expressed at high level in both VTA and SNc DA neurons, although Nrnx-1 α was expressed at higher levels in VTA DA neurons (Figure S3). We therefore examined whether overexpression of Nrnx-1 α influences synapse formation by these neurons. The lentiviral overexpression of Nrnx-1 α (splice version SS4-; Nrnx-1 α^{SS4-}) in DA neuron cocultures (Figure 10A,B) caused a twofold increase in the proportion of DA terminals colocalizing with the excitatory postsynaptic organizer PSD-95 compared to the control group ($t_{45,56} = 3.47$, $P = .0011$, Welch-corrected, Figure 10C,D). The average size of PSD-95-positive synaptic puncta or their total area was unchanged (Figure 10E,F), suggesting that the overexpression of Nrnx-1 α^{SS4-} in DA neurons triggered the establishment of more contacts with preexisting postsynaptic clusters. The overexpression of Nrnx-1 α^{SS4-} in DA neurons induced a similar increase in the proportion of DA terminals colocalizing with the inhibitory postsynaptic protein gephyrin ($t_{44,76} = 2.43$, $P = .019$, Welch-corrected, Figure 10G,H), with no change in gephyrin puncta size or total gephyrin puncta area (Figure 10I,J).

4 | DISCUSSION

In this study, we provide a novel perspective on the connectivity of DA neurons with an exhaustive characterization of the axonal domain of this key neuromodulatory brain system. We found that DA neurons establish a highly distinctive axonal domain with a majority of non-synaptic terminals, in a way that is fundamentally different compared to cortical glutamatergic and striatal GABAergic neurons. Both synaptic and non-synaptic DAergic varicosities express basic presynaptic proteins such as Syt1, suggesting that the majority of these varicosities have the machinery to release neurotransmitters. We discovered that synaptic and non-synaptic terminals differ in their expression of active zone structural proteins: the active zone protein bassoon was found to be mainly expressed

in DA terminals located close to a target cell, while most non-synaptic terminals were devoid of bassoon. The active zone protein RIM1/2 was more sparsely expressed in both synaptic and non-synaptic DA terminals. Using the activity-dependent synaptic vesicle probe FM1-43, we found that the majority of DA terminals, both synaptic and non-synaptic, are active. Finally, providing initial insight into the mechanistic underpinnings of this unique connectivity, we find that the postsynaptic transsynaptic protein NL-1 is able to efficiently trigger the formation of synapse-like structures by primary DA neurons, while overexpression of the presynaptic transsynaptic protein Nrnx-1 causes an increase in the proportion of terminals adopting a synaptic configuration.

4.1 | Heterogeneity in DA release sites

We found that ~80% of axonal-like varicosities established by DA neurons express the exocytosis calcium sensor Syt1, suggesting that the SNARE complex and associated proteins are present in the majority of axonal varicosities established under our experimental conditions (Figure 2E,F). Although we have not examined in detail the presence of other vesicular exocytosis proteins in the present study, most of these varicosities also contain SNAP25 and SV2 (results not shown). The presence of Syt1 in terminals has previously been shown to provide a good index of functionality.¹ Perhaps a bit surprising, the expression of VMAT2, considered as a specific marker of terminals that release DA or other monoamines, was found in only ~55% of DA terminals (Figure 2D,G). These results suggest that only half of DA terminals can package and release DA. One possible explanation of this low proportion is the fact that some DA neurons are also able to package and co-release other neurotransmitters at some of the axon terminals, including glutamate and GABA.^{11,14,51,59} Furthermore, recent studies have reported that co-release of DA and glutamate mainly occurs from separate, segregated sets of terminals.^{47,60,61} The present experiments were performed with primary DA neurons in coculture with striatal neurons. The medial part of the VTA and the lateral part of the SNc were used. Because previous work reported that VMAT2 is more expressed in DA neurons located in the lateral part of the VTA compared to the medial part,⁶² it is possible that this may have contributed to our finding of a large proportion of terminals without detectable VMAT2. Also, recent work suggested that 75% of DA neurons in the mesencephalon express the mRNA encoding for VMAT2 suggesting that a small subset does not express VMAT2, at least at this time point in vitro.⁴⁷ Additional studies will be required to examine this further.

4.2 | The active zone proteins bassoon and RIM are mainly segregated

Our work provides new insights on the differential molecular make up of synaptic and non-synaptic DA

terminals. At classical synapses, release sites are characterized by the presence of active zones that contain different scaffold proteins including RIM, RIM-BP, bassoon/piccolo, or ELKS.^{49,63} The active zone protein RIM has been identified as a key scaffold protein notably

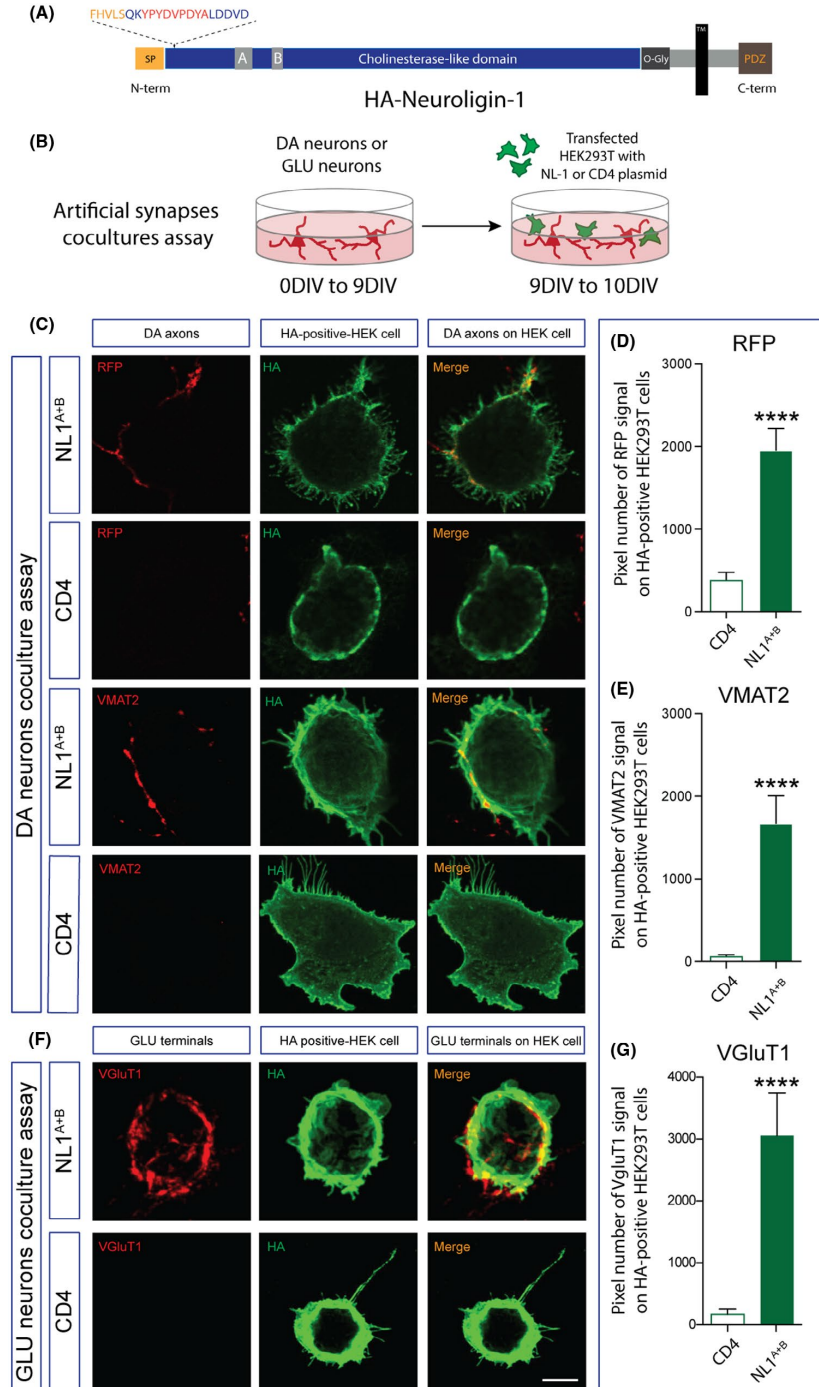


FIGURE 9 NL-1 induce presynaptic differentiation of DA neuron terminals. A, Schematic representation of NL-1-HA, epitope-tagged in the extracellular domain. B, Schematic representation of the neuron-HEK293T cell coculture assay. C, Representative images of double immunolabeling for RFP (red) or VMAT2 (red), identifying terminals from DA neurons and HA-tagged (green) NL-1 construct expressed by cocultured HEK293T cells. HA-CD4 was used as a negative control protein due to its known lack of synaptogenic activity. D & E, Quantification of total intensity of RFP (D) and VMAT2 (E) axonal puncta on HEK293T cells expressing NL-1-HA or CD4-HA. F, Representative images of double immunolabeling for VGLuT1 (red), identifying cortical glutamate terminals and HA-tagged (green) NL-1 construct expressed in cocultured HEK293T cells. HA-CD4 was used as a negative control. G, Quantification of total intensity of VGLuT1 axonal puncta on HEK293T cells expressing NL-1-HA or CD4-HA. Bar graphs represent the mean \pm SEM, t-test, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. HEK cells = 23 (NL-1) and HEK cells = 25 (CD4) from two different experiment with glutamatergic neurons; HEK cells = 58 (NL-1) and HEK cells = 49 (CD4); RFP group from two different experiments with DA neurons; HEK cells = 25 (NL-1) and HEK cells = 25 (CD4); VMAT2 group from two different experiments with DA neurons. The number of observations represents the number of fields from individual HEK293T cell examined

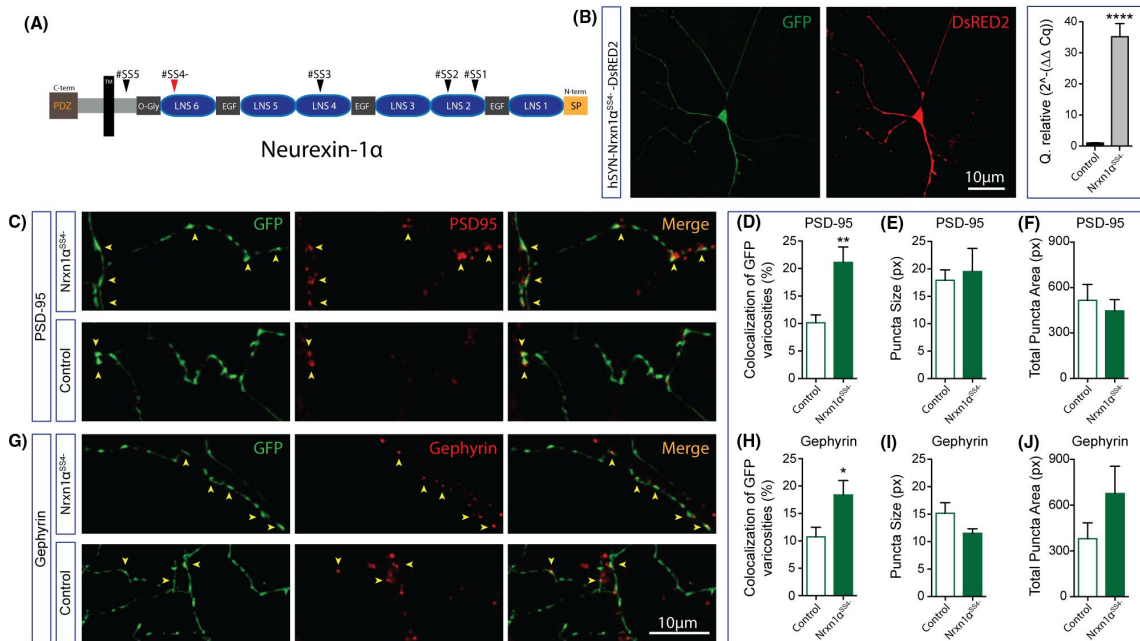


FIGURE 10 Overexpression of $Nrnx-1\alpha^{SS4-/-}$ promotes the formation of both excitatory and inhibitory synapses by DA neurons. A, Schematic representation of the $Nrnx-1\alpha^{SS4-/-}$ without the splicing site 4 (SS4-). B, Immunofluorescence images showing the expression of DsRed2 expressed together with $Nrnx-1\alpha^{SS4-/-}$ in a GFP-positive DA neuron. The bar graph shows a relative quantification by qPCR of mRNA encoding for $Nrnx-1\alpha^{SS4-/-}$ after neuronal transfection with pLV-hSYN-Nrnx-1 α -DsRED2 compared to the control pLV-hSYN-DsRED2. C, Representative images of double immunolabeling for GFP, expressed by DA neurons and PSD-95 after overexpression of $Nrnx-1\alpha^{SS4-/-}$ or of the control construct. D to F, Summary graphs representing the proportion of excitatory synapses established by DA neurons (D), including the average puncta size (E) and the total puncta area (F) of PSD-95 signal. G, Representative images of double immunolabeling for GFP, expressed by DA neurons and gephyrin after overexpression of $Nrnx-1\alpha^{SS4-/-}$ or of the control construct. H to J, Summary graphs representing the proportion of excitatory synapses established by DA neurons (H), including the puncta size (I) and the total puncta area (J) of gephyrin signal. Bar graphs represent the mean \pm SEM, t-test, * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. DA neurons $n = 31$ and $n = 41$ (pLV-hSYN-Nrnx1 $\alpha^{SS4-/-}$ -DsRED2 and pLV-DsRED2, respectively; PSD-95 group) and DA neurons $n = 27$ and $n = 26$ (pLV-hSYN-Nrnx1 $\alpha^{SS4-/-}$ -DsRED2 and pLV-DsRED2, respectively; gephyrin group) from three different cultures. The number of observations represents the number of fields from individual transfected neurons examined

involved in vesicle priming and Ca^{2+} channel tethering.^{3,64} Bassoon is also an important scaffold protein and plays a role in synaptic vesicle clustering without participating directly in synaptic vesicle exocytosis.⁶⁵

In our in vitro system, we first found that only ~30% of DA terminals contained bassoon. Strikingly, we observed that the majority of them were in close proximity or in contact with a target cell (see Figure 4).

We also found that only ~30% of bassoon-positive DA terminals were also positive for RIM1/2 (Figure 5F). Conversely, only a third of RIM1/2-positive terminals contained bassoon (Figure 5E). The mechanism and functional implications of this differential expression of active zone proteins in DA terminals are presently unclear. Interestingly, the conditional KO of RIM1 and RIM2 in DA neurons was recently shown to completely block evoked DA release, while extracellular levels of DA were only partially decreased.⁵⁰ This finding suggests the possibility that while action potential-evoked DA release requires RIM1/2, spontaneous release occurs through a separate mechanism. In our work, we found that approximately 80% of DA terminals contain Syt1, suggesting that most of them have the capacity to release DA, spontaneously or in an activity-dependent manner. Our ultrastructural observations with TEM also support this conclusion as most varicosities examined contained large pools of synaptic vesicles (Figure 1L). Our observation of the selective presence of the active zone scaffold protein bassoon at DA terminals located in close proximity to a target cell is particularly intriguing. Previous work in hippocampus has suggested that target cells can play a role in synapse maturation during synaptogenesis and that some neurons also possess non-synaptic release sites that are functional and mobile and that express the active zone protein bassoon.^{66,67} Although we hypothesize that target-derived signals are likely to be required to restrict bassoon to release sites that are in close proximity to target cells, further work will be required to test this directly.

4.3 | DA neurons establish a minority of excitatory, inhibitory, and pure DA synapses

Our experiments provide a new perspective on the synaptic and non-synaptic terminals established by DA neurons. Synapses are classically defined by an apposition between a pre- and a postsynaptic domain.^{68,69} We investigated if the GFP-positive presynaptic terminals were associated with a postsynaptic specialization. We found that only ~20% of VTA and SNc DA terminals are in close proximity to MAP2-positive dendritic domains (Figure 2E,H). These data are consistent with previous studies suggesting that DA neurons, *in vivo* and *in vitro*, are able to develop terminals without showing any clear apposition to a postsynaptic site.^{43,70,71} The molecular mechanism allowing DA neurons to differentially establish synaptic and non-synaptic terminals is presently unknown. Here again, one hypothesis to consider is that target cells provide signals

that retrogradely determine the structure of terminals that become synaptic, while the non-synaptic terminals would possibly develop along a default non-synaptic differentiation path. In accordance with this hypothesis, recent work has revealed how striatal target cells regulate the glutamatergic phenotype of a subset of terminals established by DA neurons.⁴⁷

While glutamatergic synapses established by DA neurons in the ventral striatum of rats have been described to possess a synaptic organization,^{72,73} the possibility that DA neurons establish terminals that form synapses containing DA receptors has been previously considered, although supported by very limited evidence. Previous work using electron microscopy has indeed suggested that DAergic varicosities can be found associated with postsynaptic specializations that contain D1 receptors.²⁴ In the present work, we took advantage of a newly generated genetically modified mouse model allowing to easily visualize DA D2 receptors without the important limitation of the limited specificity of antibodies directed against DA receptors. Our findings reveal the existence of only a very small proportion of DAergic terminals that colocalize with postsynaptic D2 receptor clusters. Taken together, our results suggest an intrinsic ability of DA neurons to preferentially develop a majority of non-synaptic terminals.

We hypothesize that while the small subset of synaptic release sites provides different types of fast signals to target cells, mediated through DA, glutamate, and GABA receptors, the larger subset of non-synaptic terminals represents the morphological substrate of slower signals previously described as “volume” or “diffuse” transmission.^{20,22,71,74-77}

4.4 | A majority of DA terminals are active

While DAergic neurons are endowed with an exceptionally arborized axonal compartment, with a very large number of axonal-like varicosities, whether all or a subset of these varicosities represent functional release sites is unclear. Previous experiments performed with a newly developed DA false transmitter up taken by VMAT2 suggested that only ~20% of DAergic varicosities are able to release DA.⁷⁸ Here we took advantage of the high signal to noise ratio and simplicity of our *in vitro* model to examine whether the large numbers of varicosities established by DA neurons are active. We chose to evaluate this using a FM1-43 uptake assay, an approach that labels activity-dependent, actively recycling vesicles, irrespectively of their neurochemical identity. We found that a large majority of axonal varicosities established

by DA neurons are active, suggesting that most non-synaptic terminals represent functional neurotransmitter release sites, even if they are not associated with a tightly linked postsynaptic specialization. The different conclusions of the present study compared to that of Pereira and colleagues could result from several technical considerations. One of these is that this earlier study used a false fluorescent neurotransmitter thought to selectively label DAergic terminals containing VMAT2, while in the present study, we examined terminals irrespective of whether they contained VMAT2, VGluT2, or potentially other neurotransmitters such as peptides. This could have potentially provided a broader overview of all terminals, especially considering that we found a large subset of Syt1-positive terminals established by DA neurons that are devoid of detectable VMAT2 (see Figures 2G and 6H). Compatible with our observation, a previous study reported that the majority of axonal varicosities established by DA neurons have the capacity to load and release FM1-43.⁷⁰ Furthermore, in the present study, visualization of mitochondria revealed that approximately 60% of the terminals established by VTA and SNc DA neurons contain mitochondria, in line with the hypothesis that a large subset of such terminals is metabolically active. Interestingly, although non-synaptic terminals showed a tendency for a higher occurrence of mitochondria, the difference was small, thus suggesting that irrespective of target cell contact, the energy demands to sustain the vesicular cycle and neurotransmitter release are similar.

4.5 | Presynaptic Nrnx-1 α^{SS4-} and postsynaptic NL-1^{AB} influence synapse formation by DA neurons

Using an artificial synapse coculture assay and a lentiviral vector to overexpress a transsynaptic protein in primary DA neurons, we found that the postsynaptic protein NL-1^{AB} expressed on HEK293T represents an efficient signal to induce presynaptic differentiation of DAergic terminals. We also found that presynaptic Nrnx1 α^{SS4-} overexpression increases the number of excitatory and inhibitory synapses established by DA neurons.

The NL-1 protein is preferentially found at excitatory synapses and directly interacts with the scaffolding protein PSD-95.^{56,79,80} The maintenance and the function of excitatory synapses are regulated by NL-1 via the recruitment of AMPA and NMDA receptors at the postsynaptic domain.⁵⁶ In our *in vitro* experiments, we clearly demonstrated that HEK293T cells expressing the major form of NL-1 (splice variant A⁺B⁺; NL-1^{AB}) attract DA terminals, suggesting that NL-1^{AB} has the potential to induce

presynaptic differentiation of DA terminals. An implication of NL-1 in the establishment of synapses by DA neurons is in line with the fact that some of these neurons establish glutamate synapses and release glutamate as a second neurotransmitter at sites that are synaptic in structure.²² This result is also compatible with our observation that HEK293T cells expressing NL-1^{AB} are able to induce the formation of artificial synapses by DA neuron terminals and with our finding of robust expression of Nrnx-1 β by DA neurons (Figure 9). Nrnx-1 β strongly interacts with NL-1 containing the splice site B, whereas Nrnx-1 α is not able to.³⁰ Considering this ability of NL-1 to promote synapse formation by DA neurons in artificial coculture assay, it is puzzling that in the intact brain, the expression of NL-1 by striatal neurons appears to promote glutamate synapse formation by cortical neurons but not by DA neurons. Further experiments will be needed to solve this question. It is also interesting to note that recent work has provided evidence supporting the possibility that NL-2 regulates the formation of synapses by DA neurons.^{8,81} One possibility is that NL-2 plays a role in the establishment of GABA release sites by DA neurons.^{10,51} The implication of other cell adhesion molecules such as SynCAM2 also needs to be examined as recent work has also revealed the presence of this protein in striatal synaptosomes containing DAergic terminals linked to postsynaptic domains.⁸²

In the context of the strong ability of NL-1 to promote synapse formation by DA neurons, a limited formation of synapses by DA neurons *in vitro* and *in vivo* could perhaps be due to limited levels of Nrnx-1 at individual terminals. Although we found that Nrnx-1 α and Nrnx-1 β are robustly expressed by DA neurons, the fact that DA neurons in rodents are thought to establish upwards of 100 000 individual release sites along their axonal arbor¹⁵ could give rise to limited levels of presynaptic transsynaptic proteins in these terminals. Nrnx-1 levels could therefore represent a limiting factor in the establishment of synapses by DA neurons. Our finding that lentiviral overexpression of Nrnx-1 α (splice variant SS4-; Nrnx-1 α^{SS4-}) in DA neurons leads to an increase in the proportion of terminals establishing synapses agrees with this hypothesis.

Together, our findings shed new light on the peculiar capacity of DA neurons to establish a highly complex axonal arbor endowed with a large repertoire of signaling mechanisms. We envision that the striking, seemingly default capacity of DA neurons to establish an extensive axonal arbor endowed with a large number of axon terminals that appear to actively avoid direct contact with target cells, is likely to be due to a developmental program that is shared with other key modulatory neurons including those using serotonin, norepinephrine, and acetylcholine.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Brooks Robinson and John T. Williams (Oregon Health and Science University) for providing the D2(GFP) knock-in mouse line and for their comments on an early version of this manuscript. They are grateful to Jim Surmeier (Northwestern University) for his kind gift of the mito-RoGFP AAV vector. They also thank Guillaume Fortin for his help in some of the experiments. This work was funded by a grant from Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP106556) to L-E Trudeau. The Trudeau laboratory also received support from the Krembil Foundation, the Brain Canada Foundation, and the Henry and Berenice Kaufmann Foundation. Charles Ducrot received salary support from the GRSNC, Parkinson Canada and from the Fonds du Québec en Recherche, Santé (FRQS). Martin Parent and Constantin Delmas were funded by a grant from CIHR (MOP153068). Ulrich Gether, Freja Herborg, and Matthew Domenic Lycas were funded by the Lundbeck Foundation (2018-792; 2017-4331 and 2016-3154). Hideto Takahashi was funded by a grant from CIHR (PJT159588) and received salary support through the FRQS Research Scholar (Senior) program. Aurelie Fallon received financial support from CIHR, the department of neurosciences of the Université de Montréal, and FRQS in collaboration with Parkinson Quebec. SEM analyses were carried out in the Electron imaging Facility of Université de Montréal. Dainelys Guadarrama received salary support from the FRQS.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.


AUTHOR CONTRIBUTIONS

C. Ducrot designed, performed, analyzed the majority of experiments related to synapse quantifications and wrote the manuscript; M.-J. Bourque and C. Ducrot prepared all cell cultures; C. Ducrot performed and analyzed all the experiments related to FM1-43; A.-S. Racine performed all experiments related to the olfactory bulb and participated in some of the synapse quantifications; C. Ducrot and M.-J. Bourque prepared the cultures and resin inclusions for TEM experiments; C. Delmas performed all the sections, observations, and analyses related to the TEM experiments; M. Domenic Lycas and B. Delignat-Lavaud performed the dSTORM experiments; M. Domenic Lycas analyzed all the data related to the dSTORM experiments; C. Michaud-Tardif performed some of the experiments related to the presynaptic characterization; S. Burke Nanni performed the analysis related to the density of DA terminals; C. Ducrot and D. Guadarrama Bello performed the experiments related to the SEM; C. Ducrot and A. Fallon performed the artificial synapse experiments; A. Nanci provided guidance for SEM sample processing; L.-E. Trudeau designed

and coordinated the project and contributed to writing of the manuscript; M. Parent, H. Takahashi, A. Nanci, F. Herborg, and U. Gether provided conceptual feedback and revised the manuscript.

ORCID

Charles Ducrot  <https://orcid.org/0000-0002-5451-1610>

Benoît Delignat-Lavaud  <https://orcid.org/0000-0003-4680-9115>

Louis-Eric Trudeau  <https://orcid.org/0000-0003-4684-1377>

REFERENCES

1. Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*. 1992;256:1021-1025.
2. Sudhof TC. The presynaptic active zone. *Neuron*. 2012;75:11-25.
3. Kaeser PS, Deng L, Wang Y, et al. RIM proteins tether Ca2+ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell*. 2011;144:282-295.
4. Siddiqui TJ, Pancaroglu R, Kang Y, Rooyakkers A, Craig AM. LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *J Neurosci*. 2010;30:7495-7506.
5. Nguyen T, Sudhof TC. Binding properties of neuroligin 1 and neurexin 1beta reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *J Biol Chem*. 1997;272:26032-26039.
6. Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*. 2000;101:657-669.
7. Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, et al. Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*. 2006;51:741-754.
8. Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*. 2004;119:1013-1026.
9. Chih B, Engelman H, Scheiffele P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*. 2005;307:1324-1328.
10. Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL. Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17:139-145.
11. Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A. Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J Neurosci*. 2010;30:8229-8233.
12. Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, et al. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci*. 2009;29:444-453.
13. Dal Bo G, Berube-Carriere N, Mendez JA, et al. Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience*. 2008;156:59-70.
14. Sulzer D, Joyce MP, Lin L, et al. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci*. 1998;18:4588-4602.
15. Pacelli C, Giguere N, Bourque MJ, Levesque M, Slack RS, Trudeau LE. Elevated mitochondrial bioenergetics and axonal arborization size are key contributors to the vulnerability of dopamine neurons. *Curr Biol*. 2015;25:2349-2360.
16. Giguere N, Delignat-Lavaud B, Herborg F, et al. Increased vulnerability of nigral dopamine neurons after expansion of their

- axonal arborization size through D2 dopamine receptor conditional knockout. *PLoS Genet.* 2019;15:e1008352.
17. Agnati LF, Zoli M, Stromberg I, Fuxe K. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience.* 1995;69:711-726.
 18. Umbriaco D, Watkins KC, Descarries L, Cozzari C, Hartman BK. Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *J Comp Neurol.* 1994;348:351-373.
 19. Descarries L, Beaudet A, Watkins KC. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res.* 1975;100:563-588.
 20. Rice ME, Cragg SJ. Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev.* 2008;58:303-313.
 21. Descarries L, Mechawar N. Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res.* 2000;125:27-47.
 22. Descarries L, Berube-Carriere N, Riad M, Bo GD, Mendez JA, Trudeau LE. Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev.* 2008;58:290-302.
 23. Sesack SR, Aoki C, Pickel VM. Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci.* 1994;14:88-106.
 24. Caille I, Dumartin B, Bloch B. Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res.* 1996;730:17-31.
 25. Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:259-288.
 26. Tritsch NX, Sabatini BL. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron.* 2012;76:33-50.
 27. Kwon HB, Kozorovitskiy Y, Oh WJ, et al. Neuroligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci.* 2012;15:1667-1674.
 28. Song JY, Ichtchenko K, Sudhof TC, Brose N. Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:1100-1105.
 29. Espinosa F, Xuan Z, Liu S, Powell CM. Neuroligin 1 modulates striatal glutamatergic neurotransmission in a pathway and NMDAR subunit-specific manner. *Front Synaptic Neurosci.* 2015;7:11.
 30. Boucard AA, Chubykin AA, Comoletti D, Taylor P, Sudhof TC. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron.* 2005;48:229-236.
 31. Matsushita N, Okada H, Yasoshima Y, Takahashi K, Kiuchi K, Kobayashi K. Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem.* 2002;82:295-304.
 32. Robinson BG, Bunzow JR, Grimm JB, et al. Desensitized D2 autoreceptors are resistant to trafficking. *Sci Rep.* 2017;7:4379.
 33. Mendez JA, Bourque MJ, Dal Bo G, et al. Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci.* 2008;28:6309-6318.
 34. Gong S, Zheng C, Doughty ML, et al. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature.* 2003;425:917-925.
 35. Fasano C, Thibault D, Trudeau LE. Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci.* 2008. Chapter 3, Unit 3 21. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0321s44>
 36. Guadarrama Bello D, Fouillen A, Badia A, Nanci A. A nanoporous titanium surface promotes the maturation of focal adhesions and formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions by osteogenic cells. *Acta Biomater.* 2017;60:339-349.
 37. Rahbek-Clemmensen T, Lycas MD, Erlendsson S, et al. Super-resolution microscopy reveals functional organization of dopamine transporters into cholesterol and neuronal activity-dependent nanodomains. *Nat Commun.* 2017;8:740.
 38. Wang Y, Schnitzbauer J, Hu Z, et al. Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm. *Opt Express.* 2014;22:15982-15991.
 39. Li Y, Mund M, Hoess P, et al. Real-time 3D single-molecule localization using experimental point spread functions. *Nat Methods.* 2018;15:367-369.
 40. El Beheiry M, Dahan M. ViSP: representing single-particle localizations in three dimensions. *Nat Methods.* 2013;10:689-690.
 41. Naito Y, Tanabe Y, Lee AK, Hamel E, Takahashi H. Amyloid-beta oligomers interact with neurexin and diminish neurexin-mediated excitatory presynaptic organization. *Sci Rep.* 2017;7:42548.
 42. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-408.
 43. Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Bosler O, Doucet G. Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol.* 1996;375:167-186.
 44. Fortin GM, Bourque MJ, Mendez JA, et al. Glutamate corelease promotes growth and survival of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci.* 2012;32:17477-17491.
 45. Hnasko TS, Chuhma N, Zhang H, et al. Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron.* 2010;65:643-656.
 46. Dal Bo G, St-Gelais F, Danik M, Williams S, Cotton M, Trudeau LE. Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J Neurochem.* 2004;88:1398-1405.
 47. Fortin GM, Ducrot C, Giguere N, et al. Segregation of dopamine and glutamate release sites in dopamine neuron axons: regulation by striatal target cells. *FASEB J.* 2019;33:400-417.
 48. Parent M, Parent A. Relationship between axonal collateralization and neuronal degeneration in basal ganglia. *J Neural Transm Suppl.* 2006;85-88.
 49. Altmann WD, tom Dieck S, Sokolov M, et al. Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon. *Neuron.* 2003;37:787-800.
 50. Liu C, Kershberg L, Wang J, Schneeberger S, Kaeser PS. Dopamine secretion is mediated by sparse active zone-like release sites. *Cell.* 2018;172:706-718.e15.
 51. Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature.* 2012;490:262-266.
 52. Perez-Lopez JL, Contreras-Lopez R, Ramirez-Jarquín JO, Tecuapetla F. Direct glutamatergic signaling from midbrain dopaminergic neurons onto pyramidal prefrontal cortex neurons. *Front Neural Circuits.* 2018;12:70.
 53. Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinsky AS. Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1996;16:3166-3177.

54. Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7:368-373.
55. Devine MJ, Kittler JT. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19:63-80.
56. Budreck EC, Kwon OB, Jung JH, et al. Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:725-730.
57. Barrow SL, Constable JR, Clark E, El-Sabeawy F, McAllister AK, Washbourne P. Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev.* 2009;4:17.
58. Tabuchi K, Sudhof TC. Structure and evolution of neuroligin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics.* 2002;79:849-859.
59. Gonzalez-Hernandez T, Barroso-Chinea P, Acevedo A, Salido E, Rodriguez M. Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons. *Eur J Neurosci.* 2001;13:57-67.
60. Zhang S, Qi J, Li X, et al. Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat Neurosci.* 2015;18:386-392.
61. Silm K, Yang J, Marcott PF, et al. Synaptic vesicle recycling pathway determines neurotransmitter content and release properties. *Neuron.* 2019;102:786-800.e5.
62. Li X, Qi J, Yamaguchi T, Wang HL, Morales M. Heterogeneous composition of dopamine neurons of the rat A10 region: molecular evidence for diverse signaling properties. *Brain Struct Funct.* 2013;218:1159-1176.
63. Wang SSH, Held RG, Wong MY, Liu C, Karakhanyan A, Kaeser PS. Fusion competent synaptic vesicles persist upon active zone disruption and loss of vesicle docking. *Neuron.* 2016;91:777-791.
64. Han Y, Kaeser PS, Sudhof TC, Schneggenburger R. RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron.* 2011;69:304-316.
65. Mukherjee K, Yang X, Gerber SH, et al. Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:6504-6509.
66. Krueger SR, Kolar A, Fitzsimonds RM. The presynaptic release apparatus is functional in the absence of dendritic contact and highly mobile within isolated axons. *Neuron.* 2003;40:945-957.
67. Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ. Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci.* 2000;3:445-451.
68. Couteaux R. The differentiation of synaptic areas. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1963;158:457-480.
69. Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat.* 1959;93:420-433.
70. Daniel JA, Galbraith S, Iacovitti L, Abdipranoto A, Vissel B. Functional heterogeneity at dopamine release sites. *J Neurosci.* 2009;29:14670-14680.
71. Eid L, Parent M. Morphological evidence for dopamine interactions with pallidal neurons in primates. *Front Neuroanat.* 2015;9:111.
72. Berube-Carriere N, Guay G, Fortin GM, et al. Ultrastructural characterization of the mesostriatal dopamine innervation in mice, including two mouse lines of conditional VGLUT2 knockout in dopamine neurons. *Eur J Neurosci.* 2012;35:527-538.
73. Berube-Carriere N, Riad M, Dal Bo G, Levesque D, Trudeau LE, Descarries L. The dual dopamine-glutamate phenotype of growing mesencephalic neurons regresses in mature rat brain. *J Comp Neurol.* 2009;517:873-891.
74. Trudeau LE, El Mestikawy S. Glutamate cotransmission in cholinergic, GABAergic and monoamine systems: contrasts and commonalities. *Front Neural Circuits.* 2018;12:113.
75. Trudeau LE, Hnasko TS, Wallen-Mackenzie A, Morales M, Rayport S, Sulzer D. The multilingual nature of dopamine neurons. *Prog Brain Res.* 2014;211:141-164.
76. El Mestikawy S, Wallen-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12:204-216.
77. Wall NR, De La Parra M, Callaway EM, Kreitzer AC. Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron.* 2013;79:347-360.
78. Pereira DB, Schmitz Y, Meszaros J, et al. Fluorescent false neurotransmitter reveals functionally silent dopamine vesicle clusters in the striatum. *Nat Neurosci.* 2016;19:578-586.
79. Irie M, Hata Y, Takeuchi M, et al. Binding of neuroligins to PSD-95. *Science.* 1997;277:1511-1515.
80. Bolliger MF, Frei K, Winterhalter KH, Gloor SM. Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem J.* 2001;356:581-588.
81. Uchigashima M, Ohtsuka T, Kobayashi K, Watanabe M. Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:4206-4211.
82. Pfeffer ME, Pronot M & Angelo M-F, et al. Synaptic and supra-synaptic organisation of the dopaminergic projection to the striatum. *bioRxiv.* 2020.02.18.952978. <https://doi.org/10.1101/2020.02.18.952978>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Ducrot C, Bourque M-J, Delmas CVL, et al. Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *The FASEB J.* 2021;35:e21791. <https://doi.org/10.1096/fj.20210201RR>

Article original II

Délétion conditionnelle de l'ensemble des neurexines
dans les neurones dopaminergiques

Neurexins Regulate GABA Co-release by Dopamine Neurons

Charles Ducrot^{1,2,3}, Gregory de Carvalho⁴, Benoît Delignat-Lavaud^{1,2,3}, Constantin V.L. Delmas⁵, Nicolas Giguère^{1,2,3}, Sriparna Mukherjee^{1,2,3}, Samuel Burke-Nanni^{1,2,3}, Marie-Josée Bourque^{1,2,3}, Martin Parent⁵, Lulu Y. Chen^{4,*} and Louis-Éric Trudeau^{1,2,3,*}

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

²Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal

³CNS Research Group (GRSNC),

Montréal, QC, Canada H3C 3J7

⁴Department of Anatomy and Neurobiology,

School of Medicine, University of California,

Irvine, CA, USA 92697

CERVO Brain Research Centre, Department of Psychiatry and Neurosciences,

Faculty of Medicine, Université de Laval

*Co-corresponding authors

Contact information:

Dr. Louis-Éric Trudeau
louis-eric.trudeau@umontreal.ca
Phone: 514-343-5692

Dr. Lulu Y. Chen
chenly@uci.edu
Phone: 949-824-3503

Summary

Midbrain dopamine (DA) neurons are key regulators of basal ganglia functions. The axonal domain of these neurons is highly complex, with a large subset of non-synaptic release sites and a smaller subset of synaptic terminals from which glutamate or GABA are released. The molecular mechanisms underlying the neurotransmission mediated by DA neuron axon terminals is unknown. Here we tested the hypothesis that the trans-synaptic cell adhesion molecules neurexins (Nrxns) regulate DA neuron neurotransmission. Conditional deletion of all Nrxns in the DA neurons (DAT::Nrxns KO) revealed that loss of Nrxns does not impair the ultrastructural characteristics of DA neuron terminals. However, electrophysiological recording revealed an increase of GABA co-release from DA neuron axons in the KO. Loss of Nrxns also caused an impairment of DA transmission revealed as a reduced rate of DA reuptake following activity-dependent DA release, decreased DA transporter immunoreactivity, increased vesicular monoamine transporter expression and impaired locomotor activity. These findings reveal that Nrxns act as key regulators of DA connectivity and DA-mediated functions.

Highlights

- The study provides the first direct evidence on the role of neurexins in dopaminergic neurons
- Synaptic adhesion molecules, neurexins, are not required for maintaining the structure of dopamine neuron release sites.
- Dopamine neurons lacking neurexins show increased GABA co-release.
- Neurexins regulates dopaminergic neurotransmission through the dopamine reuptake mechanism and impacts amphetamine-induced locomotion

Introduction

Dopamine (DA) neurons from the ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra compacta (SNc) project densely to the ventral striatum (VS) and to the dorsal striatum (DS), respectively, (Descarries et al., 1980; Matsuda et al., 2009) and are critical regulators of basal ganglia functions, motivation, and cognition (Schultz, 2007; Surmeier et al., 2014). The connectivity of the DA system is particularly intriguing due to the dual character of its axonal domain, that some terminals are synaptic, but predominantly non-synaptic (Descarries et al., 2008; Ducrot et al., 2021). Interestingly, the synaptic subset of DA neuron terminals has the ability to co-release glutamate and GABA (Sulzer et al., 1998; Dal Bo et al., 2004; Mendez et al., 2008; Stuber et al., 2010; Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2016). In contrast, the much larger contingent of non-synaptic release sites, defined as terminals not located in close apposition to a postsynaptic domain, established by DA neurons appear to be specialized for DA release (Caille et al., 1996; Descarries et al., 1996; Descarries and Mechawar, 2000; Descarries et al., 2008; Ducrot et al., 2021). The molecular mechanisms underlying the formation and regulation of non-synaptic terminals is presently undetermined. However, a growing body of work has highlighted the functional role of trans-synaptic cell adhesion molecules such as neurexins (Nrxns) and neuroligins (NLs) orchestrating synaptic functions and plasticity at the synaptic terminals (References Zhang et al 2015, Chen et al, 2017).

Nrxns are presynaptic cell adhesion molecules that were identified as α -latrotoxin receptors (Ushkaryov et al., 1992). In mammals, Nrxns are expressed in two principal forms, including longer α -neurexins isoforms and shorter β -neurexins isoforms (Tabuchi and Sudhof, 2002). The Nrxn proteins form synaptic contacts with postsynaptic NL proteins and are involved in the regulation of synapse formation and function (Ichtchenko et al., 1995; Graf et al., 2004; Ko et al., 2009). While Nrxns is the only binding partner for the NLs, Nrxns have multiple postsynaptic partners and it can splice into more than thousands of variants. Each Nrxn variant has differential

expressions, specifications, and affinities for different ligands. Several key studies using the Nrnxns conditional knockout mice to selectively delete Nrnxns in specific regions demonstrated that Nrnxns regulate neurotransmission through different mechanisms in a synaptic context-dependent manner (Luo 2020, 2021, Chen 2017).

Despite the importance of DA functions, limited studies have explored the molecular mechanism underlying the unique nature of the axonal arbor and connectivity of DA neurons as well as the potential role of Nrnxns in the DA synapses. We tested our hypothesis that Nrnxns, like in other synapses, mediates DA neuron connectivity and function through deleting all Nrnxns from DA neurons by crossing DAT-IRES-Cre mice with Nrnxn123 α/β floxed mice [Nrnxn123 Triple conditional KO mice (Chen et al., 2017)]. We found that the density and the ultrastructure of synapses established by DA neurons was not affected. However, electrophysiology recordings revealed that DA axon-specific optogenetically-evoked GABA-mediated synaptic currents in the KO mice were increased selectively in the ventral striatum, suggesting a negative regulatory role of Nrnxns on GABA co-transmission. DA signaling was also altered after loss of Nrnxns, as revealed by a slower DA reuptake, decreased number of DA transporter (DAT) and increased number of vesicular monoamine transporter (VMAT2), and followed by an impaired amphetamine-induced locomotion and motor coordination compared).

Results

Nrnxn123 ablation does not impair synapse ultrastructure in dopamine neurons.

VTA DAergic neurons project mainly to the vSTR with terminals that are typically non-synaptic in structure, but with a subset that are synaptic and from which glutamate or GABA can be released in addition to DA (Mendez et al., 2008; Stuber et al., 2010; Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2014). We deleted Nrnxn 1, 2 and 3 from DA neurons by crossing Nrnxn123^{lox/lox} mice with DAT-IRES-Cre mice (DAT::NrnxnsKO) to study the role of Nrnxns in the structure and function of neurotransmitter release sites of DA neurons. We hypothesized that the conditional deletion of all

Nrxns would lead to an alteration of synapse integrity at the terminals of these neurons in the striatum. We examined the ultrastructure of DA terminals located in the vSTR using transmission electron microscopy (TEM). Overall, we found that irrespective of the genotype, most axonal varicosities contained synaptic vesicles and mitochondria (**Fig.1A** and **1B**). The high resolution TEM images allow us to further examined the parameters of each synaptic terminal by measuring the overall perimeters (P), the width (w), and length (L) in the TH-positive synapses containing dense postsynaptic densities (PSD) (**Fig. 1C**). Combining these analyses in 2D allow us to have an overall view of the structures of these terminals. Our results showed that the TH-positive DA terminals in the vSTR of Nrxn123 KO was not different compared to Nrxn123 WT mice (**Fig. 1D**; perimeter: 2227 ± 81.83 nm and 1870 ± 174.8 nm, respectively, unpaired t-test, $t_6=0.07$; $p=0.94$). Analysis of the varicosity length, width and surface area, failed to reveal any difference between DA axon terminals from DAT::NrxnsWT and DAT::NrxnsKO (**Fig. 1E, 1F** and **1G**; length: 897.3 ± 38.06 nm and 902.7 ± 38.06 nm respectively, unpaired t-test, $t_6=0.72$; $p=0.94$; width: 468.7 ± 38.06 nm and 375.2 ± 22.02 nm, respectively, unpaired t-test, $t_6=0.84$; $p=0.43$; surface area: 323537 ± 45861 nm² and 317887 ± 40227 nm², respectively, unpaired t-test, $t_6=0.09$, $p=0.92$). We next examined the synaptic incidence of DA neuron terminals and found it unchanged in the absence of Nrxns123. The incidence of TH-positive terminals associated to postsynaptic domain (PSD) was 6.34% (12/189 examined varicosities) for DAT::NrxnsKO mice and 4.95% (5/101 examined varicosities) for control mice. The size of the PSD was also unchanged (**Fig. 1H**); DAT::NrxnsWT = 232.8 ± 23.40 nm and DAT::NrxnsKO = 197.1 ± 35.71 nm, unpaired t-test, $t_{15}=0.61$, $p=0.54$). Together these results show that loss of Nrxns123 does not impair the basic ultrastructure of DA neuron neurotransmitter release sites in the vSTR.

A subset of DA terminals along their complex axonal arbor have the capacity to release glutamate and GABA (Sulzer et al., 1998; Tritsch et al., 2012; Zhang et al., 2015; Tritsch et al., 2016), we hypothesized that deletion of Nrxns could alter the formation of excitatory or inhibitory

synapses by SNc and VTA DA neurons. To test this, we co-cultured DA neurons with striatal neurons as previously described (Ducrot et al., 2021) and examined DAergic axon terminals in close proximity to postsynaptic organizers associated with glutamate (PSD95) and GABA (gephyrin) synapses (Craig et al., 1996; Kornau et al., 1997). We observed that loss of Nrnxns changes the proportion of SNc, but not VTA DA neuron terminals colocalizing with PSD95 (**Fig. 2A, 2B and 2C**; Two-way ANOVA, main effect of region, $p=0.065$; Sidak's multiple comparison test, SNc WT vs SNc KO DA neurons, $p=0.035$). Similar results were obtained with the inhibitory postsynaptic protein gephyrin, with a decrease of the proportion of SNc DA neuron terminals colocalizing with gephyrin. No change was observed for VTA DA neurons (**Fig. 2D**; Two-way ANOVA, main effect of region, $p=0.065$; Sidak's multiple comparison test, SNc WT vs SNc KO DA neurons, $p=0.035$). Finally, we evaluated the proportion of DA terminals expressing the glutamatergic active zone protein bassoon. In previous work, we showed that most bassoon-positives DA terminals are in close proximity to target cells, and thus most likely to be found at synapses. We found a significant decrease in the proportion of SNc DA terminals that were bassoon positive (SNc WT= $49.38 \pm 6.26\%$; SNc cKO= $23.40 \pm 2.55\%$; **Fig. 2E**). This effect was selective for SNc DA neurons as no difference was found for VTA DA neurons (**Fig. 2E**). We conclude that while loss of Nrnxns did not cause a major disruption of the axonal connectivity of VTA and SNc DA neurons, these transsynaptic proteins may regulate active zone subcellular organization as previously observed (Luo et al., 2020).

Dopamine neuron axonal arbor development is not impaired by deletion of all Nrnxns.

Nrnxns have been previously reported to influence the axonal development of neurons (Wang et al., 2019) we next examined the development of postnatal DA neurons *in vitro* and quantified the expression of key axon terminal proteins. For this, we prepared primary co-cultures of DA neurons from SNc and VTA and striatal neurons from ventral striatum of postnatal day (P) 0-3 pups from the DAT::NrnxnsKO and DAT::NrnxnsWT P0-P3 pups. DA neurons were identified

by TH immunocytochemistry and automated epifluorescence imaging (**Fig. 3A**). The survival of DA neurons in DAT::NrxnsKO cultures over 14 days was significantly reduced compared to WT controls (**Fig. 3B**) (main effect of genotype, Two-way ANOVA, $p=0.03$) in both SNc and VTA (SNc WT= 55.00 ± 14.18 ; SNc KO= 33.78 ± 2.84 ; VTA WT= 81.33 ± 12.62 ; VTA KO= 52.18 ± 11.72). However, neurite development, quantified as the number and size of TH-positive branches was not different across genotype and region (**Fig. 3C and 3D**). (*Branches length*: SNc WT= $19086 \pm 1749\mu\text{m}$, SNc KO= $14950 \pm 2068 \mu\text{m}$, VTA WT= $34721 \pm 9282 \mu\text{m}$, VTA KO= $30593 \pm 4715 \mu\text{m}$, Two-way ANOVA, $p=0.47$; *Number of branches*: SNc WT= 598.9 ± 143.3 , SNc KO= 588.2 ± 99.37 , VTA WT= 795.4 ± 152.6 , VTA KO= 945.7 ± 225.7 ; Two-way ANOVA, $p=0.69$). In a second set of analyses, we also examined some of the characteristics of axon terminals established by DAT::NrxnsKO and DAT::NrxnsWT DA neurons (**Fig. 3E to 3H**). For this, fields containing axonal arbors were selected and double labelling for TH, to visualize all varicosities and the ubiquitous exocytosis Ca^{2+} sensor for Syt1, revealed that the proportion of Syt1-positive axonal varicosities was not different across genotypes (**Fig. 3E, 3F, 3I**). $69.47 \pm 3.60\%$ and $62.03 \pm 3.97\%$ of varicosities established by SNc and VTA DA neurons from DAT::NrxnsWT mice, respectively, were positive for Syt-1 (**Fig. 3E and 3I**). This proportion was not significantly different for SNc and VTA DA neurons from DAT::NrxnsKO mice ($70.31 \pm 3.38\%$ and $55.60 \pm 3.92\%$, respectively; Two-way ANOVA, $p=0.93$; **Fig. 3F and 3I**). The proportion of axon terminals containing VMAT2, and thus capable of packaging DA in synaptic vesicles was also unchanged (**Fig. 3G, 3H, 3J**). We found a similar proportion of VMAT2-positive DA terminals between SNc and VTA DA neurons from DAT::NrxnsWT animals ($60.10 \pm 3.29\%$ and $46.11 \pm 3.34\%$; **Fig. 3G and 3J**) and DAT::NrxnsKO animals ($53.58 \pm 3.81\%$ and $47.30 \pm 2.86\%$, respectively, Two-way ANOVA, $p=0.42$; **Fig. 3H and 3J**). We conclude that although loss of Nrxns may decrease the resilience of DA neurons, it does not alter the intrinsic capacity of these neurons to develop an axonal domain and to establish neurotransmitter release sites.

Deletion of Nrnxns in dopamine neurons does not impair basal motor activity but reduces motor coordination and amphetamine-induced locomotion.

As our *in vitro* results suggested possible alterations in the connectivity of DA neurons after loss of Nrnxns, we next examined the behavior of conditional Nrnxn123 KO mice. DA neurons and their widespread connections are key regulators of movement, motivation and reward-dependent learning, we hypothesized that altered connectivity due to loss of Nrnxns could cause impaired DA-dependent behaviors. Several studies using mouse lines with impaired DA transmission have shown deficits in basal or psychostimulant-evoked locomotion and learning on the accelerating rotarod (Zhou and Palmiter, 1995; Ogura et al., 2005; Birgner et al., 2010). In the first series of experiment, we evaluated motor coordination and learning using the accelerating rotarod task according to two different protocols (**Fig. 4A**). The first protocol evaluated the rate of learning to perform this task over a total of 9 sessions during 3 days, with two sessions performed on the first day, three sessions the second day and four sessions on the third day, with a speed of rotation accelerating from 4 to 40 rpm over 10min. The measure of the latency to fall did not reveal a significant difference between the genotypes, with all groups showing a comparable increase in performance [**Fig. 4B**, two-way ANOVA, $p=0.22$; WT $n=8$; HET $n=9$ and KO $n=8$ mice]. Similar results were obtained when evaluating the progression of the performance of the mice by comparing performance on the first and last sessions, with all mice showing equivalent learning [(**Fig. 4C**, paired t-test, WT ($t_7=5.15$, $p=0.0013$); HET ($t_8=4.11$ $p=0.034$); KO ($t_7=3.96$ $p=0.0055$)]. The speed of rotation at the end of each trial across all 9 trials was also unchanged (**Fig. 4D**) [two-way ANOVA, $p=0.08$, $F(2, 24)=2.78$]. However, testing a separate cohort of mice with a more challenging version of the rotarod task (**Fig. 4A**), with speed of rotation accelerating from 4 to 40 rpm over 2 min, revealed that the rate of motor coordination, calculated by the latency to fall, was significantly lower in DAT::NrnxnsKO and DAT::NrnxnsHET compared to DAT::NrnxnsWT [**Fig. 4E**, Main effect of genotype, two-way ANOVA, $p<0.0001$, $F(2, 24)=24.64$; WT $n=10$; HET $n=14$

and KO n=8 mice]. Furthermore, in this task, performance failed to improve over the trials, revealing a limited capacity to improve performance, as shown by comparing performance in the last session compared to the first (**Fig. 4F**) (paired t-test, WT ($t_9 = 0.71$, $p=0.49$); HET ($t_{13}=0.89$ $p=0.38$); KO ($t_7=1.34$ $p=0.22$)]. The speed of rotation at the end of each trial across all 9 trials (**Fig. 4G**) was slower in DAT::NrxnsKO mice compared to the control mice (Main effect of genotype, two-way ANOVA, $p<0.0001$). These results suggest that deletion of Nrxn123 from DA neurons leads to a motor coordination deficit when the task is challenging.

General motor abilities were evaluated using the pole test and the open field test. In the pole test (**Fig. S1A**), no difference was observed between genotypes for the time required for the mice to orient downward (**Fig. S1B**) (WT= 7.10 ± 1.50 sec; HET= 5.45 ± 1.20 sec; KO= 4.57 ± 0.75 sec; one-way ANOVA, $p=0.4$) and for the time required to climb-down the pole (**Fig. S1C**) (WT= 5.80 ± 0.53 sec; HET= 7.18 ± 0.62 sec; KO= 8.14 ± 0.93 sec; one-way ANOVA, $p=0.07$; WT n=10; HET n=11 and KO n=7 mice). Basal locomotion in the open field over a 60-min period was not different between genotypes (**Fig. 4H**; WT n=10; HET n=11 and KO n=10 mice). Locomotion induced by the psychostimulant drug cocaine (5mg/Kg) was also comparable between genotypes (**Fig. 4I**, Two-way ANOVA, $p=0.67$; WT n=10; HET n=11 and KO n=8 mice). However, locomotion induced in response to amphetamine (Di Chiara and Imperato, 1988) was strongly reduced in DAT::NrxnsKO mice compared to DAT::NrxnsHET and DAT::NrxnsWT mice (**Fig. 4J**, two-way ANOVA, $p=0.0001$). The maximal effect was observed between 30 to 40 min post-injection (**Fig. 4J**; Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, DAT::NrxnsKO vs WT. $t=50$ min: $p=0.03$; $t=55$ min: $p=0.01$; $t=60$ min: $p=0.02$; WT n=7; HET n=7 and TKO n=8 mice). These results suggest that loss of Nrxns in DA neurons leads to altered DA neurotransmission and DA-dependent behaviors.

Because altered DA neurotransmission is often associated with altered motivational states, we next examined the performance of the mice in a well-established sucrose preference task. On

the initial two conditioning days (CD1 and CD2), mice of all genotypes equally licked at both bottles (**Fig. 4K**) (DAT::NrxnsKO CD1: $51.87 \pm 2.25\%$ vs $49.36 \pm 2.38\%$ and CD2: $53.59 \pm 3.55\%$, vs $43.85 \pm 2.76\%$; DAT::NrxnsHET CD1: $51.65 \pm 2.57\%$ vs $48.34 \pm 2.38\%$ and CD2: $50.07 \pm 3.40\%$, vs $49.92 \pm 3.40\%$; DAT::NrxnsWT CD1: $51.87 \pm 2.25\%$ vs $49.36 \pm 2.38\%$ and CD2: $53.59 \pm 3.55\%$, vs $43.85 \pm 2.76\%$; results are presented as the percentage of choice water/water;). Similarly, during the next 3 testing days (TD1, 2 and 3), when mice were given the choice between water and sucrose, DAT::NrxnsKO, HET and WT mice showed a similar marked preference for the sucrose bottle (**Fig. 4L**) (DAT::NrxnsKO TD1: $81.25 \pm 3.33\%$ vs $18.75 \pm 3.33\%$; TD2: $53.59 \pm 3.55\%$, vs $43.85 \pm 2.76\%$ and TD3: $79.34 \pm 1.63\%$ vs $20.65 \pm 1.63\%$; DAT::NrxnsHET TD1: $79.34 \pm 1.63\%$ vs $20.65 \pm 1.63\%$; TD2: $73.63 \pm 2.35\%$, vs $26.36 \pm 2.35\%$ and TD3: $79.16 \pm 1.30\%$ vs $20.83 \pm 1.30\%$; DAT::NrxnsWT TD1: $51.87 \pm 2.25\%$ vs $49.36 \pm 2.38\%$; TD2: $53.59 \pm 3.55\%$, vs $43.85 \pm 2.76\%$ and TD3: $53.59 \pm 3.55\%$, vs $43.85 \pm 2.76\%$; All results are presented as the percentage of choice Sucrose/Water; WT n=6; HET n=6 and TKO n=6 mice). These findings suggest that the response of mice to natural rewards was unaltered by loss of Nrxns in DA neurons.

Fast Scan Cyclic Voltammetry reveals normal DA release but slower reuptake after conditional deletion of all Nrxns in DA neurons.

The impaired response to amphetamine suggests a perturbation of extracellular DA dynamics or DA action on target cells. To examine this possibility, we first employed fast scan cyclic voltammetry (FSCV) to measure electrically-evoked DA overflow in acute brain slices of the ventral and dorsal striatum (vSTR and dSTR). In the dSTR, we found no difference in peak DA overflow between the DAT::NrxnsWT and DAT::NrxnsKO mice ($1.33 \pm 0.05\mu\text{M}$ and $1.35 \pm 0.07\mu\text{M}$, respectively), but surprisingly, in the DAT::NrxnsHET mice, DA release was significantly lower ($1.05 \pm 0.05\mu\text{M}$; One-way ANOVA, $p=0.001$, Dunnett's comparison test, WT vs HET, $p=0.002$ and HET vs KO, $p=0.006$) compared to the WT and KO mice (**Fig. 5A and 5B**). An examination of the kinetics of DA overflow, often used to identify changes in DA release

efficiency and reuptake (Yorgason et al., 2011), revealed that DA reuptake was significantly slower in the dSTR of DAT::NrxnsKO and DAT::NrxnsHET compared to the DAT::NrxnsWT mice (One-way ANOVA, main effect of genotype, $p=0.0037$) as illustrated by higher Tau values (**Fig. 5A** and **5C**; KO= 0.45 ± 0.03 ; HET= 0.47 ± 0.02 ; WT= 0.36 ± 0.02 , WT vs KO $p=0.034$; WT vs HET $p=0.041$). A similar difference was also detected in the vSTR (**Fig. 5E** and **5G**; One-way ANOVA, main effect of genotype, $p=0.0037$; KO= 0.45 ± 0.03 ; HET= 0.47 ± 0.02 ; WT= 0.36 ± 0.02 , WT vs KO $p=0.034$; WT vs HET $p=0.041$).

Quantification of the rise-time of evoked DA overflow in the dSTR revealed a slower rise time in DAT::NrxnsHET mice compared to DAT::NrxnsWT mice (**Fig. S2A**; 0.25 ± 0.01 s compared to 0.22 ± 0.01 s, respectively, one-way ANOVA, Holm-Šidák's multiple comparison test, $p=0.044$). No differences were found in the vSTR (**Fig. S2B**).

Short-term plasticity of electrically evoked DA release in striatal sections was examined using a paired-pulse stimulation paradigm (inter-pulse interval (IPI) of 100ms). DA overflow in acute brain slices typically shows a large paired-pulse depression, more extensively so in the dSTR compared to the vSTR (Sanchez et al., 2014). We found that the level of paired-pulse depression was similar in DAT::NrxnsKO mice compared to the WT group in the dSTR (**Fig. 5D**) (Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, $p=0.022$). However, in the vSTR, paired-pulse depression was significantly enhanced in DAT::NrxnsKO mice compared to WT (**Fig. 5H**; Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, $p=0.022$). Plasticity of DA overflow was also examined by measuring the inhibition of DA overflow induced by the GABA_B agonist baclofen (10 μ M) (Lopes et al., 2019). This was particularly interestingly to examine in light of the results of a recent study demonstrated the role of Nrxn123 in the regulation of expression and location of presynaptic receptor (Luo et al., 2021). Baclofen induced a robust decrease of evoked DA overflow, however, this was not different across genotypes (**Fig. S1C**; Two-way ANOVA, $p=0.93$).

Together these observations suggest that Nrnxns, while not required for DA release, play a role in regulating DA neurotransmission, including through regulation of DA reuptake and short-term plasticity in the vSTR.

GABA release by dopamine neurons is increased in the ventral striatum of DAT::NrnxnsKO mice.

To examine the role of Nrnxns in GABA and glutamate mediated synaptic functions by DA neurons, we performed whole-cell patch-clamp electrophysiological recordings in medium spiny neurons of the vSTR and dSTR in DAT::NrnxnsWT, HET and KO littermates. Chr2-EYFP was selectively expressed in DA neuron axons using a conditional AAV construct (**Fig. 6A**). Most DA neurons in the VTA and SNc were infected by the virus as revealed by the presence of EYFP signal (**Fig. 6B**). We first isolated GABA-mediated inhibitory synaptic currents evoked by optical stimulation of DA neurons axons (oIPSC) and found a significant increase in the amplitude of oIPSCs in the Nrnxn123 KO slices (**Fig. 6C**; *Peak Amplitude*: WT = -40.02 ± 4.7 pA, HT = -91.99 ± 14.9 pA, KO = -136.32 ± 30.62 , Mean \pm SEM), with no change in electrically evoked GABA currents (eIPSC; **Fig. S3A**; *Peak Amplitude*: WT = -722.64 ± 174.29 pA, HT = -406.01 ± 80.15 pA, KO = -680.89 ± 141.06 , Mean \pm SEM). These data show that Nrnxns regulate GABA synaptic events in these mice in a synapse-specific manner. As expected, oIPSCs were blocked by picrotoxin (50 μ M), confirming their GABAergic nature (**Fig. S4A**). Disruption of VMAT2 function using reserpine (1 μ M) also blocked oIPSCs, in line with previous work showing that GABA release by DA neurons requires paradoxical vesicular packaging of GABA by VMAT2 (Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2014) (**Fig. S4C**). Paired-pulse stimulation revealed no change in synaptic plasticity in both HET and KO genotype groups compared to wild-type littermates (**Fig. S6**), suggesting that removing Nrnxns in DA neurons did not modify the probability of GABA or glutamate release by DA neurons.

Closer analysis of the kinetics of GABA-mediated oIPSCs in the ventral striatum revealed a significant slowing of oIPSC decay time (oIPSC, Decay Time (90% - 10%): WT = 13.8 ± 2.5 ms,

HT = 31.6 ± 4.2 ms, KO = 36.2 ± 8.3 ms, Mean \pm SEM; **Fig. 6B, S6A-D**) and decay time constant (oIPSC, Tau: WT = 18.9 ± 2.8 ms, HT = 65.3 ± 13.5 ms, KO = 67.1 ± 21.8 ms, Mean \pm SEM; **Fig. S5**) in both DAT::NrxnsKO and DAT::NrxnsHET mice.

As our manipulation affected the entire mesolimbic pathway, we also performed parallel opto-stimulation recordings in the dorsal striatum. We observed no changes in oIPSC amplitude in DAT::NrxnsKO mice in the dorsal striatum (**Fig. 6E**; Peak Amplitude: WT = -528.50 ± 187.31 pA, HT = -219.68 ± 54.87 pA, KO = -138.03 ± 34.57 , Mean \pm SEM). oIPSC decay time was also unchanged (**S6E-H**), as for spontaneous or electrically-evoked GABA IPSCs (**Fig. 6H, Fig. S3A and S3C**).

Together these results suggest that Nrxns act as regulators of GABA co-transmission by DA neurons in a regionally-selective manner. Given that we observed a compensatory increase in the density of VMAT2 in the KO group, increased packaging of GABA by this transporter represents a possible mechanism underlying this increased GABA release by DA neurons. Furthermore, the origin of this selectivity is presently unclear, but could result for example from differential presynaptic Nrxn expression in both regions. For example, if NRXN2 is more prevalent than NRXN1 and NRXN3 in dopaminergic terminals in the ventral striatum, this would result in a different role for Nrxns within that region.

Optically evoked excitatory transmission is unaltered in the ventral striatum of DAT::NrxnsKO mice.

We also examined glutamate release by DA neurons in the ventral striatum and did not detect differences in optically-evoked glutamate-mediated EPSCs (oEPSCs), suggesting that deletion of Nrxns in DA neurons does alter glutamate release from these neurons (**Fig. 7A**). The frequency and amplitude of spontaneous EPSCs (sEPSCs) in the ventral striatum was also unchanged (**Fig. 7C**). However, surprisingly, we detected a significant increase of the amplitude of EPSCs evoked by local electrical stimulation in the ventral striatum (**Fig. S3B**; Peak Amplitude:

WT = -71.03 ± 11.9 pA, HT = -84.2 ± 6.76 pA, KO = -124.8 ± 10.15 , Mean \pm SEM). Similarly, we did not observe any change in glutamate-mediated EPSCs in the dorsal striatum (**Fig. 7B and S3**). These results suggest that while Nrxns do not have a significant role in regulating glutamate release from DA neurons, loss of Nrxns in DA neurons may perhaps indirectly influence the development of glutamatergic projections to the ventral striatum. However, the increase in eEPSCs opens the possibility that Nrxn deletion impact the development of DAergic projections to the non-striatal regions such as the anterior olfactory nucleus, piriform area, and lateral septal nucleus (Ma et al., 2020).

The paired-pulse ratio and input-output relationship of electrically-evoked IPSCs were unchanged (**Fig. S5**). Interestingly, the frequency of spontaneous IPSCs (sIPSCs) was also significantly increased in the KO group (**Fig. 7A**; *sIPSC Frequency*, WT = 2.79 ± 0.61 Hz, HT = 3.72 ± 0.74 Hz, KO = 6.06 ± 1.04 Hz, Mean \pm SEM).

Altered GABA uptake and VMAT2 suggest a possible mechanism underlying increased GABA release in Nrxns KO mice.

The region-specific increase of GABA release from DA axons in DAT::NrxnsKO mice, identified in our optogenetic experiments, could result from different mechanisms. While DA neurons have the capacity to co-release GABA, it is well established that they do not synthesize it using glutamic acid decarboxylase and do not express the vesicular GABA transporter (Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2014). Instead, they have been shown to use plasma membrane transporters to uptake GABA from the extracellular medium and VMAT2 to package it into synaptic vesicles (Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2014). We therefore used a GABA uptake assay using primary DA neurons and quantified VMAT2 levels in the striatum.

GABA uptake was estimated using cultures prepared from DA neurons co-cultured with vSTR or dSTR neurons. Neurons were incubated with GABA (100 μ M) for 2h, rapidly washed and fixed before quantification of GABA immunoreactivity, evaluating the proportion of TH signal in

DA axons covered by GABA immunoreactivity in comparison to a control group treated with H₂O (**Fig. 8A**). This treatment induced a robust increase in GABA immunoreactivity in DA neuron axons (**Fig. 8B**). Interestingly, SNc DA neurons globally showed a larger GABA uptake compared to VTA DA neurons (**Fig. 8B and 8C**; Main effect of region; two-way ANOVA, $p < 0.001$, $F(1, 76) = 53.35$). Furthermore, we observed an increase of GABA uptake in DAT::NrxnsKO DA neurons compared to DAT::NrxnsWT DA neurons (two-way ANOVA, main effect of genotype, $p = 0.014$). However, no difference was observed between VTA DA neuron from DAT::NrxnsKO mice and VTA DA neurons from DAT::NrxnsWT mice (**Fig. 8B**; $p = 0.20$).

We next examined the level of VMAT2 in DA neuron axons in the striatum of DAT::NrxnsKO mice compared to controls, as well TH and DAT. A first global quantification of striatal tissue levels by Western Blot (**Fig. S7A and S7E**), revealed a lack of overall changes in the levels of TH and VMAT2 in DAT::NrxnsKO mice, in both vSTR and dSTR (**Fig. S7B, S7C, S7F and S7G**). However, DAT levels were significantly reduced in vSTR (**Fig. S7A and S7D**; unpaired t-test, $t_{10} = 2.79$; $p = 0.019$). We also observed a strong tendency in the dSTR (**Fig. S7E and S7H**; unpaired t-test, $t_{10} = 1.93$; $p = 0.081$).

To gain more region-specific insight in the levels of these proteins, we measured the intensity and surface area for these markers in a series of 3 striatal sections ranging from bregma +0.74 to bregma -0.82 mm, with a total of 7 different regions in each hemisphere (**Fig. 9A**). In this experiment, all sub-regions compared and analyzed separately. First, TH signal intensity (**Fig. 9B, 9C and 9F**) (vSTR = $108.7 \pm 7.48\%$; dSTR1 = $105.2 \pm 6.65\%$; dSTR2 = $91.18 \pm 5.71\%$; dSTR3 = $95.26 \pm 8.05\%$ of control) and TH surface area (**Fig. 9G**) (vSTR = $122.6 \pm 19.07\%$; dSTR1 = $107.9 \pm 8.62\%$; dSTR2 = $86.38 \pm 5.42\%$; dSTR3 = $106.20 \pm 22.82\%$ of control) were unchanged in both dSTR and vSTR. For VMAT2 immunoreactivity, although intensity was unchanged (**Fig. 9B, 9C and 9H**) (vSTR = $118.4 \pm 9.30\%$; dSTR1 = $119.7 \pm 8.96\%$; dSTR2 = $104.3 \pm 6.91\%$; dSTR3 = $122.3 \pm 7.24\%$ of control), surface area was increased in both the vSTR and in the rostral part of the dSTR (**Fig. 9I**) (vSTR = $169.3 \pm 28.42\%$ of control, Unpaired t-test, Welch's corrected, $p = 0.045$; dSTR1 =

142.4 ± 11.14%; dSTR2= 120.8 ± 12.73%; dSTR3= 143.3 ± 32.98% of control; Unpaired t-test, Welch's corrected, $p=0.045$). DAT immunostaining showed an opposite change in DAT::NrxnsKO mice, with a decrease of signal intensity in the vSTR (**Fig. 9D** and **9J**) (vSTR=74.07 ± 20.98% of control; Unpaired t-test, $p=0.039$) and in the rostral and caudal parts of the dSTR (**Fig. 9D, 9E** and **9J**; dSTR1= 80.50 ± 17.77%; dSTR2= 93.17 ± 21.96%; dSTR3= 72.80 ± 17.08% of control). The DAT surface area was also significantly decreased in the vSTR and in the caudal part of the dSTR (**Fig. 9K**; vSTR=58.92 ± 10.72% of control; Unpaired t-test, $p=0.033$; dSTR1= 60.80 ± 3.87%; dSTR2= 95.98 ± 3.38%; dSTR3= 62.78 ± 6.71% of control; Unpaired t-test, Welch's corrected, $p=0.030$).

Together, our observation of increased GABA uptake and increased VMAT2 in the vSTR could represent an explanation for increased GABA release by DA neuron axons in this part of the striatum.

Molecular adaptation in DA neurons from Nrxn123 KO mice

Finally, we also unveiled compensatory adaptations in adult DAT::NrxnsKO mice by quantification of mRNA relative levels in total microdissected striatal cells from vSTR and dSTR, structures targeted by DA neurons. Quantification of mRNA encoding transsynaptic proteins didn't revealed any significant difference in the vSTR for all of the selected genes (**Fig. S8A** and **S8B**). However, a significant decrease for mRNA encoding Collybistin and LRRTM3 protein was observed in the dSTR from DAT::NrxnsKO mice (Unpaired t-test, $p=0.021$ and $p=0.014$, respectively).

Discussion

Since the initial discovery of Nrxns (Ushkaryov et al., 1992), a large number of studies have explored the roles of these proteins in synapse formation, function, maintenance and plasticity. Most of these studies have been conducted on glutamatergic or GABAergic neurons, with no

evaluation of their role in modulatory neurons like DA, serotonin, norepinephrine or acetylcholine neurons, whose connectivity is strikingly different and drastically less synaptic (Ducrot et al., 2021). We hypothesized that new insights could be gained by studying the role of such trans-synaptic proteins in such neurons. In the present study, we therefore took advantage of a recently introduced triple conditional *Nrxn* mouse line (Chen et al., 2017) to selectively delete *Nrxns* in DA neurons and examine the impact of this gene inactivation using a combination of electron microscopy, behavioral assessments, patch-clamp recording of GABA and glutamate release, fast scan cyclic voltammetry to measure DA release and primary neuronal cultures. We found that loss of *Nrxns* does not impair the basic development and axonal connectivity of DA neurons *in vivo* and *in vitro*. However, loss of *Nrxns* was associated with impaired DA neurotransmission in the brain of adult mice, as revealed by a reduced rate of DA reuptake after electrically-evoked DA release and with impaired amphetamine-induced locomotion. Patch-clamp recordings of GABA and glutamate release by DA neuron axons also revealed an unexpected increase of GABA co-release. Together these findings suggest that although *Nrxns* are not critical for the basic axonal connectivity and synapse formation of DA neurons, they act as key regulators of GABA and DA signalling in these neurons.

***Nrxn* are dispensable for the basic morphological development and connectivity of DA neurons**

Nrxns have been previously suggested to contribute to synapse formation (Missler et al., 2003; Li et al., 2007; Etherton et al., 2009; Aoto et al., 2015). In a first series of experiments, we therefore examined whether loss of *Nrxns* would impair the morphological development of DA neurons. For this, we established co-cultures of VTA and SNc DA neurons with vSTR and dSTR neurons and astrocytes. Our results failed to identify any major change in global axonal development or in the molecular organization of axon terminals. However, our observation that the proportion of bassoon-positive terminals established by SNc DA neurons was reduced after loss of *Nrxns* suggests

that these proteins may play a role in regulating the active zone of DAergic terminals. This finding is in line with recent results also arguing for a possible role of Nrnxn in the organizational features of the active zone (Luo et al., 2020). How Nrnxn-123 organize active zone assembly is presently unknown, but previous studies suggest that Nrnxns can interact indirectly with active zone proteins through calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase 3 and membrane-associated guanylate kinase 2 (CASK) protein (Hata et al., 1996). Further experiments will be needed to evaluate this possibility more directly using transmission electron microscopy or other types of high-resolution microscopy approaches. Compatible with these *in vitro* results, in adult Nrnxn triple KO mice, we also found no evidence of any gross morphological disruptions of the mesotelencephalic DA system (results not shown), although further quantitative work will be required to validate this conclusion.

In these *in vitro* experiments, we also more closely examined the propensity of DA terminals to interact with GABA and glutamate synapse postsynaptic domains. This was particularly interesting because of the well-known capacity of these neurons to co-release glutamate and GABA in a subset of their synaptic terminals (Sulzer et al., 1998; Descarries et al., 2008; Stuber et al., 2010; Tritsch et al., 2012), and because we hypothesized that Nrnxns might regulate the establishment of excitatory and inhibitory synapses by DA neurons. Quantification of the proportion of TH-positive terminals overlapping with the glutamatergic postsynaptic marker PSD95 did not reveal any significant difference across genotypes. Similar results were obtained with the postsynaptic marker gephyrin, located at GABAergic synapses. Furthermore, results obtained with transmission electron microscopy didn't reveal any difference regarding the ultrastructure of DA terminals lacking all Nrnxns, and in comparison to the wild type animals. These data suggest that Nrnxns are not required for synapse formation by DA neurons. This finding is in agreement with previous reports obtained with a single, double or a triple deletion of Nrnxn in glutamatergic or GABAergic neurons (Missler et al., 2003). While the negative results obtained from a single or a double deletion can be explained by a compensation from the remaining Nrnxn

isoforms (Aoto et al., 2015), the first study on the triple Nrnx deletion, published by Chen and colleagues in 2017, reported the same negative effect on synapse formation by somatostatin-positive interneurons in the cerebellum. However, they also observed a significant decrease in synapse number by parvalbumin-positive synapses. Another recent study using the triple Nrnx mice also reported a lack of impact of Nrnx deletion on synapse formation at the calyx of Held (Luo et al., 2020). These results argue that Nrnxns play a synapse-specific regulatory role in synapse formation and maintenance and do not act as direct drivers of synapse formation *per se*.

Dopamine transporter function is altered in DAT::NrnxnsKO mice

To gain more direct functional insight in the roles of Nrnxns in DAergic neurotransmission, we performed FSCV recordings in the vSTR and dSTR. Our data revealed that peak electrically-evoked DA overflow was not reduced in the absence of Nrnxns, suggesting that Nrnx123 do not play an obligatory role in the DA release mechanism and the initial formation and function of DA neuron varicosities, in line with our *in vitro* results. The reduction in peak DA overflow in DAT::NrnxnsHET mice is puzzling and remains unexplained at the moment. One possibility is that deletion of a single Nrnx123 allele was insufficient to block possible compensatory mechanisms induced in full knockouts.

Although peak DA release was not impaired in the absence of Nrnxns, we found a systematic impairment in DA reuptake in both DAT::NrnxnsKO and DAT::NrnxnsHET mice compared to DAT::NrnxnsWT mice. This finding of impaired DAT function is particularly intriguing in the context of our observation that DAT::NrnxnsKO mice show a robust impairment in amphetamine-induced locomotion. Amphetamine is well-known to increase extracellular DA levels by impairing vesicular storage of DA and inducing reverse transport through the DAT. It is thus possible that Nrnxns regulate the stability and function of the DAT in DA neuron axon terminals and that in the absence of Nrnxns, DAT function and positioning in terminals is impaired.

Possible regulatory role of Nrnxns in GABA release by dopamine neurons

One of the most puzzling observations in the present study is the increase of evoked GABA release from VTA DA neuron terminals in the vSTR but not from SNc DA neurons projecting to the dSTR. This result argues for a region-specific role of Nrnxns in regulating GABA co-release by DA neurons. It is now well established that the functional consequences of Nrnxn deletion differ between neuronal subtypes and species. Multiple studies over the past decade reported similar conclusions, where different Nrnxn isoforms were proposed to regulate various aspects of synapse organization and function (Ullrich et al., 1995). One recent interesting study illustrates this difference, where a double deletion of both Nrnxn-3 α/β had a differential effect at glutamate and GABA synapses, with a reduction of postsynaptic AMPA receptors at excitatory synapses in hippocampal neurons, and a decrease in presynaptic release probability at olfactory bulb inhibitory synapses (Aoto et al., 2015). Similarly, in the present study, our work suggests that preferentially regulate the function of GABA synapses and not glutamate synapses established by DA neurons. These findings highlight the complexity and the diversity of the role of Nrnxns at synapses, in line with much recent work (Chen et al., 2017; Luo et al., 2020).

A possible hypothesis to explain our observations is that one or more Nrnxns act as a repressor of GABA co-transmission and thus regulate the excitatory/inhibitory neurotransmission balance of the axonal domain of DA neurons. Indeed, a previous work from the group of Südhof has shown that Nrnxn physically and functionally interact with GABA_A receptors. In this study, they have shown that overexpression of Nrnxn decrease inhibitory but not excitatory synaptic strength (Zhang et al., 2010). These results are aligned with our observations, showing that after removal of all Nrnxn the GABA co-transmission is increased. Further work, including rescue experiments would be needed to test this hypothesis directly and determine which Nrnxn is involved in this mechanism.

It would also be interesting to complement our work by recording separately from striatal MSNs of the direct and indirect basal ganglia pathway (Gerfen and Surmeier, 2011), as it is possible

that some of the heterogeneity in our results on GABA and glutamate release derive from differences in the roles of Nrnxns in these two pathways.

Alterations in DA neuron connectivity secondary to loss of Nrnxns may also possibly regulate the intrinsic vulnerability of DA neurons, as suggested by our observation of reduced survival of DA neurons in primary cultures established from DAT::NrnxnsKO mice. Because we did not observe a decrease in TH signal in the striatum of these mice, we did not perform stereological counting of DA neurons in these mice, but this may be of interest in future experiments.

Together, our findings shed new light on the role of these cell-adhesion molecules in DA neuron connectivity. We conclude that Nrnxns are dispensable for the initial establishment of synapses by DA neurons, but that play a role in regulating both DAT function and GABA release by DA neurons. Approximately 20% of axon terminals established by DA neurons adopt a synaptic configuration. We conclude that the formation of such synaptic contacts must be regulated by other transsynaptic proteins, including potential candidates such as PTP-sigma. As we observed a robust decrease in bassoon positive terminals established by DA neurons in the absence of Nrnxns, it remains possible that these trans-synaptic proteins play a role in regulating active zone assembly in a subset of terminals established by DA neurons. Further experiment will be needed to determine if this assembly is subject to a control by presynaptic signals or if it is controlled more indirectly by trans-synaptic signaling via postsynaptic signals.

STAR methods

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 (CDEA).

Housing was at a constant temperature (21°C) and humidity (60%), under a fixed 12h light/dark cycle with food and water available ad libitum.

Generation of triple Neurexins cKO mice in DA neurons

All experiments were performed using mice generated by crossing DAT-IRES-Cre transgenic mice (Jackson Labs, B6.SJL-Slc6a3tm1.1 (Cre)Bkmn/J, strain 006660) with Nrnx123loxP mice [for details see (Chen et al., 2017)]. Briefly, conditional knock-out (cKO) mice were produced as a result of CRE recombinase driving a selective excision of Nrnx-1, Nrnx-2 and Nrnx-3 genes in DA neurons and giving three different genotypes: Nrnx123 KO, Nrnx123 HET and Nrnx123 WT mice. The Nrnx123flox/flox mice were on a mixed Cd1/BL6 genetic background. The DAT-IRES-Cre mice was on a C57BL/6J genetic background. Except for culture experiments, only males were used.

Genotyping

Mice were genotyped with a KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase kit (Kapa Biosystem). The following primers were used: DAT-IRES-Cre: Common 5' TGGCTGTTGTGTAAAGTGG3', wild-type reverse 5'GGACAGGGACATGGTTGACT 3' and knock-out reverse 5'-CCAAAAGACGGCAATATGGT-3', Nrnx-1 5'-GTAGCCTGTTTACTGCAGTTCATT-3' and 5'-CAAGCACAGGATGTAATGGCCTT-3', Nrnx-2 5'-CAGGGTAGGGTGTGGAATGAG-3' and 5'-GTTGAGCCTCACATCCCATTT-3', Nrnx3 5'-CCACACTTACTTCTGTGGATTGC-3' and 5'-CGTGGGGTATTTACGGATGAG-3'.

Primary neuronal co-cultures

For all experiments, postnatal day 0-3 (P0-P3) mice were cryoanesthetized, decapitated and used for co-cultures according to a previously described protocol (Fasano et al., 2008). Primary VTA or

SNC DA neurons were obtained from *Nrxn123* KO or *Nrxn123* WT pups and co-cultured with ventral striatum and dorsal striatum neurons, respectively from *Nrxn123* KO or *Nrxn123* WT pups. Neurons were seeded on a monolayer of cortical astrocytes grown on collagen/poly-L-lysine-coated glass coverslips. All cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂ and maintained in 2/3 of Neurobasal medium, enriched with 1% penicillin/streptomycin, 1% Glutamax, 2% B-27 supplement and 5% fetal bovine serum (Invitrogen) plus 1/3 of minimum essential medium enriched with 1% penicillin/streptomycin, 1% Glutamax, 20mM glucose, 1mM sodium pyruvate and 100 µl of MITO+ serum extender. All primary neuronal co-cultures were used at 14DIV.

Immunocytochemistry on cell cultures

Cultures were fixed at 14-DIV with 4% paraformaldehyde (PFA; in PBS, pH-7.4), permeabilized with 0,1% triton X-100 during 20-min, and nonspecific binding sites were blocked with 10% bovine serum albumin during 10-min. Primary antibodies were: mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) (1:2000, Sigma), rabbit anti-TH (1:2000, Chemicon), rabbit anti-synaptotagmin 1 (Syt1) (1:1000, Synaptic Systems) and rabbit anti-vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) (1:1000, gift of Dr. Gary Miller, Colombia University). To improve the immunoreactivity of the synaptic markers PSD95, gephyrin and bassoon, a set of cultures were fixed with 4% PFA together with 4% sucrose. For these experiments, the primary antibodies were mouse anti-PSD95 (1:1000 Pierce antibody), mouse anti-gephyrin (1:1000, Synaptic Systems) and guinea pig anti-bassoon (1:1000, Synaptic Systems). These were subsequently detected using Alexa Fluor-488-conjugated, Alexa Fluor-546-conjugated, Alexa Fluor-568-conjugated or Alexa Fluor-647-conjugated secondary antibodies (1:500, Invitrogen).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Following 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% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde diluted in PBS. Dissected brains were extracted and post-fixed overnight in 4% PFA at 4°C. Mouse brains were cut with a vibratome (model VT1200 S; Leica, Germany) into 50 µm-thick transverse sections. For TH immunostaining, 50 µm-thick sections taken through the striatum (1.18 mm and 1.34 mm from bregma, according to the mouse brain atlas of Franklin & Paxinos 1st edition) were 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 with a rabbit primary TH antibody (Millipore, catalogue no. AB152, 1/1000). Sections were rinsed and incubated during 2h with a goat anti-rabbit secondary antibody (1/500) and directly coupled to a peroxidase (Jackson, catalogue no. 111-035-003). The peroxidase activity was revealed by incubating sections for 5 min 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 several washes in TBS followed by phosphate buffer (PB; 50 mM; pH 7.4). At room temperature, sections were washed 3 times in ddH₂O 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, sections were incubated for 20 min 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, sections 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. Trapezoidal blocs of tissue from the ventral striatum were cut from the resin flat-embedded TH-immunostained sections. Each quadrangular pieces of tissue were 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 diameter (larger than 0.25 µm) and their synaptic vesicles content. Using an integrated digital camera (MegaView

II; Olympus, Münster, Germany), TH 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.

Stereotaxic virus injections

One-month old Nrnx123 KO, Nrnx123 HET and Nrnx123 WT mice were anesthetized with isoflurane (Aerrane; Baxter, Deerfield, IL, USA) and fixed on a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Fur on top of the head was trimmed, and the surgical area was disinfected with iodine alcohol. Throughout the entire procedure, eye gel (Lubrital, CDMV, Canada) was applied to the eyes and a heat pad was placed under the animal to keep it warm. Next, bupivacaine (5-mg/ml and 2-mg/Kg, Marcaine; Hospira, Lake Forest, IL, USA) was subcutaneously injected at the surgical site, an incision of about 1-cm made with a scalpel blade and the cranium was exposed. Using a dental burr, one hole of 1-mm diameter was drilled above the site of injection [AP (anterior-posterior; ML (medial-lateral); DV (dorsal ventral), from bregma]. The following injection coordinates were used: SNc/VTA [AP -3.0 mm; ML \pm 0.9 mm; DV -4.3 mm]. Borosilicate pipettes were pulled using a Sutter Instrument, P-2000 puller, coupled to a 10 ul Hamilton syringe (Hamilton, 701 RN) using a RN adaptor (Hamilton, 55750-01) and the whole setup was filled with mineral oil. Using a Quintessential Stereotaxic Injector (Stoelting), solutions to be injected were pulled up in the glass pipette. For expression of ChR2 in DA neurons, 0.1- μ l (VTA/SNc) of sterile NaCl containing 4.4×10^{12} viral particles/mL of AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP (UNC GTC Vector Core, NC, USA) was injected. After the unilateral injection, the pipette was left in place for 10-min to allow diffusion and then slowly withdrawn. Finally, the scalp skin was sutured and a subcutaneous injection of the anti-inflammatory drug carprofen (Rimadyl, 50-mg/mL) was given. Animals recovered in their home cage and were closely monitored for 72h. A second dose of carprofen (5-mg/kg) was given if the mice showed evidence of pain.

Electrophysiology and optogenetics

Slice preparation: Mice P70 - 80 (4 weeks post injection) were deeply anesthetized with isoflurane and quickly decapitated. Acute coronal slices (300 μm) were obtained using a vibratome (Leica V1200S) in ice-cold N-Methyl D-Glucamine (NMDG) cutting solution: containing (in mM): 110 NMDG, 20 HEPES, 25 glucose, 30 sodium bicarbonate, 1.25 sodium phosphate, 2.5 potassium chloride, 5 sodium ascorbate, 3 sodium pyruvate, 2 Thiourea, 10 magnesium, 0.5 calcium chloride, 305-310 mOsm, pH 7.4. Slices equilibrated in a homemade chamber for 2 – 3 mins (31°C) in the above solution and an additional 60 minutes in room temperature aCSF containing (in mM): 121 NaCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2.5 KCl, 11 Glucose, No Sucrose, 1.3 MgSO₄-7 H₂O, and 2.5 CaCl₂ (pH 7.4) before being transferred to a recording chamber.

Whole-Cell Patch-Clamp: Recordings were obtained from medium spiny neurons (MSNs) in the dorsal and ventral striatum. Striatal medium spiny neurons (MSN) were visualized under IR-DIC. Data were collected with a Multiclamp 700B amplifier, Digidata 1550B (Molecular devices), and using Clampex 11 (pClamp; Molecular Devices, San Jose, CA). All recordings were acquired in voltage clamp ($V_h = -70$ mV) at 31°C and QX-314 (1 μM) was used in all internal solutions to internally block sodium-channels. Whole cell currents were acquired and sampled at 10 kHz with a lowpass bessel filter set at 2 kHz and digitized at 10 kHz. For excitatory currents (EPSCs), patch pipette was filled with internal solution containing (in mM): 135 CsMeSO₄, 8 CsCl, 10 HEPES, 0.25 EGTA, 10 Phosphocreatine, 4 MgATP, and 0.3 NaGTP (295 – 305 mOsm, pH 7.4 with CsOH) and Picrotoxin (50 μM) was added to aCSF. For inhibitory postsynaptic currents (IPSC) patch pipettes were filled with internal solution containing (in mM): 143 CsCl, 10 HEPES, 0.25 EGTA, 10 Phosphocreatine, 4 MgATP, and 0.3 Na-2GTP (osmolarity 295 – 305, pH 7.4 with CsOH) and CNQX (50 μM) and AP5 (10 μM) were added to aCSF. All pipettes (3 - 4 M Ω) were pulled from borosilicate glass (Narishige PC-100). Patched cells were allowed a minimum of 3 min to stabilize following break-in and access resistance (R_a) was monitored throughout the recording for sealing and cells with an increase of > 20% in R_a were discarded. Optically evoked synaptic currents were

induced with a 440nm wavelength laser delivered through a 40X objective lens (Olympus BX51WI) at 0.1 Hz (5 ms pulse) and laser intensity was adjusted using LLE-SOLA-SE2 Controller (Lumencore). Electrically evoked synaptic currents in MSNs were evoked using a bipolar stimulation electrode placed in the dorsal or in the ventral striatum to evoked-all-or-none responses using the following parameters: 0.1 Hz frequency, pulse duration 0.1ms. Input/output (I/O) curves were also obtained to compare synaptic strength. I/O curve were performed with a stimulation at a frequency of 0.1Hz with intensity increments of 10 μ A (starting at 10 μ A and finishing at 100 μ A) with 3 sweeps per increment. To examine whether synaptic plasticity was altered in Nrnx123 KO mice, we also performed paired pulse ratio (PPR) experiments. PPR of evoked EPSCs and IPSCs were obtained with 40, 50 and 100ms inter-pulse interval and by dividing the amplitude of the second EPSC or IPSC by the first one (EPSC2/EPSC1 or IPSC2/IPSC1).

Immunohistochemistry on brain slices

Three months old male Nrnx123 WT and Nrnx123 KO mice were anesthetized using pentobarbital NaCl solution (7 mg/mL) injected intraperitoneally and then perfused intracardially with 20 mL of PBS followed by 30 mL of 4% PFA. The brains were extracted, placed in PFA for 48h and then in a 30% sucrose solution for 48h. After this period, brains were frozen in -30°C isopentane for 1 min. 40 microns thick coronal sections were then cut using a cryostat (Leica CM1800) and placed in antifreeze solution at -20°C until used. For slice immunostaining, after a PBS wash, the tissue was permeabilized, nonspecific binding sites were blocked and slices were incubated overnight with a rabbit anti-TH (1:1000, AB152, Millipore Sigma, USA), a mouse anti- TH (1:1000, Clone LNC1, MAB318, Millipore Sigma, USA), a rat anti-DAT (1:2000, MAB369; MilliporeSigma, USA), a rabbit anti-VMAT2 (1:2000, kindly provided by Dr. G.W. Miller, Columbia University) or a chicken anti-GFP (1:1000, GFP-1020; Aves Labs, USA) antibody. Primary antibodies were subsequently detected with rabbit, rat or chicken Alexa Fluor-488–conjugated, 546-conjugated and/or 647-conjugated secondary antibodies (1:500, 2h incubation; Invitrogen). Slices were

mounted on charged microscope slides (Superfrost/Plus, Fisher Scientific, Canada) and stored at 4°C prior to image acquisition.

Fast scan cyclic voltammetry

Acute brain slices from 3-months-old Nr1h3 WT, Nr1h3 HET and Nr1h3 KO mice, were used for the Fast Scan Cyclic Voltammetry (FSCV) recordings. The animals were anesthetized with halothane, quickly decapitated and the brain harvested. Next, the brain was submersed in 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) and coronal striatal/nucleus accumbens brain slices of 300µm were prepared with a Leica VT1000S vibrating blade microtome. Once sliced, the tissue was transferred to oxygenated aCSF at room temperature and allowed to recover for at least 1h. For recordings, slices were put in a custom-made recording chamber superfused with aCSF at 1 ml/min and maintained at 32°C with a TC-324B single channel heater controller. All solutions were adjusted at pH 7.35-7.4, 300 mOsm/kg and saturated with 95% O₂-5% CO₂ at least 30-min prior experiment. Electrically-evoked action potential-induced DA overflow was measured by FSCV using a 7µm diameter carbon-fiber electrode crafted as previously described (Martel et al., 2011) and placed into the tissue ~100µm below the surface and a bipolar electrode (Plastics One, Roanoke, VA, USA) was placed ~200µm away. The electrodes were calibrated with 1µM DA in aCSF before and after each recorded slice and the mean of the current values obtained were used to determine the amount of released DA. After use, electrodes were cleaned with isopropyl alcohol (Bioshop). The potential of the carbon fiber electrode was scanned at a rate of 300 V/s according to a 10ms triangular voltage wave (-400 to 1000 mV vs Ag/AgCl) with a 100ms sampling interval, using a headstage preamp (Axon instrument, CV 203BU) and a Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA). Data were acquired using a digidata 1440a analog to digital board converter (Axon Instruments) connected to a personal computer using Clampex (Axon Instruments). Slices were left to stabilize for 20-min before any

electrochemical recordings. Evaluation of DA release was achieved by sampling 4 different subregions of the dorsal striatum and 4 different subregions of the ventral striatum (nucleus accumbens core and shell) using slices originating from +1.34 to +0.98 using bregma as a reference. After positioning of the bipolar stimulation and carbon fiber electrodes in the tissue, single pulses (400 μ A, 1ms) were applied to trigger DA release. After sampling of DA release, per pulse ratio experiments were conducted using one spot of the dorsal striatum and one in the nucleus accumbens core. In each spot, a series of single pulses every 2-min for 10-min was collected as a baseline, follow by a triplicate of single-pulse stimuli intercalated with paired pulses (100 Hz) every 2-min (double pulse of 1ms, 400 μ A, with an inter-pulse interval of 100ms). DA release was analyzed as the peak height of DA concentrations (rise time) and DA reuptake was determined from the clearance rate of DA which was assumed to follow Michaelis-Menten kinetics. The time constant Tau (τ) was used as an uptake parameter and was calculated based on an exponential fitting applied to all traces with a homemade MATLAB script. The paired pulse ratio was calculated using the peak height of the 1st and 2nd pulse as: $(2^{\text{nd}} \text{ pulse} - 1^{\text{st}}) / 1^{\text{st}}$.

Behavioral testing

Before behavioral experiments, mice were transferred from the colony and were housed with a maximum of 4 mice per cage. All mice were handled for 3 consecutive days prior to start of the different tests. All tests were performed in the same order as described below. The animals were tested between 10:00AM and 4:30PM.

Rotarod: The accelerating rotarod task was used to assess motor coordination and learning. The apparatus consisted of five rotating rods separated by walls and elevated 30 cm from the ground. P60-P70 mice were pre-trained on the rod (LE8205, Harvard apparatus) one day before the recording to reach a stable performance. Mice were required to remain on the rod for 1-min at a constant speed of 4rpm with a maximum of 3 attempts. For the first step of the rotarod testing protocol, the first day of the data acquisition, mice were tested on an accelerated rotation 4-40rpm

over a 10-min period for two sessions with an interval of 1h. The latency to fall was recorded. The same parameters were used on the second test day, but 3 sessions were performed. On the last day of data acquisition, the mice performed 4 sessions with the same previous parameters. A second protocol was also used, in which mice were tested with an accelerated rotation 4-40rpm over a 2-min period for all sessions with an interval of 1h. Each trial per day was analyzed separately and compared between the genotypes.

Locomotor activity and psychostimulant-induced locomotor activity: To evaluate motor behavior, mice were placed in cages (Omnitech Electronics, Inc; USA) designed for activity monitoring using an infrared actimeter (Superflex sensor version 4.6, Omnitech Electronics; 40 x 40 x 30cm) for 20-min. Next, 0.9% saline or the drug treatments were injected intraperitoneally (10ml/kg) in a randomized order for the different genotypes. Horizontal activity was scored for 40-min following the injection. To evaluate psychostimulant-induced motor behaviors, the mice were placed in the infrared actimeter cages (Superflex sensor version 4.6, Omnitech Electronics) for 20-min. Then, amphetamine was injected intraperitoneally at 5-mg/Kg (Tocriss, 2813, UK) or cocaine hydrochloride at 20-mg/Kg (Medisca, cat# 53-21-4, Canada) in a randomized order for the different genotypes. The total distance (horizontal locomotor activity) was scored for 40-min following the injection.

Pole test: The test was conducted with a homemade 48-cm metal rod of 1-cm diameter covered with adhesive tape to facilitate traction, placed in a cage. 8-week-old Nrxn123 KO, HET and WT mice were positioned head-up at the top of the pole and the time required to turn (t-turn) and climb down completely was recorded.

Sucrose preference test: Mice were tested for preference of a 2% sucrose solution, using a two bottles choice procedure. Subjects were housed one per cage all of the test (5 days). Mice were first conditioned with two bottles of water during two days. Then mice were given two bottles, one sucrose (2%) and one of tap water. Every 24h, the amount of sucrose and water consumed was evaluated. To prevent potential location preference of drinking, the position of the bottles was

changed every 24h. The preference for the sucrose solution was calculated as the percentage of sucrose solution ingested relative to the total intake.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

We used RT-qPCR to quantify the amount of mRNA encoding the following genes: Gephyrin (Gphn), Collybistin (Arhgef 9), GABA-A receptor (Gabra1), Neuroligins 1, 2 and 3 (Nlgn1, 2 and 3), Latrophilins 1, 2 and 3 (Lphn1, 2 and 3), LRRTMs 1, 2, 3, 4 (LRRTM1, 2, 3 and 4), D1R (DRD1) and D2R (DRD2) in striatal brain tissue from P80 Nrnx123 WT and Nrnx123 KO mice. The brains were quickly harvested and the ventral and dorsal striata were microdissected and homogenized in 500 μ L of trizol. For both, presynaptic and postsynaptic compartment, RNA extraction was performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Canada) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was validated using a Bioanalyzer 2100 (Agilent). Total RNA was treated with DNase and reverse transcribed using the Maxima First Strand cDNA synthesis kit with ds DNase (Thermo Fisher Scientific). Gene expression was determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche (www.universalprobelibrary.com). For each qPCR assay, a standard curve was performed to ensure that the efficiency of the assay was between 90% and 110%. Assay information are presented in **supplementary Table 1**. The Quant Studio qPCR instrument (Thermo Fisher Scientific) was used to detect the amplification level. Relative expression comparison ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$) was calculated using the Expression Suite software (Thermo Fisher Scientific), using GAPDH and β -Actin as an endogenous control.

Western Blot

Ventral and dorsal striatum samples were microdissected from Nrnx123 WT and Nrnx123 KO adult mice and then lysed in RIPA buffer (Fisher Scientific, PI89900) containing a protease inhibitor cocktail (P840, Sigma). Homogenized tissue samples were centrifuged at 12000g for 30 min at 40C. Supernatant was collected and protein quantification was done with BCA reagent

(Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, PI23227). 20µg of each sample was separated on 8% SDS-PAGE followed by transfer onto a nitrocellulose membrane. Membrane blocking was done with 10% skimmed milk for 90 min at RT with gentle shaking. The membranes were incubated overnight at 4°C with respective antibodies (**Supplementary Table 2**) with gentle shaking. Membranes were washed 5 times with TBST buffer for 5 min each time. After this, appropriate secondary antibodies (**Supplementary Table 2**) were added and the incubation was performed at RT for 90 min with gentle shaking. Membranes were washed again with TBST buffer for 5 times X 5 min and developed using the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, 1004384863). Images were captured on a luminescent image analyzer (GE Healthcare) using Image quant LAS 4000 software. Membranes were stripped and re-probed for β-actin as a loading control.

Image acquisition with confocal microscopy

All *in vitro* fluorescence imaging quantification analyses were performed on images acquired using an Olympus Fluoview FV1000 point-scanning confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Images were scanned sequentially to prevent non-specific bleed-through signal using 488, 546 and 647-nm laser excitation and a 60X (NA 1:42) oil immersion objective.

Image analysis

All image quantification was performed using Image-J (National Institute of Health, NIH) software. A background correction was first applied at the same level for every image analyzed before any quantification. A macro developed in-house was used to perform all quantifications.

Statistics

Data are represented throughout as mean ± SEM. Statistically significant differences were analyzed using Student's t test, one-way repeated-measures ANOVA or two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

Acknowledgments

We would like to thank Dr. G. Miller for kindly provided VMAT2 antibody, Willemieke Kouwenhoven for her help with some experiments, the IRIC genomic platform for qRT-PCR analysis, CERVO Québec electron microscopy platform and C.A. Maurice for his strong support. This work was funded by Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant MOP106556) to L-E.T. C.D. received a graduate student award from Fond de recherche en santé du Québec (FRQS).

Author contributions

C.D.: conceptualization, design, acquisition, analysis, validation and interpretation of data (All *in vitro* results, ICC, GABA uptake, Behavior, IHC, qRT-PCR, Transmission electron microscopy, TEM), drafting, revising and editing the manuscript. G. D. C: acquisition of data and analysis (Whole cell patch clamp recording). C. VL. D.: acquisition of TEM. S.M.: acquisition and analysis of data (Western Blot). N.G.: viral injections. S.B.N.: help with data analysis (ICC). M-J.: acquisition of data (cell culture), B. D. L.: acquisition of data and analysis (voltammetry). L. Y. C.: Providing Nr1h3^{lox/lox} mice, analysis (Whole cell patch clamp recording), conceptualization, writing, and review and editing. L-E.T.: conceptualization, resources, funding acquisition, writing, review and editing.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

References

- Aoto J, Foldy C, Ilcus SM, Tabuchi K, Sudhof TC (2015) Distinct circuit-dependent functions of presynaptic neurexin-3 at GABAergic and glutamatergic synapses. *Nat Neurosci* 18:997-1007.
- Birgner C, Nordenankar K, Lundblad M, Mendez JA, Smith C, le Greves M, Galter D, Olson L, Fredriksson A, Trudeau LE, Kullander K, Wallen-Mackenzie A (2010) VGLUT2 in dopamine neurons is required for psychostimulant-induced behavioral activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:389-394.
- Caille I, Dumartin B, Bloch B (1996) Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res* 730:17-31.
- Chen LY, Jiang M, Zhang B, Gokce O, Sudhof TC (2017) Conditional Deletion of All Neurexins Defines Diversity of Essential Synaptic Organizer Functions for Neurexins. *Neuron* 94:611-625 e614.
- Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS (1996) Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16:3166-3177.
- Dal Bo G, St-Gelais F, Danik M, Williams S, Cotton M, Trudeau LE (2004) Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J Neurochem* 88:1398-1405.
- Descarries L, Mechawar N (2000) Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 125:27-47.
- Descarries L, Bosler O, Berthelet F, Des Rosiers MH (1980) Dopaminergic nerve endings visualised by high-resolution autoradiography in adult rat neostriatum. *Nature* 284:620-622.
- Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Bosler O, Doucet G (1996) Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol* 375:167-186.
- Descarries L, Berube-Carriere N, Riad M, Bo GD, Mendez JA, Trudeau LE (2008) Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev* 58:290-302.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.
- Ducrot C, Bourque MJ, Delmas CVL, Racine AS, 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 LE (2021) Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *FASEB J* 35:e21791.
- Etherton MR, Blaiss CA, Powell CM, Sudhof TC (2009) Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17998-18003.

- Fasano C, Thibault D, Trudeau LE (2008) Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3:Unit 3 21.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441-466.
- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013-1026.
- Hata Y, Butz S, Sudhof TC (1996) CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *J Neurosci* 16:2488-2494.
- Ichtchenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, Sudhof TC (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81:435-443.
- Ko J, Fuccillo MV, Malenka RC, Sudhof TC (2009) LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron* 64:791-798.
- Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB (1997) Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* 7:368-373.
- Li J, Ashley J, Budnik V, Bhat MA (2007) Crucial role of *Drosophila* neurexin in proper active zone apposition to postsynaptic densities, synaptic growth, and synaptic transmission. *Neuron* 55:741-755.
- Luo F, Sclip A, Jiang M, Sudhof TC (2020) Neurexins cluster Ca(2+) channels within the presynaptic active zone. *EMBO J* 39:e103208.
- Luo F, Sclip A, Merrill S, Sudhof TC (2021) Neurexins regulate presynaptic GABAB-receptors at central synapses. *Nat Commun* 12:2380.
- Martel P, Leo D, Fulton S, Berard M, Trudeau LE (2011) Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS One* 6:e20402.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T (2009) Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci* 29:444-453.
- Mendez JA, Bourque MJ, Dal Bo G, Bourdeau ML, Danik M, Williams S, Lacaille JC, Trudeau LE (2008) Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci* 28:6309-6318.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Sudhof TC (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939-948.
- Ogura T, Ogata M, Akita H, Jitsuki S, Akiba L, Noda K, Hoka S, Saji M (2005) Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 51:299-308.
- Sanchez G, Varaschin RK, Bueller H, Marcogliese PC, Park DS, Trudeau LE (2014) Unaltered striatal dopamine release levels in young Parkin knockout, Pink1 knockout, DJ-1 knockout and LRRK2 R1441G transgenic mice. *PLoS One* 9:e94826.
- Schultz W (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30:259-288.

- Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A (2010) Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J Neurosci* 30:8229-8233.
- Sudhof TC (2017) Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171:745-769.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4588-4602.
- Surmeier DJ, Graves SM, Shen W (2014) Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 29:109-117.
- Tabuchi K, Sudhof TC (2002) Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 79:849-859.
- Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL (2012) Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490:262-266.
- Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL (2016) Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci* 17:139-145.
- Tritsch NX, Oh WJ, Gu C, Sabatini BL (2014) Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. *Elife* 3:e01936.
- Ullrich B, Ushkaryov YA, Sudhof TC (1995) Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* 14:497-507.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Sudhof TC (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 257:50-56.
- Wang A, Xiang YY, Yang BB, Lu WY (2019) Neurexin-1alpha regulates neurite growth of rat hippocampal neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 11:115-125.
- Yorgason JT, Espana RA, Jones SR (2011) Demon voltammetry and analysis software: analysis of cocaine-induced alterations in dopamine signaling using multiple kinetic measures. *J Neurosci Methods* 202:158-164.
- Zhang S, Qi J, Li X, Wang HL, Britt JP, Hoffman AF, Bonci A, Lupica CR, Morales M (2015) Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat Neurosci* 18:386-392.
- Zhou QY, Palmiter RD (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83:1197-1209.

Figures and figures legends

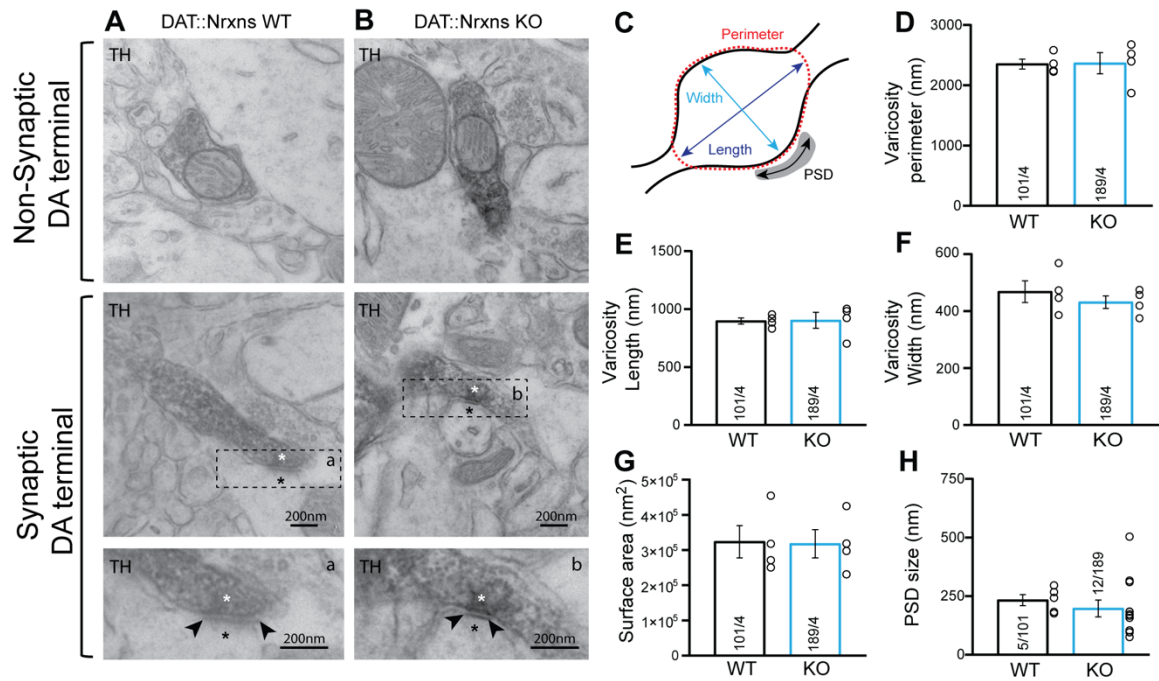


Figure 1 - Synaptic and non-synaptic ultrastructure of DA terminals is unchanged after *Nrxn123* triple knockout in dopamine neurons. **A-** Electron micrographs showing DA terminals without any PSD domain in both, DAT::*Nrxns*WT and KO neurons. **B-** Electron micrographs showing DA terminals in apposition to a PSD domain in both DAT::*Nrxns*WT and KO neurons. **C-** Schematic representation of DA varicosity. **D-** Bar graph representing the perimeter of the DA varicosity from WT and KO mice. **E** and **F-** Bar graphs representing the size of the varicosities with length (**E**) and the width (**F**). **G-** Bar graphs showing the surface area of the axonal DA varicosities from WT and KO animals. **H-** Bar graphs representing the PSD size by measuring it over the genotypes. Data are plotted as mean \pm SEM and were analyzed using student unpaired t-tests. For all analysis, WT=101 and KO=189 axonal varicosities from 4 different mice for each genotype. For all analysis, graph plots represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out by unpaired t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

SNc DA neurons

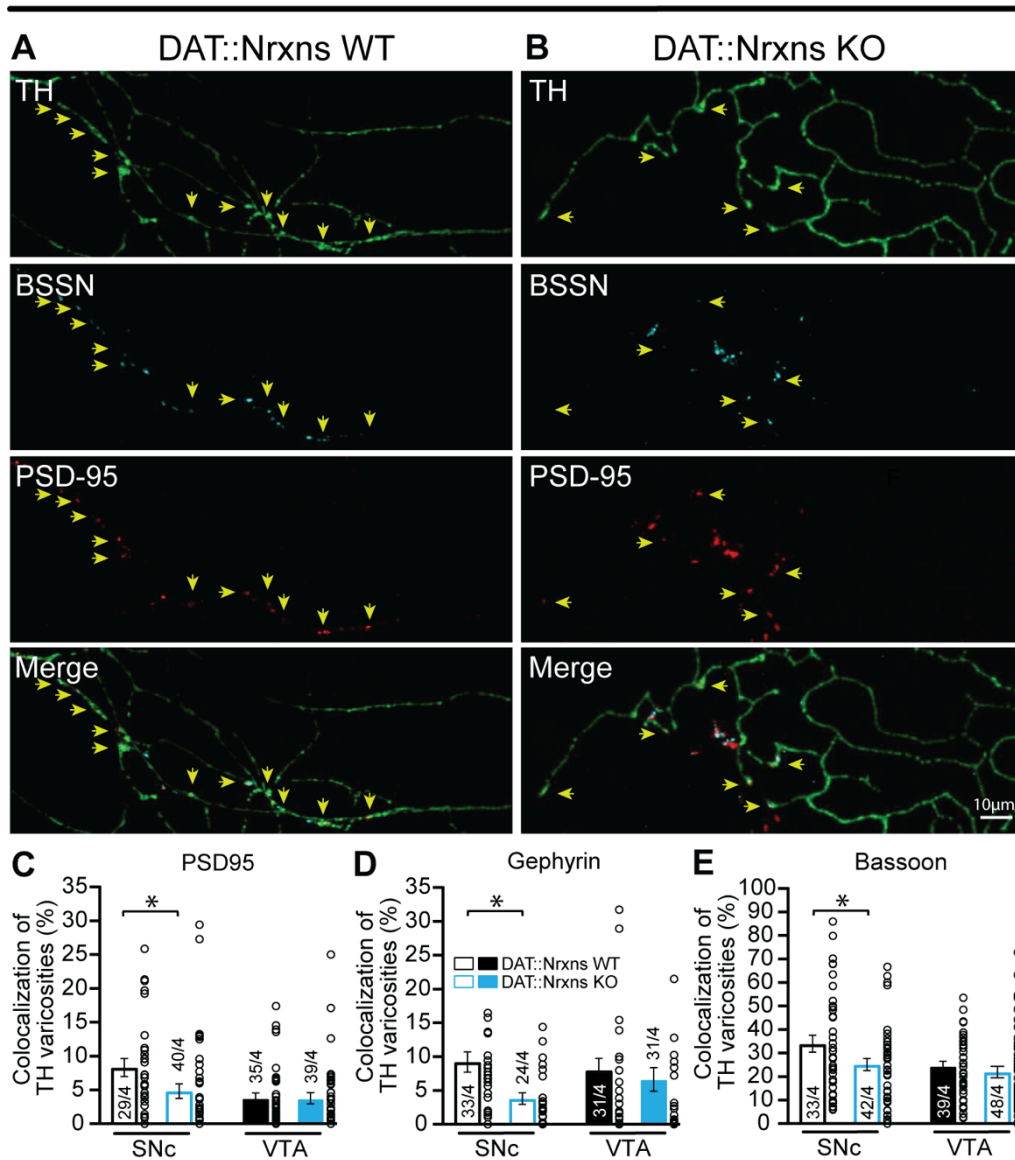


Figure 2 - Synapses proportion established by cultured DA neurons is unchanged after conditional deletion of all neuexins. A and B- Representative images illustrating TH-positives varicosities in the axonal arborisation of a SNc DA neuron from DAT::NrxnsWT and DAT::NrxnsKO mice, expressing Bassoon and colocalizing sparsely with the postsynaptic marker PSD95. **C-** Bar graph representing the proportion (%) of axonal varicosities established by VTA and SNc DA neurons that are positive for TH and colocalizing with PSD95 at 14 DIV. **D-** Bar graph representing the proportion (%) of axonal varicosities established by VTA and SNc DA neurons

that are positive for TH and colocalizing with Gephyrin at 14 DIV. E - Bar graph representing the proportion (%) of axonal varicosities that are positive for Bassoon from VTA and SNc DA neurons from DAT::NrxnsWT and DAT::NrxnsKO mice. Data are means \pm SEM, statistical analysis were performed by two-tailed Student's T-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

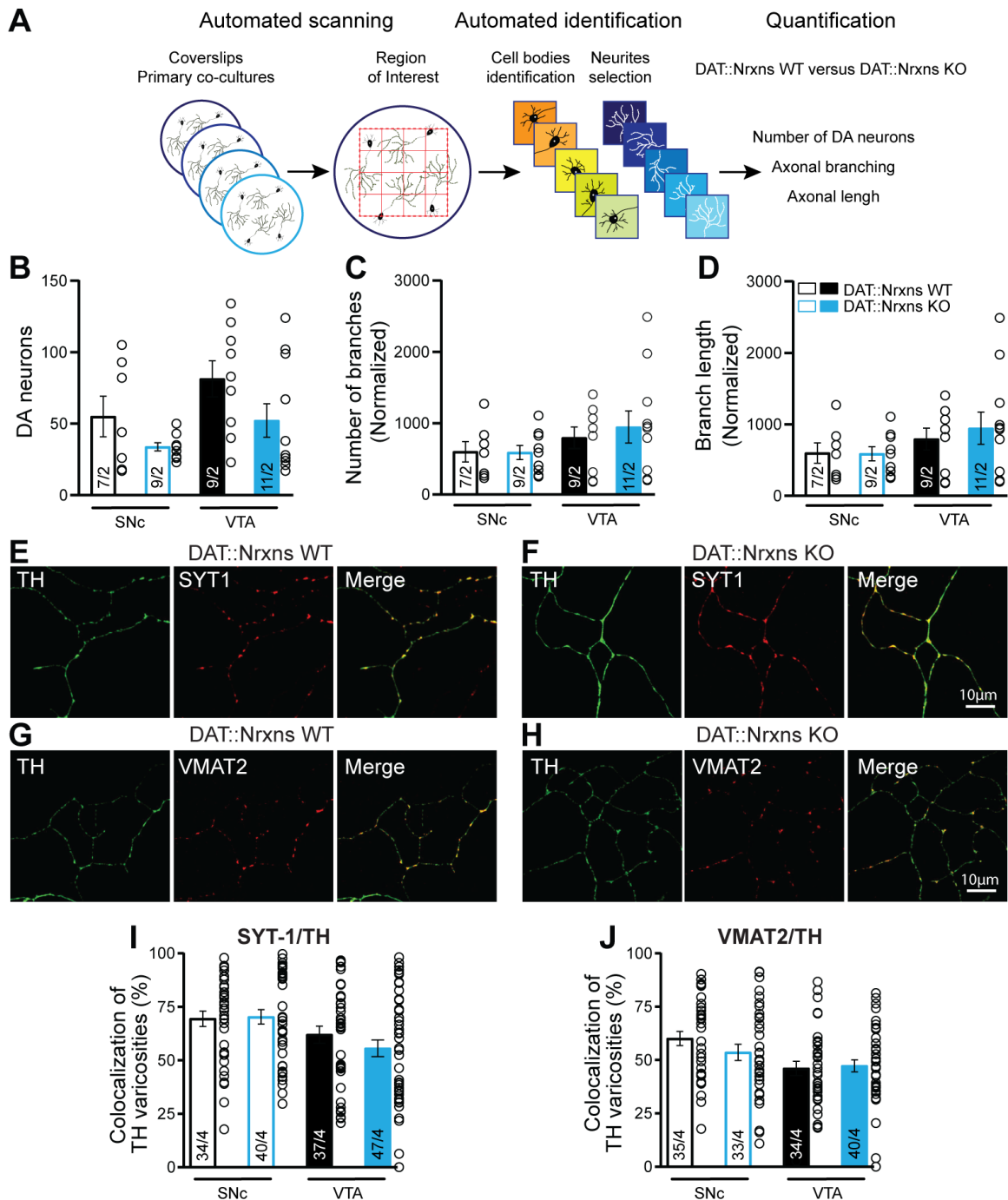


Figure 3 – Normal axonal growth and complexity in DA neurons after conditional deletion of all neurexins. **A** - Illustration of the method used to evaluate and quantify the survival and growth of DA neurons lacking all neurexins and in comparison to the control group. **B** - Quantification of DA neuron survival, assessed by their number per coverslips at 14DIV. **C** and **D** - Evaluation of

cultured DA neurons development, assessed by the number of TH-positive processes (**C**) and their length (**D**). **E** - Photomicrographs illustrating the distribution of TH/Syt-1 positive axonal varicosities along the axonal domain of a SNc DAergic neuron from DAT::NrxnsKO and DAT::NrxnsWT mice. Photomicrographs illustrating the distribution of TH/VMAT2 positive axonal varicosities along the axonal domain of a SNc DAergic neuron from DAT::NrxnsKO and DAT::NrxnsWT mice. Axonal growth assessment experiment, n = 7-11 coverslips from 2 different neuronal co-cultures. Syt1/VMAT2 characterization, n = 33-44 axonal fields from 4 different neuronal co-cultures. The number of observations represent the number of fields from individual neuronal examined. For all analysis, graph plots represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Šidák's corrections. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

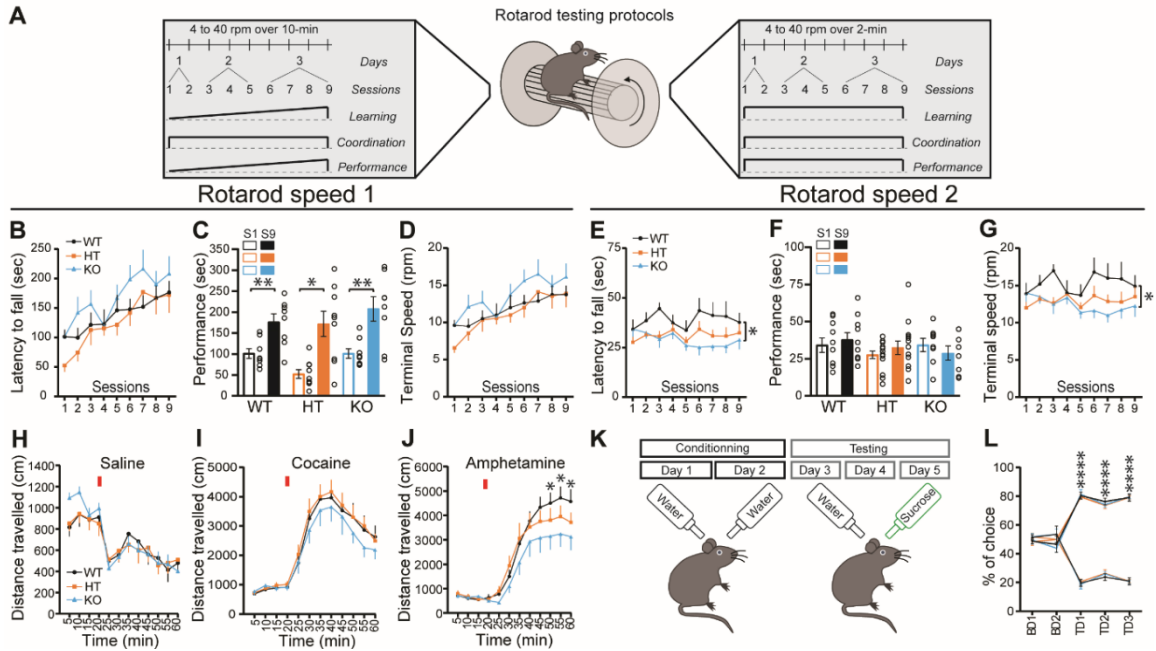


Figure 4 – DAT::NrxnsKO mice exhibit impaired amphetamine-induced motor activity. **A-** Schematic representation of a mouse on a rotarod and the diagram of the two rotarod testing protocols. **B-** Performance on the accelerating rotarod during 9 sessions over 3 consecutive days. Latency to fall off was quantified at rotation speeds from 4 to 40 rpm over 10-min. **C-** Performance of littermate DAT::NrxnsKO, HET and WT mice on the rotarod were evaluated comparing the last session and the first session for each mouse showing a significant difference in this first rotarod testing protocol. **D-** Quantification of the terminal speed over all the sessions show no difference over the littermate DAT::NrxnsKO, HET, WT mice. **E-** Performance on the accelerating rotarod during 9 sessions over 3 consecutive days. Latency to fall off was quantified at rotation speeds from 4 to 40 rpm over 2-min. **F-** Performance of littermate DAT::NrxnsWT, HET and KO mice on the rotarod was evaluated comparing the last session and the first session for each mouse and showing no significant difference in this second rotarod testing protocol. **G-** Quantification of the terminal speed over all the sessions show no difference over the littermate DAT::NrxnsWT, HET and KO mice. **H-** Basal horizontal activity in a novel environment before and after a saline injection (10ml/Kg) over a total 60-min period. **I-** Horizontal activity before and after a cocaine injection

(20mg/Kg; 10ml/Kg) over a total 60-min period. **J**- Horizontal activity before and after an amphetamine injection (5mg/Kg; 10ml/Kg) over a total 60-min period. **K**-Illustration of sucrose preference testing protocol. **L**- Quantification of sucrose preference over the days in comparison to water consumption represented as a percentage of choice. For all analysis, graph plots represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Tukey's multiple comparisons (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

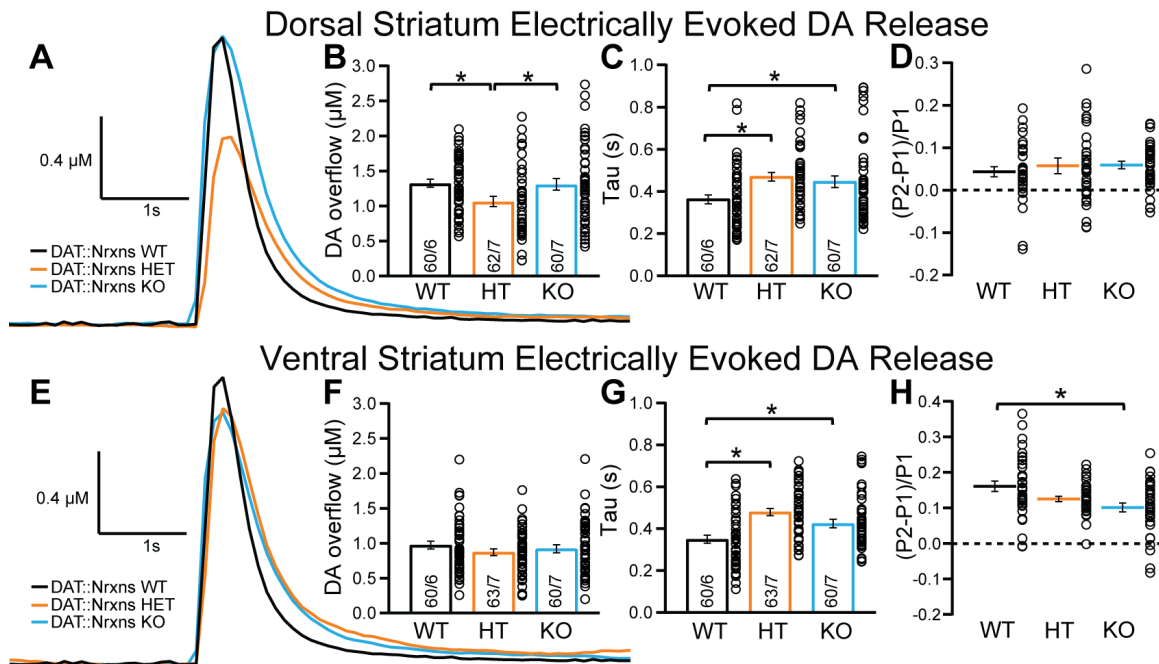


Figure 5 - Normal dopamine release but slower reuptake in DAT::NrnxnKO mice. **A**- Representative traces of responses obtained after electrically evoked dopamine levels detected by fast-scan cyclic voltammetry in the dorsal striatum, where DA overflow was measured in DAT::NrnxnWT, HET and KO mice. **B**- Bar graphs showing the average of DA (μ M) obtained in the dorsal striatum from DAT::NrnxnWT, HET and KO mice. **C**- Evaluation of DA release kinetic with the Tau values, corresponding to reuptake efficiency obtained in the dorsal striatum from DAT::NrnxnWT, HET and KO mice. **D**- Short-term paired-pulse induced plasticity of DA release

in dorsal striatum. Mean (P2-P1/P1) with inter-pulse interval at 100-ms in dorsal striatum and comparing each genotype (DAT::NrxnsWT, HET and KO mice). The low ratio values reflect the strong paired-pulse depression seen at such release sites in acute brain slices. **E-** Representative traces of responses obtained after electrically evoked dopamine levels detected by fast-scan cyclic voltammetry in the ventral striatum, where DA overflow was measured in Nrxn123 WT, HET and KO mice. **F-** Bar graphs showing the average of DA (μM) obtained in the dorsal striatum from DAT::NrxnsWT, HET and KO mice. **G-** Evaluation of DA release kinetic with the Tau values obtained in the ventral striatum from DAT::NrxnsWT, HET and KO mice. **H-** Short-term paired-pulse induced plasticity of DA release in ventral striatum. Mean (P2-P1/P1) with inter-pulse interval at 100-ms in ventral striatum and comparing each genotype (DAT::NrxnsWT, HET and KO mice). The low ratio values reflect the strong paired-pulse depression seen at such release sites in acute brain slices. Data are means \pm SEM, statistical analysis of multiple comparisons were performed with one-way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

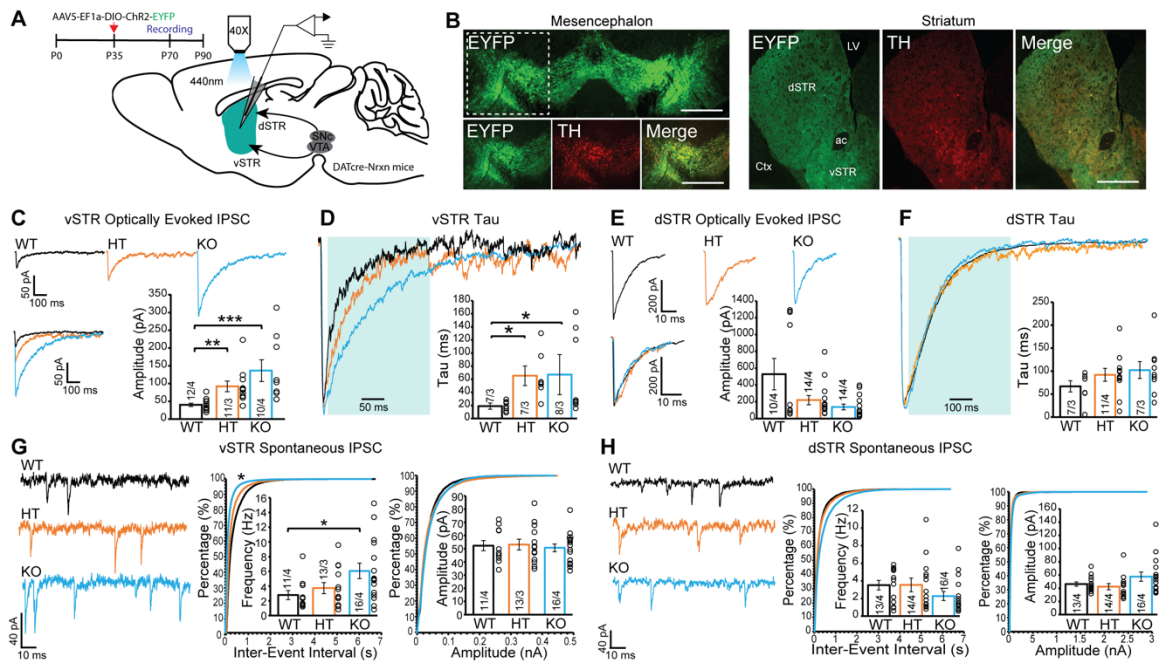


Figure 6 - Neurexins regulate GABA release from dopaminergic neurons in the ventral striatum. **A-** Schematic of experimental approach for mouse generation, virus injection, and electrophysiological recording (left); GFP expression in AAV-transfected VTA region (right). **B-** Photomicrographs illustrating the expression of the virus (EYFP labelling) in DA neurons located in the mesencephalon and their projections in the striatum. **C-** Representative traces (top) of IPSC elicited by opto-stimulation (o-IPSC) recorded in the MSNs of acute striatal slices from three genotypes (WT, HT, and KO). Summary graph of o-IPSC amplitudes (bottom) shows a significant genotype effect among the three groups. (WT vs. HT: ** $p=0.0017$; WT vs. KO: *** $p=0.0001$). **D -** Representative trace and summary graph of o-IPSC decay time in ventral striatum shows an increase in time to return to baseline. **E -** Representative traces (left) of IPSC elicited by opto-stimulation (o-IPSC) recorded in MSNs of acute dorsal striatal slices from three genotypes (WT, HT, and KO); Summary graph of o-IPSC amplitudes (bottom) shows no genotype effect among the three groups. **F-** Representative trace and summary graph of o-IPSC decay time in dorsal striatum shows no change in tau for both HT and KO compared to the WT group. **G-** Representative

traces (left) of spontaneous IPSC (sIPSC) recorded in ventral striatal MSNs of three genotypes. Cumulative distribution plots of sIPSC inter-event intervals (middle, WT vs. KO: * $p=0.038$) and amplitudes (right); insets: summary graphs of average sIPSC frequency (middle, WT vs. KO: * $p=0.04$) and amplitude (right). **H-** Representative traces (left) of spontaneous IPSC (sIPSC) recorded in dorsal striatal MSNs. Cumulative distribution plots of sIPSC inter-event intervals (middle) and amplitudes (right); insets: summary graphs of average sIPSC frequency (middle) and amplitude (right). Summary graphs show no genotype effect. Data in summary graphs are means \pm SEM; statistical comparisons were performed with One-Way ANOVA (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; non-significant comparisons are not labeled). Tukey's correction was used for all multiple comparisons. Kruskal-Wallis non-parametric test was used to compare cumulative distributions in **D** and **F**. Numbers in bars indicate the number of cells/mice. Each open circle in the summary graphs represent the averaged recording of each cell.

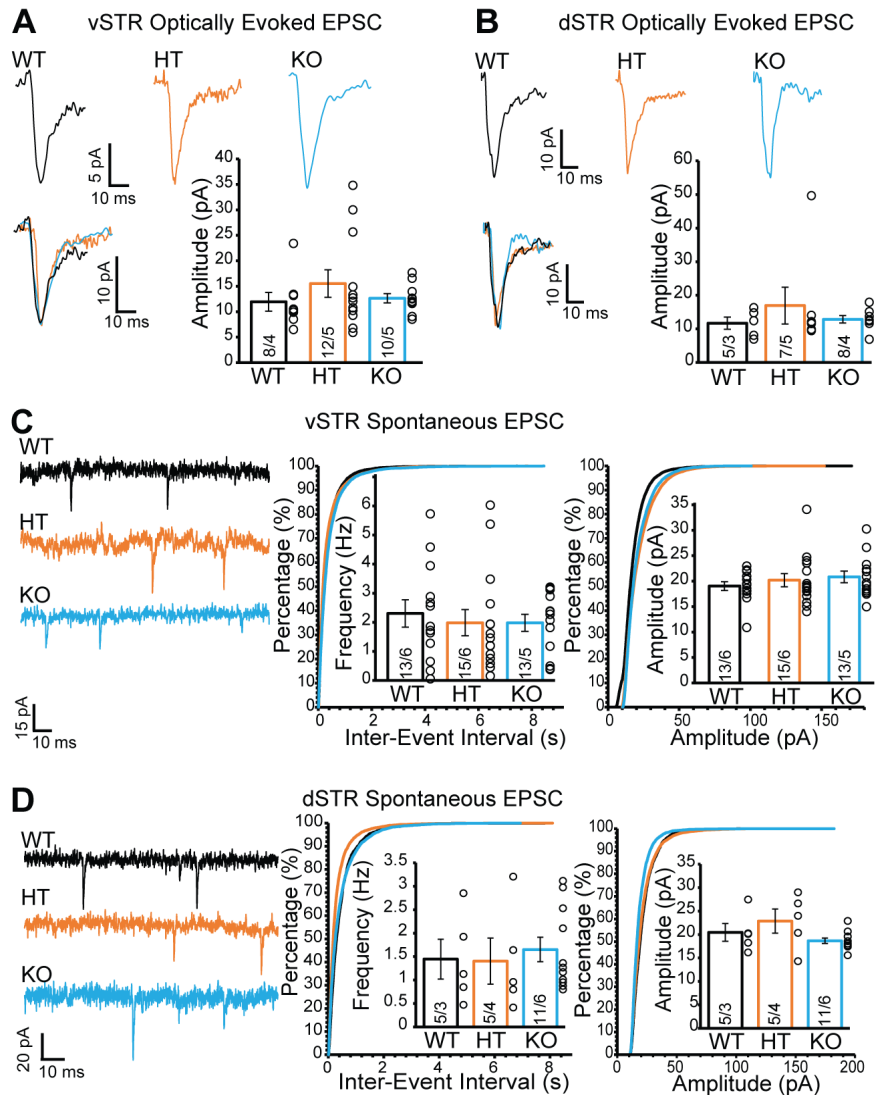


Figure 7 - Neurexins removal does not influence glutamate release from dopaminergic neurons in the ventral and dorsal striatum. **A-** Representative traces (top) of EPSC elicited by opto-stimulation (o-EPSC) recorded in ventral striatal MSNs. Summary graph of o-EPSC amplitudes (bottom) shows no genotype effect. **B-** Representative traces (top) of EPSC elicited by electrical-stimulation (e-EPSC) recorded in dorsal striatal MSNs. Summary graph of e-EPSC amplitudes (bottom) shows no genotype effect. **C-** Representative traces (left) of spontaneous EPSC (sEPSC) recorded in ventral striatal MSNs. Cumulative distribution plots of sEPSC inter-event intervals (middle) and amplitudes (right); insets: summary graphs of average sEPSC frequency (middle) and amplitude (right). **D-** Representative traces (left) of spontaneous EPSC

(sEPSC) recorded in dorsal striatal MSNs. Cumulative distribution plots of sEPSC inter-event intervals (middle) and amplitudes (right); insets: summary graphs of average sEPSC frequency (middle) and amplitude (right). Data in summary graphs are means \pm SEM; statistical comparisons were performed with One-Way ANOVA (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; non-significant comparisons are not labeled). Tukey's correction was used for all multiple comparisons.

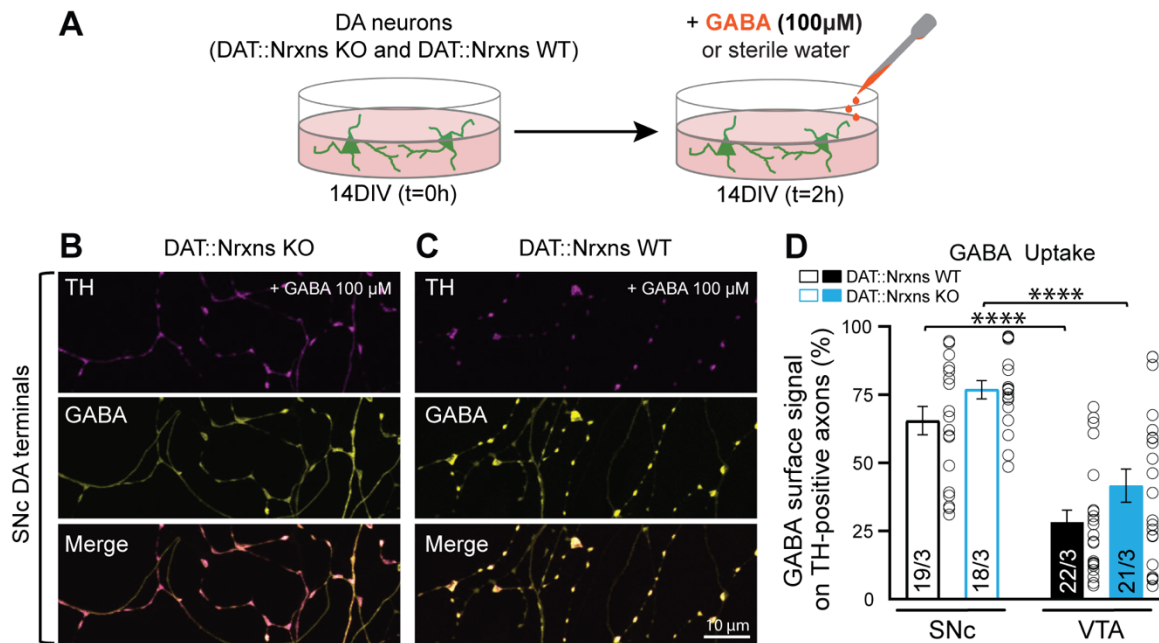


Figure 8 – GABA uptake from cultured DA neurons is unchanged after conditional deletion of all neurexins. **A** – Schematic representation of the experimental procedure for the GABA treatment in cultured DA neurons. **B** and **C**– Immunofluorescence of SNc DA neurons from Nrnx123 TKO (**B**) and Nrnx123 WT (**C**) for tyrosine hydroxylase (TH) and gamma-aminobutyric acid (GABA). **D** – Summary graphs representing the quantification of signal surface for GABA, in the different TH-positive axons examined from VTA and SNc Nrnx123 TKO DA neurons and VTA and SNc Nrnx123 WT DA neurons. N = 18-22 axonal fields from 3 different neuronal co-cultures.

The number of observations represent the number of fields from TH-positive neurons examined. For all analysis, graph plots represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Tukey's multiple comparison test. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

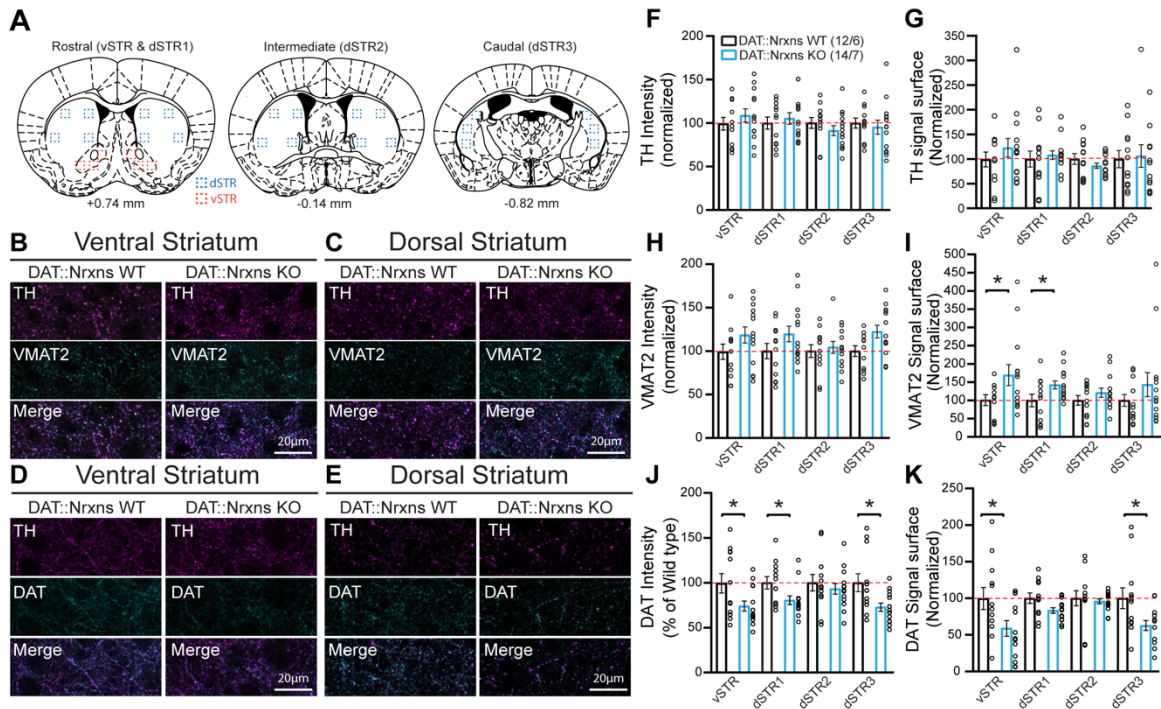
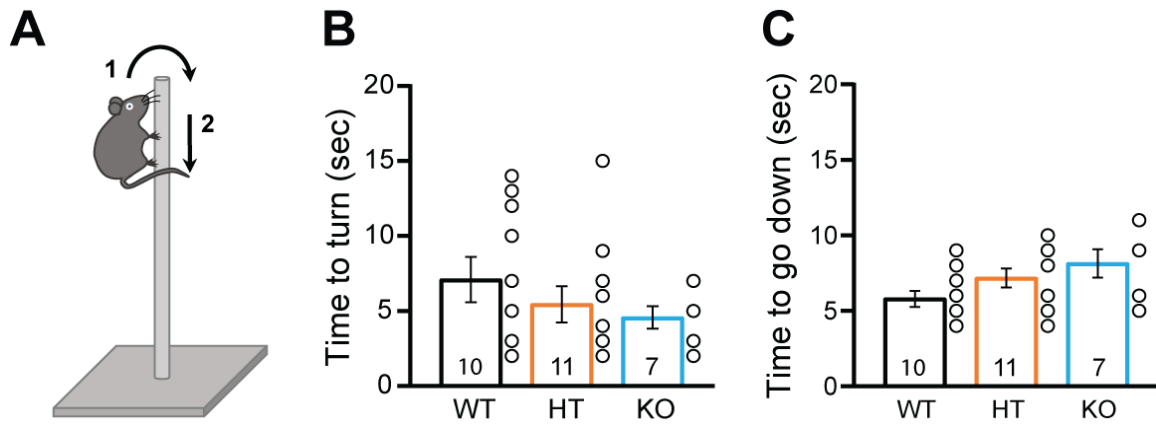
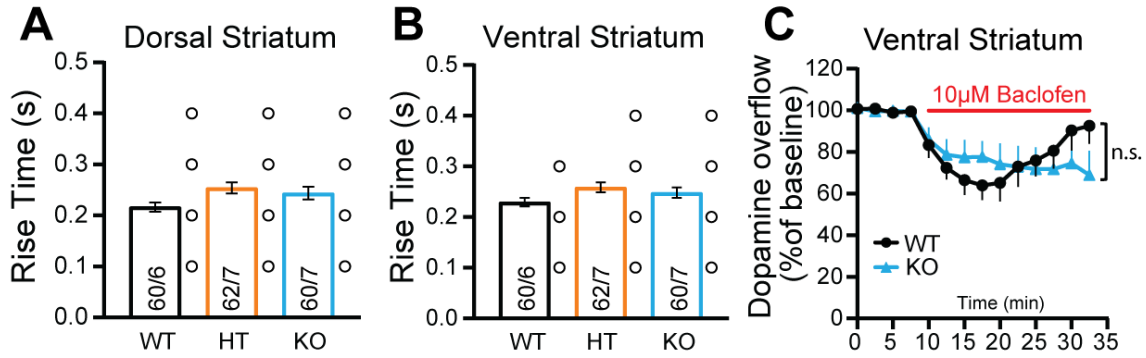


Figure 9 – Increased VMAT2 but decreased DAT expression in DA axon terminals lacking neurexins. A- Schematic representation of striatal slices used for immunohistochemistry characterization. Surface and intensity for each signal were measured in a series of 3 different striatal slices ranging from bregma +0.74 to bregma -0.82 mm, with a total of 14 different spots for each hemisphere. B and C - Immunohistochemistry of ventral (B) and dorsal (C) striatal slices from 8 week-old DAT::NrxnsKO and DAT::NrxnsWT mice (60X confocal) using tyrosine hydroxylase (TH) and vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2). D and E - Immunohistochemistry of ventral (B) and dorsal (C) striatal slices from DAT::NrxnsKO and DAT::NrxnsWT mice using TH and dopamine transporter (DAT). F to K - Quantification of signal surface (% of WT) for TH, VMAT2 and DAT in the different striatal regions examined: “vSTR, dSTR1, dSTR2 and dSTR3”

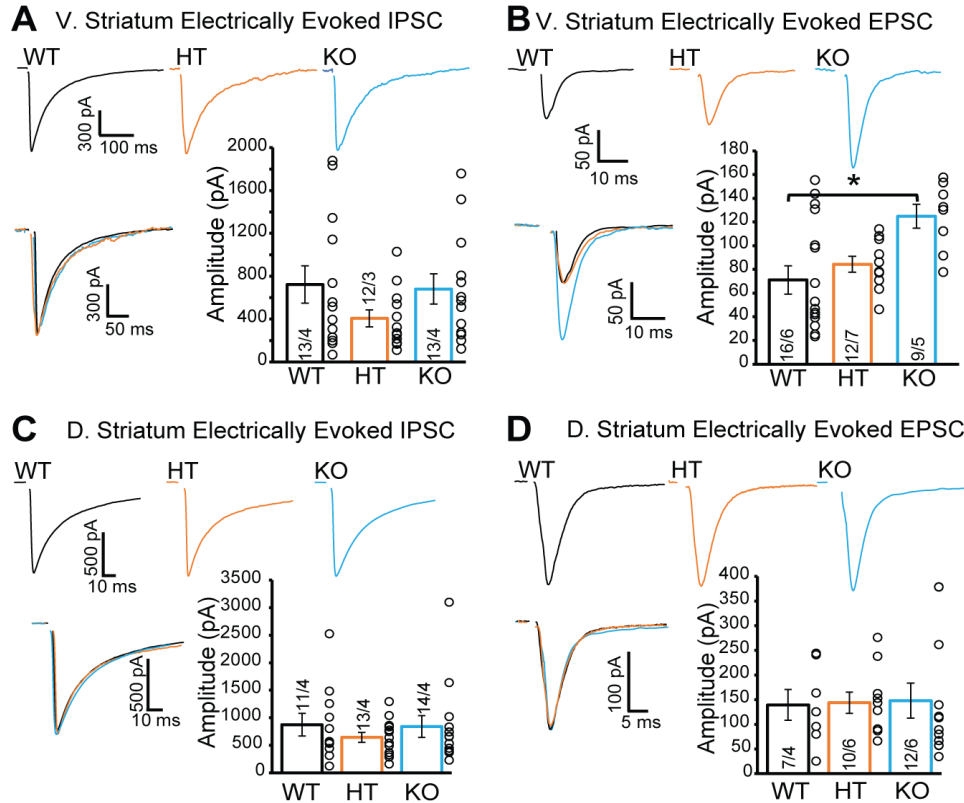
(DAT::NrxnsKO = 14 hemispheres/7 mice; DAT::NrxnsWT = 12 hemispheres/6 mice). Statistical analysis was carried out by unpaired t-test for each substructure. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).



Supplemental Figure 1 - No motor deficit with the pole test in DAT::NrxnsKO mice. A- schematic representation of the pole test procedure. B- Summary graph of the time to turn shows no genotype effect. C- Summary graph of the time to turn shows no genotype effect.



Supplemental Figure 2 – GABA_B receptor do not modulate DA release after conditional deletion of all neurexins. **A-** Summary graph of rise time in the dorsal striatum shows no genotype effect. **B-** Summary graph of rise time in the dorsal striatum shows no genotype effect. **C-** Plot of responses obtained after electrically evoked dopamine levels detected by fast-scan cyclic voltammetry in the ventral striatum, where DA overflow was measured in DAT::NrnxWT, HET and KO mice before and after treatment with 10 μ m of Baclofen.



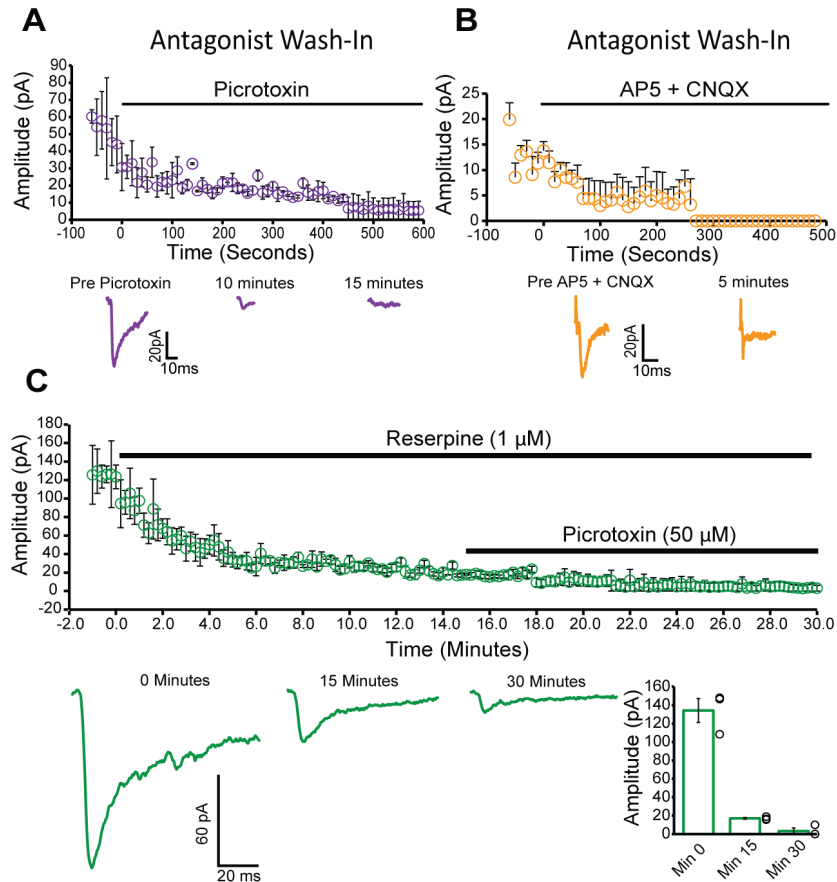
Supplemental Figure 3 – EPSC amplitude is increased after electrical stimulation in vSTR from DAT::NrnxKO mice.

A- Representative traces (top) of IPSCs elicited by electrical-stimulation (e-IPSC) recorded in ventral striatal MSNs. Summary graph of e-IPSC amplitudes (bottom) shows no genotype effect.

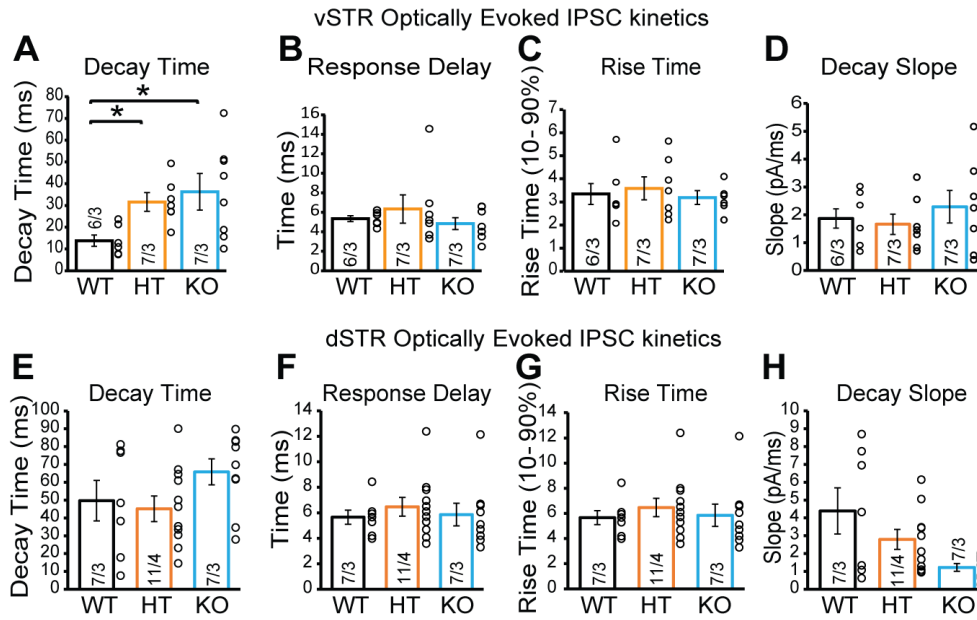
B- Representative traces (top) of EPSCs elicited by electrical-stimulation (e-EPSC) recorded in ventral striatal MSNs. Summary graph of e-EPSC amplitudes (bottom) shows genotype effect among two groups (WT vs KO).

C- Representative traces (top) of IPSCs elicited by electrical-stimulation (e-IPSC) recorded in dorsal striatal MSNs. Summary graph of e-IPSC amplitudes (bottom) shows no genotype effect. **D-** Representative traces (top) of EPSCs elicited by optical stimulation (o-EPSC) recorded in dorsal striatal MSNs. Summary graph of o-EPSC amplitudes (bottom) shows no genotype effect. Data in summary graphs are means \pm SEM; statistical

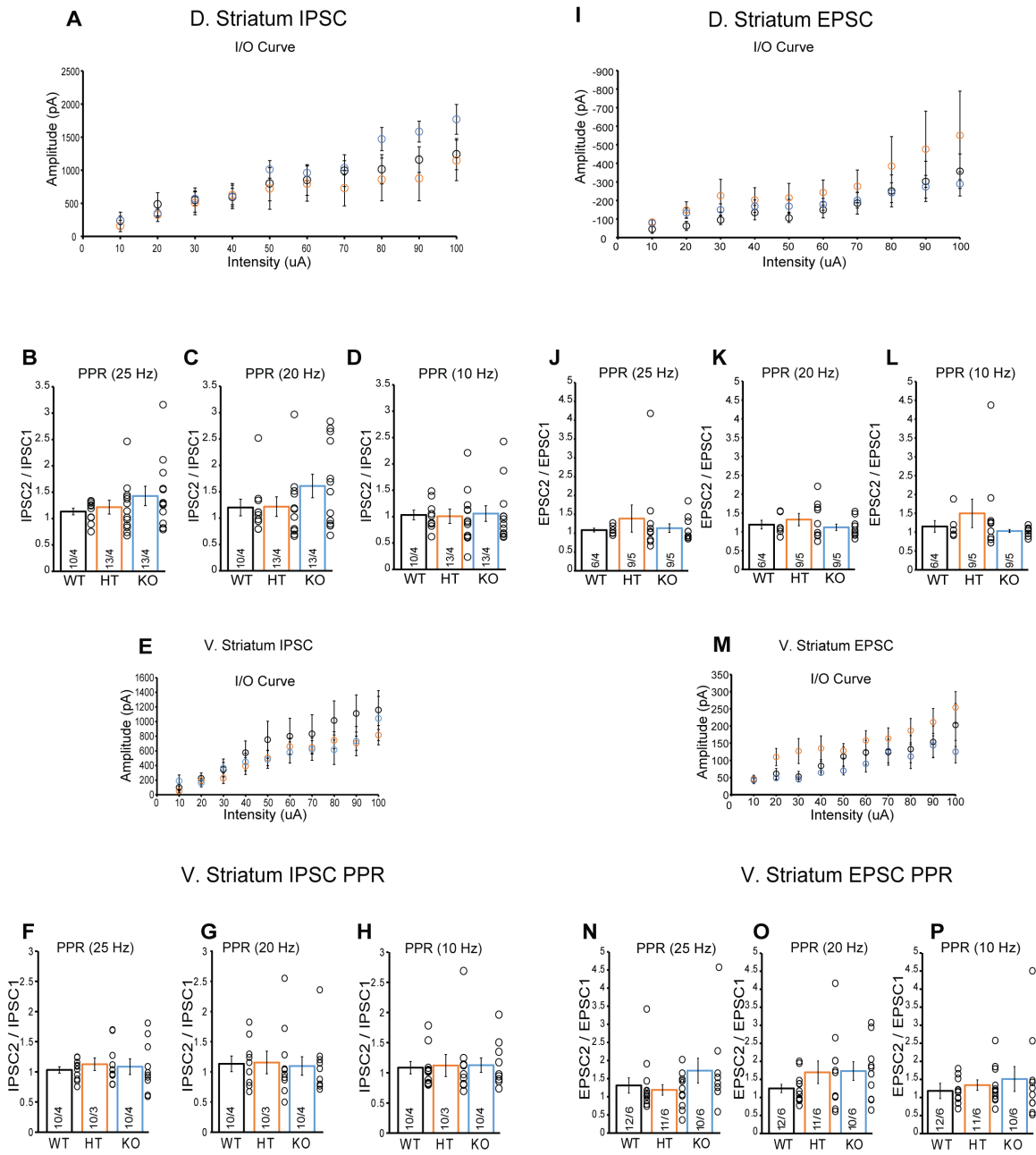
comparisons were performed with One-Way ANOVA (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; non-significant comparisons are not labeled). Tukey's correction was used for all multiple comparisons



Supplemental Figure 4 – Pharmacological properties of o-IPSCs and o-EPSCs recorded from MSNs in acute striatal slices. **A-** Plots of o-IPSC amplitude before and after incubation with the GABA_A receptor blocker Picrotoxin. **B-** Plots of o-EPSC amplitude before and after incubation with the AMPA and NMDA receptor blocker AP5 and CNQX, respectively. **C-** Plots of o-IPSC amplitude before and after incubation with the VMAT2 blocker reserpine.

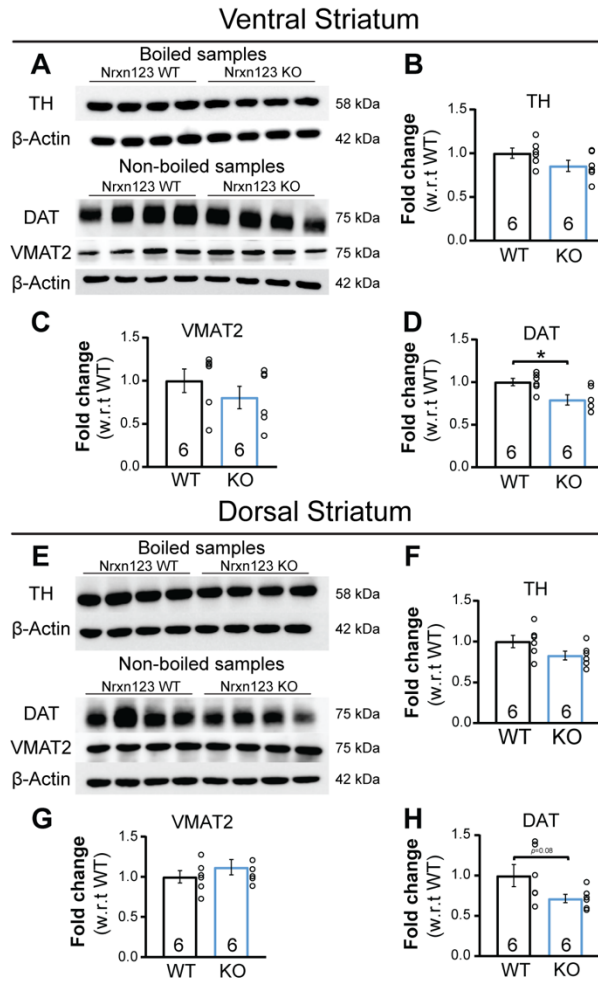


Supplemental Figure 5 –Removal of neurexins increases decay time of oIPSCs in ventral striatum but not dorsal striatum. A to D - Summary graphs of o-IPSC kinetics of MSNs in ventral striatum; (from left to right) decay time (A), latency from stimulation to response (B), rise time (C), and decay slope (D). E to H - Summary graphs of o-IPSC kinetics of MSNs in dorsal striatum; (from left to right) decay time (E), latency from stimulation to response (F), rise time (G), and decay slope (H).

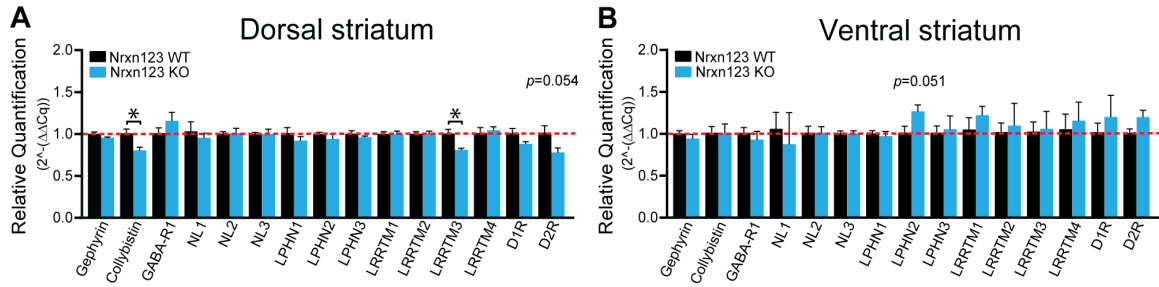


Supplemental Figure 6 – No change in synaptic plasticity of electrically-evoked IPSCs and EPSCs after conditional deletion of all Nrnxns in DA neurons - A. Scatterplot of IPSC input-output relationship in MSNs of the dorsal striatum; three genotype groups are shown; Wild-Type (WT), Heterozygous (HT), and Knockout (KO). **B.** Summary graph of GABAergic IPSC paired-pulse ratio (PPR) in MSNs of the dorsal striatum; two electrical pulses were delivered with an inter-stimulation interval (ISI) of 40 ms (25 Hz). **C.** Same as in **B**; ISI = 50 ms (20 Hz). **D.** Same as in **B**

and **C**; ISI = 100 ms (10 Hz). **E**. Scatterplot of IPSC input-output relationship in MSNs of the ventral striatum. **F**. Summary graph of GABAergic IPSC paired-pulse ratio (PPR) in MSNs of the ventral striatum; two electrical pulses were delivered with an inter-stimulation interval (ISI) of 40 ms (25 Hz). **G**. Same as in **F**; ISI = 50 ms (20 Hz). **H**. Same as in **F** and **G**; ISI = 100 ms (10 Hz). **I**. Scatterplot of EPSC input-output relationship in MSNs of the dorsal striatum. **J**. Summary graph of glutamatergic paired-pulse ratio (PPR) in MSNs of the dorsal striatum; two electrical pulses were delivered with an inter-stimulation interval (ISI) of 40 ms (25 Hz). **K**. Same as in **J**; ISI = 50 ms (20 Hz). **L**. Same as in **K** and **J**; ISI = 100 ms (10 Hz). **M**. Scatterplot of EPSC input-output relationship in MSNs of the ventral striatum. **N**. Summary graph of EPSC paired-pulse ratio (PPR) in MSNs of the ventral striatum; two electrical pulses were delivered with an inter-stimulation interval (ISI) of 40 ms (25 Hz). **O**. Same as in **N**; ISI = 50 ms (20 Hz). **P**. Same as in **N** and **O**; ISI = 100 ms (10 Hz).



Supplemental Figure 7 – Decrease of DAT protein expression in DA neurons from DAT::NrxnsKO mice. **A-** Representative western blots illustrating either TH, DAT, VMAT2 and β-actin from total striatum homogenates of adult mice. **B to D-** Immunoblot quantifying relative protein levels (fold change compared to controls) for TH (**B**), VMAT2 (**C**) and DAT (**D**) (n = 6 DAT::NrxnsWT, HET and KO mice). **E-** Representative western blots illustrating either TH, DAT, VMAT2 and β-actin from total striatum homogenates of adult mice. **F to H-** Immunoblot quantifying relative protein levels (fold change compared to controls) for TH (**F**), VMAT2 (**G**) and DAT (**H**) (n = 6 DAT::NrxnsWT, HET and KO mice). Error bars represent ± S.E.M. (ns, non-significant; *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001).



Supplemental Figure 8 - Gene expression profile in target cells of DA neurons after conditional deletion of Nrnx123. A and B– Relative changes of mRNA levels measured by RT-qPCR, from ventral and dorsal striatum medium spiny neurons: Gephyrin (Gphn), Collybistin (Arhgef9), GABA-A receptor (Gabra1), Neuroligins 1, 2 and 3 (Nlgn1, 2 and3), Latrophilins 1, 2 and 3 (Lphn1, 2 and 3), LRRTMs 1, 2, 3, 4 (LRRTM1, 2, 3 and 4), D1R (DRD1) and D2R (DRD2) in brain tissue from P80 DAT::NrnxWT, and DAT::NrnxKO mice.

Supplementary table 1 – qPCR primers for ventral and dorsal striatum

Gene	Oligo Forward	Oligo Reverse	Reference Sequences
Gphn	cctcgccagaataaccac	gacggctgctcatctgattac	NM_145965.2, NM_172952.3
Arhgef9	tgagaaaagcttctaaacagaaagg	gtactggccctggtttaacg	NM_001033329.3
Gabra1	cgatcctctctcccacactt	tttctcatcacgggcttg	NM_010250.5
Nlgn1	ctatcggcttgggtacttg	caaggagcccgtagtttctt	NM_138666.3, NM_001163387.1
Nlgn2	gaggaaaggggaatctctg	ggccgtgggaaggttaagt	NM_198862.2
Nlgn3	gaaggagggctccaagat	ggtccttctccttggtctgat	NM_172932.4
Adgrl1	cagtacgactgtgtcccttacatc	cagactgatgctctgactcatgt	NM_181039.2
Adgrl2	gagctgaagccgagtgagaa	cctgcatgtcttctctcgttt	NM_001081298.1
Adgrl3	aacaacctcctcagccaca	cgcagtgatcactgtcgt	NM_001347369.1
Lrrtm1	cgccctgcatataaattagcc	gaagcgctgggtcagaaa	NM_028880.3
Lrrtm2	gtagggacaaaacctgttgatt	aagtaggaagccagttgtggc	NM_178005.4
Lrrtm3	gacctgcacctatagcaaadc	tgccagaaaggtgacacat	NM_178678.4
Lrrtm4	gccatgattctcctggtgat	tgagtgtgttgagttgtttc	NM_001134743.1
Drd1	aggttgagcaggacatacgc	tggtactcgggatgtaaaag	NM_010076.3
Drd2	gatgcttgccattgttcttg	atcaggatgtcgtgatga	NM_010077.2
Gapdh	tgccgtcgtggatctgac	cctgctcaccacctcttg	NM_008084.2
Actb	aaggccaaccgtgaaaagat	gtgtacgaccagggcatac	NM_007393.3

Supplementary table 2 – Antibodies for Western Blot

Antibody used	Catalog Details	Raised in	Dilution used	RRID
DAT	MAB369 (Millipore)	Rat	1:1000	AB_2190413
TH	MAB318 (Millipore)	Mouse	1:1000	AB_2201528
VMAT2	Kind gift from Dr. Gary Miller, Emory University, USA	Rabbit	1:5000	NA
β -Actin	A3854(Sigma)	Purified from hybridoma cell culture	1:15000	AB_262011

Antibody used	Catalog Details	Dilution used	RRID
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	711-035-152 (Cedarlane)	1:5000	AB_10015282
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	112-035-003 (Cedarlane)	1:5000	AB_2338128
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	115-035-146 (Cedarlane)	1:5000	AB_2307392

CHAPITRE 4

Discussion et perspectives futures

À travers cette thèse nous avons ainsi voulu dresser le portrait de la connectivité des neurones à DA suite aux travaux pionniers de Laurent Descarries dans les années 1970 démontrant leur capacité incroyable à développer une majorité de terminaisons non-synaptiques.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé de façon exhaustive l'arborisation axonale DAergique en utilisant un système *in vitro* bien établi basé sur la co-culture de neurones DAergiques issus de l'ATV et de la SNc de souris avec des neurones du striatum ventral et dorsal, respectivement. Nous avons démontré que ces neurones sont dotés d'une très large arborisation axonale comportant une majorité (~70%) de terminaisons non-synaptiques alors qu'en comparaison, les terminaisons issues de neurones plus classiques comme les neurones glutamatergiques du cortex ou GABAergiques du striatum sont à l'inverse majoritairement (~80%) de type synaptique. La majorité de ces terminaisons (synaptiques et non-synaptiques) établies par les neurones DAergiques expriment des protéines impliquées dans l'exocytose telles que la protéine Syt-1 suggérant qu'une grande proportion (~70%) ont la capacité de libérer des neurotransmetteurs. Par la suite, en prenant avantage de la sonde fluorescente FM1-43, nous avons pu évaluer la capacité fonctionnelle des terminaisons synaptiques et non synaptiques établies par les neurones DAergiques. Nous avons observé que la majorité d'entre elles sont actives en réponse à une dépolarisation membranaire, corroborant les résultats obtenus avec les immunomarquages pour Syt-1. Puis, en lien avec des expériences permettant d'explorer le mécanisme de la formation des terminaisons synaptiques établies par les neurones DAergiques, nous avons mis en évidence le rôle important mais limité de la protéine d'adhésion présynaptique Nrxn-1 α^{SS4} ainsi que celui de la protéine d'adhésion postsynaptique Nlgn-1^{AB} dans la formation et le maintien des synapses excitatrices et inhibitrices établies par les neurones DAergiques.

Par la suite, dans une seconde partie de ce doctorat, sans aucun doute la plus importante, nous avons voulu poursuivre l'évaluation du rôle des Nrxns dans la synaptogénèse DAergique en

prenant avantage d'une souris transgénique où l'ensemble de l'expression des *Nrxn-1.2.3* ont été conditionnellement supprimées *DAT::NrxnsKO*. Dans cette étude, nous avons d'abord étudié l'impact de la suppression des *Nrxns* sur le développement des neurones à DA ainsi que leur capacité à former des synapses. Nous avons démontré que les neurones *DAT::NrxnsKO* se développent de la même façon que les neurones *DAT::NrxnsWT* et avec une proportion relativement identique (~15%) de terminaisons synaptiques. Par la suite, une évaluation du comportement locomoteur de base n'a pas révélé de grande différence entre les animaux *DAT::NrxnsKO* et les animaux de génotype sauvage *DAT::NrxnsWT*. Cependant, un traitement aigu à l'amphétamine permettant de stimuler le système DAergique, a révélé un déficit locomoteur significatif chez les souris *DAT::NrxnsKO* par rapport aux animaux de génotype sauvage. Par la suite, via des enregistrements électrophysiologiques nous avons évalué la co-transmission excitatrice et inhibitrice établie par les neurones DAergiques. Les résultats n'ont pas révélé de changement dans la neurotransmission excitatrice mais ont curieusement révélé un renforcement de l'activité synaptique inhibitrice chez les animaux *DAT::NrxnsKO* et ce par rapport aux animaux de souche sauvage, pouvant suggérer un rôle potentiellement inhibiteur de certaines *Nrxns* dans la neurotransmission inhibitrice établie par les neurones DAergique. Finalement, en prenant avantage de la voltamétrie cyclique nous avons évalué la libération de DA après la délétion des *Nrxns* et n'avons trouvé aucune différence en termes de relâche de DA entre les animaux *DAT::NrxnsKO* et *DAT::NrxnsWT*. Cependant, une analyse de la cinétique de recapture a démontré une cinétique plus lente chez les animaux *DAT::NrxnsKO*, pouvant suggérer une atteinte fonctionnelle du transporteur à la DA et ce en comparaison aux animaux du groupe sauvage.

1. Les terminaisons DAergiques sont majoritairement non-synaptiques

Tel que décrit précédemment, les travaux anatomiques de Laurent Descarries réalisés à la fin des années 1970 ont permis pour la première fois de mettre en évidence la capacité de ses neurones, à développer des terminaisons entièrement libres et donc totalement dépourvues de toute interaction directe avec un élément postsynaptique (Descarries et al., 1996; Descarries et al., 1997; Descarries and Mechawar, 2000). À la suite de ces travaux inédits, peu d'études additionnelles se sont intéressées à cette double connectivité établie par les neurones DAergiques. Nos travaux s'inscrivent pleinement dans la continuité de ceux réalisés par Laurent Descarries et un nombre limité d'autres chercheurs tels Kjell Fuxe en Suède, avec pour objectif d'étendre la caractérisation de ces terminaisons au niveau cellulaire et moléculaire.

Dans notre article intitulé « *Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals* » nous avons réalisé une caractérisation exhaustive de ces terminaisons DAergiques. Tout d'abord, via notre système *in vitro*, nous avons pu confirmer qu'une forte majorité (~80%) des terminaisons axonales établies par les neurones DAergiques sont entièrement dépourvues de toute apposition avec un domaine postsynaptique. Ces observations sont particulièrement frappantes lorsque mises en comparaison avec celles réalisées sur des neurones glutamatergiques du cortex et GABAergiques du striatum chez lesquels l'immense majorité (~80%) de leurs terminaisons est de type synaptique. Une des premières questions fondamentales que nous nous sommes posés en lien avec ces observations a été de déterminer si cette capacité à former des terminaisons non-synaptiques relève d'une propriété intrinsèque des neurones DAergiques ou alors si cela est imputable aux cellules cibles (MSNs) exerçant une influence directe sur la connectivité des neurones à DA. Pour ce faire, nous avons comparé la capacité des neurones DAergiques à développer des terminaisons libres avec ou en absence de cellules cibles (MSNs). En

prenant avantage du tri cellulaire automatisé (En anglais dans le texte : *Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS*) nous avons ainsi cultivé uniquement des neurones DAergiques et avons pu observer via la microscopie électronique à balayage cette même capacité à développer une multitude de terminaisons libres qu'avec la présence de cellules striatales. Ainsi, les résultats de ces expériences *in vitro* suggère fortement que les neurones DAergiques sont dotés d'un programme intrinsèque qui favorise le développement de terminaisons purement non-synaptiques.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons voulu affiner notre caractérisation des terminaisons DAergiques synaptiques et avons pris avantage de certains marqueurs postsynaptiques pour évaluer la proportion de synapses excitatrices et inhibitrices. En effet, il est maintenant bien établi que certains neurones DAergiques ont la capacité de co-libérer du glutamate et du GABA via des terminaisons synaptiques, justifiant un immunomarquage dirigé contre les protéines PSD95, retrouvé uniquement au niveau des synapses excitatrices et contre la protéine Géphyrine, retrouvée spécifiquement dans les synapses inhibitrices. Nos travaux, bien que réalisés sur un système *in vitro*, confirment de façon non-équivoque les premières observations anatomiques antérieures réalisées *in vivo* chez le rongeur et où 20% des terminaisons DAergiques sont de type synaptique (Descarries et al., 1996). Une autre étude sortie cette année montrent aussi très clairement le caractère non-synaptique de la connectivité DAergique. En effet, les travaux du groupe de Narayanan Kasthuri basé à Chicago ont très récemment obtenu des résultats allant dans le même sens où environ ~5% des terminaisons DAergiques observées en microscopie électronique à transmission sont de type synaptique (Wildenberg et al., 2020). Cependant, il est important de noter que dans cette étude, les auteurs ont également observé des contacts atypiques entre des terminaisons axonales DAergiques et d'autres éléments neuronaux mais sans détecter de marqueurs synaptiques classiques tels qu'une densité post-synaptique. Ces observations ont été retrouvées sur environ 15% des terminaisons axonales DAergiques.

Un point de discussion important, en lien avec cette connectivité si particulière, est de savoir si ces observations réalisées *in vitro* et *in vivo* chez le rongeur, sont pertinentes pour les autres espèces, et notamment chez le primate non-humain ainsi que chez l'homme? De très rares études existent et se sont révélées être particulièrement intéressantes notamment chez le primate non-humain. Une étude parue au milieu des années 90 a effectivement mis en avant le caractère asynaptique d'une grande partie des terminaisons DAergiques projetant au niveau du cortex préfrontal (Sesack et al., 1995). Une étude plus récente, toujours chez le primate non-humain, a aussi mis en avant le caractère fortement asynaptique de ces neurones où près de 94% des terminaisons DAergiques projetant au cortex préfrontal seraient dépourvues de toute apposition avec un domaine postsynaptique (Martin and Spuhler, 2013; Taber and Hurley, 2014). Chez l'homme, il existe aussi de très rares études en lien avec la connectivité des neurones DAergiques (et monoaminergiques d'une façon générale). Premièrement, une étude de caractérisation fonctionnelle du système DAergique a démontré une localisation extrasynaptique des récepteurs DAergiques de type D2, suggérant une transmission volumique identique à celle répertoriée chez les rongeurs (Drevets et al., 2001). Cependant, bien qu'aucune étude chez l'homme n'a démontré que les neurones DAergiques ont une connectivité non-synaptique, il est intéressant de prendre en compte les autres systèmes monoaminergiques connus pour avoir aussi la capacité de développer des terminaisons non-synaptiques. En effet, une étude très intéressante réalisée sur du tissu cérébral humain issu du cortex préfrontal a mis en avant des résultats différents de ceux obtenus chez le rongeur avec le système cholinergique. En effet, les auteurs de cette étude ont rapporté que 67% des terminaisons cholinergiques projetant au niveau du cortex préfrontal étaient de type synaptique. Ces résultats suggèrent donc une différence majeure avec ceux obtenus chez le rongeur où seulement 15% de ces mêmes terminaisons sont considérés comme synaptiques (Smiley et al., 1997). Dans les travaux réalisés sur du tissu cérébral humain, seule la microscopie électronique à transmission peut permettre de déterminer clairement si les terminaisons observées sont

préférentiellement synaptiques ou non-synaptiques. Cependant, il est fondamental de considérer certaines limitations techniques qui pourraient influencer les conclusions. En effet, pour ce genre d'étude il est impératif que le tissu collecté soit d'excellente qualité avec une préservation optimale des structures cellulaire et moléculaire. Du tissu fraîchement collecté puis fixé et inclus sans délais doit être l'option de choix. Malheureusement il est souvent difficile d'avoir accès à un tel matériel puisque généralement il s'agit de tissu collecté en post-mortem, limitant fortement sa qualité.

2. Les terminaisons dopaminergiques synaptiques et non-synaptiques expriment différents ensembles de protéines

Durant ces travaux de doctorat, nous avons mis en évidence que la majorité des terminaisons, qu'elles soient synaptiques ou non synaptiques, expriment des protéines essentielles au processus d'exocytose telles que la protéine Syt-1. Nous avons également mis en avant que les protéines de zone active comme RIM1/2 et Bassoon sont principalement ségréguées au sein des terminaisons DAergiques mais que la protéine Bassoon est principalement localisée au niveau des terminaisons qui sont proches d'une cellule cible. De plus, il est intéressant de noter qu'en parallèle de cette thèse, plusieurs études tout à fait passionnantes réalisées par le groupe de Pascal Kaeser à l'Université d'Harvard ont aussi permis de dresser le portrait moléculaire des terminaisons DAergiques. Ces différents travaux seront largement considérés dans cette sous-section de la discussion.

Avec l'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse de doctorat et les travaux réalisés en parallèle par d'autres groupes de recherche, il apparaît que la majorité des terminaisons DAergiques ont la machinerie de base pour la relâche de neurotransmetteurs. Nos résultats obtenus *in vitro* montrent qu'une grande proportion de ces terminaisons expriment le senseur calcique Syt-

1. Également, de très récents travaux réalisés *in vivo* par le groupe d'Etienne Herzog à l'Université de Bordeaux montrent, via la spectroscopie de masse, un enrichissement de la protéine SNAP25 ainsi que de la synaptophysine dans des synaptosomes DAergiques (Pfeffer et al., 2020). Ces résultats sont en accord avec la présence de vésicules synaptiques au sein des nombreuses varicosités DAergiques. Finalement, les travaux du groupe de Narayanan Kasthuri à Chicago, ont permis de confirmer par des observations en microscopie électronique qu'environ ~65% des varicosités axonales DAergiques contenaient bel et bien des vésicules synaptiques (Wildenberg et al., 2020). Fonctionnellement, le rôle de la protéine Syt-1 a été très récemment étudié par le groupe de Pascal Kaeser. Les auteurs de l'étude ont démontré qu'une délétion conditionnelle de la protéine Syt-1 au sein des neurones DAergique permet une abolition complète de la libération évoquée de DA (Banerjee et al., 2020a). Des résultats non publiés de notre groupe valident aussi cette conclusion (Delignat-Lavaud et al., en préparation). Cependant les auteurs ont mis en avant que le niveau basal de DA au sein du striatum reste à un niveau ~70% de celui observé dans les animaux de génotype sauvage, suggérant deux types de neurotransmission DAergique. L'une des hypothèses avancées est qu'une partie de la neurotransmission DAergique serait rapide, synchrone et sous la dépendance du senseur calcique Syt-1 avec une cinétique rapide. Il pourrait s'agir de « hot-spot » DAergiques. De l'autre côté, on retrouverait une transmission asynchrone, lente et diffuse, totalement indépendante du senseur calcique Syt-1 et qui permettrait de maintenir un certain niveau de DA basale extracellulaire au niveau des aires de projections telles que le striatum.

Par la suite, nous avons voulu déterminer si la structure moléculaire des terminaisons synaptiques et non-synaptiques établies par les neurones DAergiques pouvait être différente. Nos travaux ont dans un premier temps démontré, tout comme le groupe de Pascale Kaeser, que seule une minorité des terminaisons possèdent certaines des protéines de zone active comme Bassoon et RIM1/2 (Liu et al., 2018). Cependant, nos travaux ont révélé que la protéine de zone active Bassoon semble plus fréquemment retrouvée au niveau des terminaisons qui sont en contact ou à proximité

d'une cellule cible (MSNs). Il n'est pas impossible que l'explication réside en partie dans une étude publiée en 2000 où il a été démontré que les cellules cibles peuvent jouer un rôle dans la maturation des synapses pendant la synaptogénèse. En effet, il semble que certains neurones possèdent au début de la période de formation des synapses des sites de libération non-synaptiques qui sont fonctionnels, mobiles et qui expriment la protéine de zone active Bassoon (Ahmari et al., 2000; Krueger et al., 2003).

Plusieurs autres études du groupe de Pascal Kaeser ont également permis de déterminer quelles protéines de zone active sont importantes pour la neurotransmission DAergique. Par exemple, une suppression conditionnelle de la protéine de zone active RIM1/2 au sein des neurones DAergiques abolie complètement la libération évoquée de DA alors qu'une suppression conditionnelle de ELKS n'a aucun effet (Liu et al., 2018). Dans une étude encore plus récente, les auteurs ont également mis en avant le rôle fondamental de deux autres protéines de zone active, à savoir Munc-13 et l' α -Liprine où une délétion conditionnelle au sein des neurones DAergiques abolie là aussi la libération évoquée de DA (Banerjee et al., 2020b).

3. La majorité des terminaisons dopaminergiques sont fonctionnelles

Par la suite, nous avons porté notre attention sur l'évaluation de la fonctionnalité des terminaisons DAergiques. Pour ce faire nous avons pris avantage de la sonde fluorescente FM1-43 dans le but de mesurer l'activité endocytotique et exocytotique de l'ensemble des terminaisons DAergiques. Il s'agit là sans aucun doute d'une des expériences les plus importantes pour comprendre si ces terminaisons ont la capacité de libérer des neurotransmetteurs. Nos travaux ont mis en évidence qu'une grande majorité (~70%) des terminaisons DAergiques issues de l'ATV et de la SNc sont actives. De façon intéressante, ces expériences ont été réalisées au même moment où le groupe de recherche de David Sulzer basé à l'Université de Columbia venait de publier une

étude suggérant qu'une très faible proportion (~15%) des terminaisons DAergiques était fonctionnelle (Pereira et al., 2016). Les auteurs de cette étude ont pris avantage d'un analogue fluorescence de la DA agissant à titre de «*False Fluorescent Neurotransmitter*» (FFN200). Ils ont abouti à une conclusion totalement opposée à la nôtre, suggérant que seule une petite partie des terminaisons DAergiques étaient actives (Pereira et al., 2016). Ces résultats en opposition avec nos résultats peuvent potentiellement s'expliquer par le fait que le FFN200 est capté spécifiquement par le transporteur des monoamines VMAT2. Dans nos travaux nous avons montré que ~55% des terminaisons DAergiques expriment le transporteur VMAT2 limitant ainsi le nombre de terminaisons capable d'emmagasiner le FFN200. Cependant, bien que non discuté dans notre article original intitulé «*Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals* », il est important de mentionner que le FFN200 a été testé au sein du laboratoire et a révélé un emmagasinage fortement non-spécifique ne permettant pas d'aboutir à une conclusion fiable.

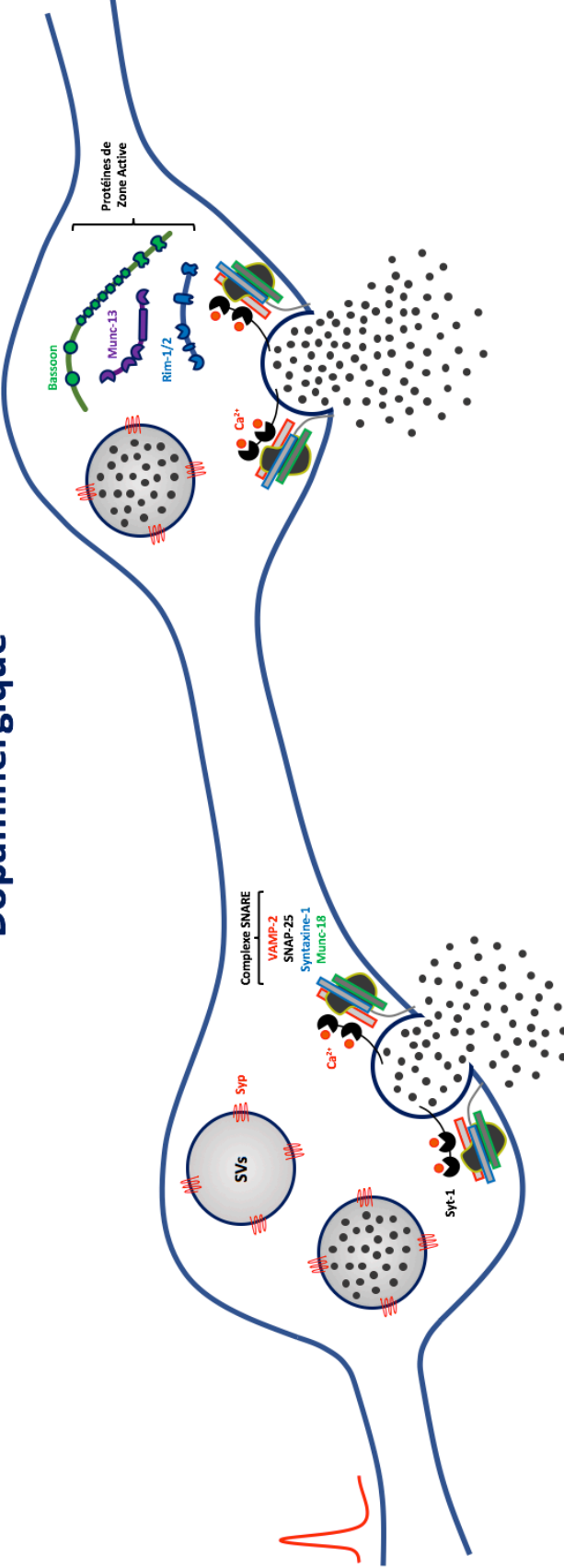
De plus, une étude intéressante réalisée par le groupe de Bryce Vissel à l'Université de Sydney a également démontré qu'une grande proportion des terminaisons DAergiques issus du mésencéphale (sans distinction des neurones de l'ATV et de la SNc) avait la capacité de charger et décharger le FM1-43 (Daniel et al., 2009). Bien que dans cette étude les conditions expérimentales aient été légèrement différentes des nôtres, elle n'en est pas moins importante. En effet les auteurs se sont uniquement intéressés aux terminaisons VMAT2-positives. Ils ont également observé qu'une forte majorité de ces terminaisons VMAT2-positives contenaient des protéines comme VAMP-2 ou SV2. Avec l'ensemble de ces résultats, que l'on peut qualifier d'hétérogènes, il serait intéressant via de nouvelles approches (utilisation du plasmide VMAT2-pHluorin ou la synaptophysine-pHluorin) de poursuivre les investigations quant à la fonctionnalité de ces terminaisons pour avoir une vision plus détaillée de la situation. Malgré tout avec l'ensemble de nos travaux et ceux des autres groupes, nous pouvons dresser le portrait suivant des terminaisons DAergiques (**Figure 1**).

Modèle proposé

Varicosité Dopaminergique

~ 60/70%

~ 20/30%



Majoritairement non-synaptique
(Relâche de DA)
Libération asynchrone et lente

Plutôt de nature synaptique
(Relâche de DA, Glu & GABA)
Libération synchrone et rapide

Figure 1 - Modèle proposé de l'organisation moléculaire et de la fonction des terminaisons DAergiques. (Descarries et al., 1996; Descarries et al., 2008; Daniel et al., 2009; Stuber et al., 2010; Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2016; Liu et al., 2018; Banerjee et al., 2020a; Ducrot et al., 2020).

4. Les protéines d'adhésions cellulaires Neurexines ont un rôle limité dans le développement de la connectivité des neurones dopaminergiques

Durant cette thèse de doctorat, nous avons dédié une part significative de nos recherches à la compréhension du mécanisme impliqué dans la formation des synapses DAergiques. Au début des années 1990, l'une des découvertes les plus extraordinaires dans le domaine des neurosciences a été celle des Nrxns (Ushkaryov et al., 1992). Depuis cette découverte, des dizaines d'études ont rapporté le rôle fondamental et indiscutable de ces protéines dans la formation, le maintien et le fonctionnement des synapses. Durant les décennies passées, la très grande majorité de ces études, si ce n'est la totalité, ont été réalisées sur des neurones glutamatergiques ou GABAergiques limitant fortement la diversité scientifique dans cette sphère de recherche. De plus, il est également bien établi qu'un potentiel phénotype issu d'une simple ou d'une double délétion des Nrxns peut être totalement masqué par la compensation des Nrxns restantes, rendant ainsi difficile sa mise en évidence (Aoto et al., 2015). Considérant cela, nous avons pris avantage d'un modèle absolument fascinant et totalement inédit nous permettant de supprimer spécifiquement l'expression de l'ensemble des Nrxns par les neurones DAergiques. De plus, de par la dualité de la connectivité des neurones à DAergiques et leur surprenante capacité à co-libérer du glutamate et du GABA (Sulzer et al., 1998; Dal Bo et al., 2004; Stuber et al., 2010; Tritsch et al., 2012), il est facile de voir que le portrait de la connectivité des neurones à DA est fondamentalement différent des autres sous-types neuronaux, donnant un aspect original à ces travaux de doctorat. Ainsi, en combinant des cultures primaires de neurones DAergiques, des tests comportementaux et des enregistrements

électrophysiologiques et électrochimiques, cette étude, en cours de finalisation, présente pour la première fois une évaluation majeure et sans précédent du rôle des Nrnx dans la formation, le maintien et le fonctionnement des synapses DAergiques.

Dans notre article de thèse intitulé « *Neurexins regulate GABA corelease by dopamine neurons* », nous avons dans un premier temps évalué les conséquences d'une abolition des Nrnx dans les neurones DA sur la synaptogénèse. De façon intéressante la perte d'expression des Nrnx ne semble avoir aucun impact directement mesurable sur la formation et le maintien des synapses excitatrices et inhibitrices établies par les neurones DAergiques. En effet, les analyses réalisées en microscopie confocale ne montrent pas de différence dans la proportion des terminaisons TH-positives étant en apposition avec les marqueurs postsynaptiques, PSD95 et Géphyrine et ce entre les neurones DAT::NrnxKO et les neurones DAT::NrnxWT. De plus, une analyse préliminaire mais détaillée de l'arborisation axonale ne démontre aucun changement tant sur l'expression de protéines critiques comme le censeur calcique Syt-1 ou encore le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2. Des analyses complémentaires ont également mis en avant que la taille et la complexité de l'arborisation axonale sont inchangés chez les neurones DAT::NrnxKO et ce, en comparaison avec les neurones DAT::NrnxWT. Ces résultats qu'on pourrait qualifier de « négatifs » pourraient s'expliquer par le fait que certaines autres protéines transynaptiques aient la capacité de compenser l'absence des Nrnx dans la synaptogénèse. La littérature rapporte d'ailleurs bien ce phénomène aussi bien pour des protéines transynaptiques présynaptiques que postsynaptiques (Aoto et al., 2015). Une des études intéressantes dans le contexte de nos travaux sur le système DAergique, mais qui concerne les protéines postsynaptiques, est celle du groupe de Masahiko Watanabee où le phénotype engendré par la délétion constitutive de la Nlgn-2 au sein du striatum était indétectable du fait d'une compensation de la Nlgn-3. L'approche optimale a été alors de diminuer l'expression de la Nlgn-2 via des ARNs interférents aboutissant ainsi à une baisse du nombre de synapses établies par les neurones DAergiques (Uchigashima et al., 2016).

Une de nos observations obtenues en étudiant le développement des neurones DA DAT::NrxnsKO *in vitro* est que la proportion de terminaisons DAergiques exprimant la protéine de zone active Bassoon était significativement diminuée au sein des neurones DAergique de la SNC. Il est intéressant de mettre ces résultats en parallèle avec ceux obtenus lors d'une étude très récente du groupe de Thomas Sudhöf à l'Université de Stanford, où une délétion de l'ensemble des Nrxns au sein des neurones du Calyx de Held, a également mis en avant une diminution de l'expression de la protéine Bassoon (Luo et al., 2020). Ces travaux soulèvent un questionnement sur le rôle central des Nrxns dans l'organisation des protéines de zone active. Comment les Nrxns participent-elles à l'organisation moléculaire de la zone active ? Cette question est pour le moment non élucidée mais l'une des explications possibles pourrait résider dans le rôle de la protéine CASK, protéine d'échafaudage au niveau présynaptique qui fait le lien entre les Nrxns et les protéines de zone active (Atasoy et al., 2007; LaConte et al., 2016). De plus, il sera intéressant de voir si cette baisse d'expression de certaines protéines de zone active comme Bassoon, aboutit à une désorganisation plus profonde de la terminaison telle qu'une densité vésiculaire différente. Dans le cadre de cette thèse, nous sommes présentement en train de finaliser des analyses en microscopie électronique à transmission, avec l'aide du Dr Martin Parent à Québec, pour justement documenter les possibles impacts d'une telle délétion sur l'ultrastructure des terminaisons DAergiques.

5. Renforcement de la co-transmission GABAergique par les neurones DAergiques après la délétion de l'ensemble des Nrxns

Un des objectifs centraux de cette deuxième étude était de comprendre plus en détails quels peuvent être les impacts d'une délétion des Nrxns sur le fonctionnement des synapses établies par les neurones DAergiques. Nous avons ainsi réalisé plusieurs enregistrements électrophysiologiques

via la technique de patch-clamp pour comprendre si les Nrns influencent le fonctionnement des synapses GABAergiques et glutamatergiques établies par les neurones DAergique. L'une des observations les plus fascinantes concerne la co-transmission GABAergique établie par les neurones à DA. En effet nos enregistrements ont révélés une augmentation de l'amplitude des IPSC évoqués dans les MSNs par la stimulation optogénétique des axones des neurones à DA chez les animaux DAT::NrnsKO. À l'inverse aucun changement n'a été détecté au niveau des EPSCs. Bien que l'ensemble de ces données soient pour le moment préliminaires et devront être complétés par des expériences additionnelles, une hypothèse est que certaines Nrns pourraient agir en temps normal comme des répresseurs de la transmission GABAergique. Pour le moment aucune étude n'a rapporté d'effet similaire malgré que ces protéines soient étudiées depuis près de 30 ans. En lien avec cette augmentation de l'amplitude des IPSC médiés par la co-transmission GABAergique, il est dans un premier temps légitime de se poser les questions suivantes : **1)** Est ce que l'augmentation de l'amplitude des IPSC est liée à une augmentation de la co-libération de GABA par les neurones DAergiques ? **2)** Ou alors est ce que l'augmentation de l'amplitude des IPSC est dû à une adaptation du côté postsynaptique avec par exemple un recrutement plus important de récepteur GABA_A potentiellement causé par une augmentation de l'expression de la Nlgn-2, reconnue pour son rôle important aux synapses inhibitrices ? Une étude particulièrement intéressante du groupe de Thomas Sudhöff pourrait suggérer une telle adaptation de la partie postsynaptique. En effet, dans cette étude les auteurs ont mis en avant que suite à la délétion de la protéine CASK en présynaptique, il y'avait une diminution d'expression des Nrns, mais aussi une augmentation de l'expression des Nlgn du côté postsynaptique démontrant clairement un phénomène d'adaptation homéostatique des protéines transynaptiques (Atasoy et al., 2007). De plus, une seconde étude réalisée là aussi par le groupe de Thomas Sudhöff a mis en avant un lien physique entre les Nrns et le récepteurs GABA_A. Dans cette étude les auteurs ont mis de l'avant le rôle particulièrement intéressant de la Nrns-2β dans ce couplage physique et fonctionnel. En effet, une surexpression de la Nrns-2β dans des neurones de l'hippocampe diminue fortement

l'amplitude des courants inhibiteurs post-synaptiques (IPSC). Ainsi nos résultats pourraient s'expliquer en partie par l'absence de couplage entre les Nrnxns et le récepteur GABA_A dans les neurones DAergiques DAT::NrnxnsKO et ainsi favoriser une augmentation de l'amplitude des IPSC générés par la stimulation optogénétique des terminaisons DAergiques.

Finalement et en conclusion de cette partie de discussion, il est maintenant de plus en plus établi que le rôle des Nrnxns dans la transmission synaptique est variable d'un type cellulaire à un autre, en fonction du type de neurone et de l'espèce étudiée. Les travaux du groupe de Thomas Sudhöf illustrent parfaitement cette h trog n it  du rôle des Nrnxn dans la transmission synaptique via deux publications où pour la première fois les souris triple cKO Nrnxns ont été étudiées (Chen et al., 2017; Luo et al., 2020). Dans notre cas il est particulièrement intéressant de noter que les Nrnxns semblent avoir un effet répresseur sur la libération de GABA par les neurones DAergiques, mais ne semblent pas jouer de rôle déterminant dans la libération de glutamate par les mêmes neurones.

6. La fonctionnalité du transporteur à la dopamine est altérée chez les souris Nrnxn^{-/-};DAT^{Cre}

Pour obtenir un aperçu fonctionnel du rôle des Nrnxns sur la neurotransmission DAergique, nous avons pris avantage de la technique de voltamétrie cyclique (*Fast Scan Cyclic Voltametry*) et effectué des enregistrements dans le striatum dorsal et ventral. Les résultats obtenus montrent que la suppression de l'ensemble des Nrnxns n'affecte pas de façon notoire la libération évoquée de DA, tant au niveau du dSTR que du vSTR. Cependant, nous avons observé que les animaux possédant un seul allèle des Nrnxn-1.2.3 (souris DAT::NrnxnsHET ou dites hétérozygotes) montrent une baisse significative de la libération évoquée de DA. Cette observation plutôt surprenante est pour le moment sans explication. Cependant il n'est pas impossible qu'un potentiel mécanisme de

compensation ne soit pas déclenché chez les souris DAT::NrxnsHET à cause de l'allèle restant et ce contrairement aux animaux DAT::NrxnsWT où la suppression des Nrxn est totale.

Dans un second temps, nous avons réalisé des analyses complémentaires sur la cinétique de relâche et de recapture de la DA pour en évaluer leur efficacité de la sécrétion de DA en quantifiant le temps de montée entre la stimulation électrique et le pic des niveaux extracellulaires de DA. L'efficacité de la recapture a été estimée via la constante de temps Tau de la décroissance des niveaux de DA après le pic (Yorgason et al., 2011). Nos résultats ont ainsi mis en avant que chez les souris DAT::NrxnsKO la recapture était significativement plus lente et ce en comparaison des animaux de souche sauvage. Ces résultats sont également à mettre en parallèle avec notre observation que les souris DAT::NrxnsKO ont une activité locomotrice diminuée en réponse à l'amphétamine et ce par rapport au groupe témoin. Il est bien établi que l'amphétamine diminue le stockage vésiculaire de la DA via le transporteur VMAT2 et favorise le transport inverse de la DA via le DAT, avec comme conséquence une augmentation importante des niveaux de DA au niveau extracellulaire. Ainsi, à la vue de nos résultats expérimentaux et des données de la littérature il pourrait être légitime de penser que chez les animaux déficients pour les Nrxns, l'expression du DAT soit altérée. Nos résultats d'immunobuvardage ne montrent cependant aucune différence dans l'expression totale du DAT dans le striatum entre les animaux DAT::NrxnsKO et ceux du groupe témoin. Ainsi deux explications s'offrent à nous : **1)** Chez les animaux DAT::NrxnsKO il pourrait y avoir une perte de fonction du transporteur DAT sans changement d'expression. **2)** Bien que l'expression globale du DAT soit inchangée entre les animaux DAT::NrxnsKO et DAT::NrxnsWT il n'est pas impossible qu'une partie du transporteur ne soit pas localisée au niveau de la membrane et reste au niveau cytoplasmique. De plus il est fort probable que suite à la délétion de l'ensemble des Nrxns certaines des terminaisons voient leur structure moléculaire désorganisée, ce qui pourrait avoir un impact sur la localisation subcellulaire de DAT. Cela est notamment appuyé par la baisse d'expression de la protéine de zone active Bassoon. Des analyses en microscopie électronique à

transmission sont présentement en cours de finalisation et nous permettront de voir si certaines des terminaisons DAergiques ont une ultrastructure différente après la délétion de l'ensemble des Nrxns.

7. Utilisation du modèle de synapses artificielles et rôle des Neuroligines dans la formation des synapses DAergiques

Depuis le début du 21^e siècle et avec l'avancée des sciences modernes, plusieurs modèles de co-cultures ont été développés dans le but d'étudier plusieurs aspects fondamentaux de la biologie neuronale. L'un des systèmes les plus intéressants mais aussi l'un des plus fascinants est celui des « synapses artificielles ». Il s'agit là d'un modèle où des neurones primaires sont mis en co-culture avec des cellules non-neuronales exprimant des protéines d'adhésion synaptiques. Plusieurs types cellulaires ont été utilisés dans cet objectif, dont les plus connues sont les cellules HEK293T (*Human Embryonic Kidney*). Les cellules COS (*CV-1 in Origin and carrying the SV40 genetic material*) sont aussi une excellente alternative. Ce modèle possède l'avantage de permettre de visualiser facilement les sites de contacts synaptiques et de déterminer précisément quelles protéines d'adhésions cellulaires sont véritablement impliquées dans la synaptogénèse. Ainsi durant ce doctorat, nous avons pris avantage de ce modèle de synapses artificielles dans le but d'évaluer certaines protéines candidates quant à leur rôle dans la synaptogénèse des neurones DAergiques. Dans notre article de thèse intitulé « *Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals* » nous avons évalué le rôle de la Nlgn-1 sur la formation des synapses DAergiques. En effet, l'une des questions centrales était de savoir si cette protéine essentielle à la formation des synapses glutamatergiques cortico-striatales a aussi un rôle sur les projections DAergiques issues de l'ATV et de la SNc au niveau du striatum. Nos résultats ont clairement mis en avant un rôle potentiel de la Nlgn-1 sur la synaptogénèse DAergique.

Dans cette expérience, la version longue contenant les deux sites d'épissages A⁺ et B⁺ a été utilisée. L'agrégation de terminaisons DAergiques sur les cellules HEK293T exprimant la Nlgn-1 démontre clairement qu'elle est permissive dans l'établissement des synapses DAergiques. L'une des explications possibles est une interaction avec la Nrnx1 β exprimée par certaines terminaisons DAergique favorisant ainsi un contact synaptique artificiel (Boucard et al., 2005). Cependant malgré que dans notre système *in vitro* de synapses artificielles la Nlgn-1 ait une activité positive sur la formation des synapses DAergiques, une question reste en suspens : Pourquoi *in vivo*, la Nlgn-1 exprimée au niveau des neurones striataux, donne avantage à la formation des synapses glutamatergiques corticales au détriment des synapses DAergiques ? Cette question est pour le moment non résolue mais il est possible qu'un facteur limitant de la synaptogénèse soit la quantité de molécules d'adhésions cellulaires (ex : Nrnxns) localisées au niveau des très nombreuses terminaisons DAergiques. Notre observation d'une augmentation de la proportion de synapses formées par les neurones DAergiques suite à une surexpression de la Nrnxn-1 est en accord avec cette possibilité. Par la suite et de façon intéressante, nous avons également évalué le rôle de la Nlgn-2 sur cette activité synaptogénique et ce via notre système de synapses artificielles. Nos résultats (non publiés dans cette thèse) suggèrent un rôle de cette protéine dans la formation des synapses DAergiques. Cette observation est en accord avec les travaux antérieurs du groupe de Masahiko Watanabe à l'Université de Sapporo, qui ont montré via un modèle *in vivo*, qu'une baisse d'expression de la Nlgn-2 par les neurones striataux réduit significativement la formation des synapses DAergiques (Uchigashima et al., 2016).

Dans ces expériences, il est bien entendu important de rester critique vis à vis des limitations du modèle de synapses artificielles. En effet, la formation de ces synapses dites « artificielles » est fortement dépendante de plusieurs facteurs incluant la densité des neurones mis en culture, la densité des cellules non neuronales (HEK ou COS) exprimant une protéine transynaptique ainsi que leur temps d'incubation de ces cellules (24h, 48h ou 72h). Plus la densité

de cellules non neuronales est importante et plus les chances qu'un contact synaptique se crée est important. Également, plus le temps d'incubation est important plus le nombre de synapses artificielles créées sera aussi important. Il est aussi important de mentionner que la quantité de protéines exprimées par les cellules HEK293T peuvent être plus importante que les niveaux physiologiques et mener ainsi à des résultats dits faux-positifs. Finalement, une autre limitation est que les cellules HEK293T n'expriment pas les autres familles de protéines transynaptiques qui pourraient inhiber la formation des synapses.

8. Directions futures

Au travers de cette thèse nos travaux démontrent que la majorité des terminaisons axonales DAergiques sont majoritairement de type non-synaptique, confirmant de précédentes observations réalisées *in vivo*. Il semble qu'au travers de cette thèse, la structure moléculaire des terminaisons synaptiques et non synaptiques établies par les neurones DAergiques soit hétérogène. Cependant, de nombreuses zones d'ombres subsistent encore en lien avec l'expression et la fonctionnalité de certaines protéines de zone active et tout particulièrement pour la protéine Bassoon. De plus, bien que nous ayons évalué pour la première fois le rôle des Nrns et de certaines Nlgn dans la synaptogénèse DAergiques, il sera nécessaire de compléter les investigations avec les protéines non étudiées et d'explorer d'autres familles de protéines transynaptiques pour avoir une vue détaillée et ainsi comprendre de quelle façon ces neurones développent une double connectivité. Finalement, il sera aussi intéressant d'évaluer si le caractère non-synaptique des neurones à DA ne serait pas un des facteurs de vulnérabilité dans un contexte de la maladie de Parkinson. Dans cette section, nous présenterons quatre perspectives de recherche pour continuer cette étude sur la connectivité des neurones DAergiques.

8.1. Quel rôle pour la protéine de zone active Bassoon dans la neurotransmission

DAergique ?

Tout au long de cette thèse de doctorat de nombreux travaux ont été publiés en parallèle de ceux obtenus au sein de notre laboratoire, notamment sur le rôle des protéines de zone active dans la neurotransmission DAergique. Nos travaux associés à ceux du groupe de Pascal Kaeser permettent une meilleure compréhension du rôle de la plupart des protéines de la zone active dans la neurotransmission DAergique. En effet et à ce jour, des études partielles ou complètes existent pour les protéines RIM1/2, Munc-13, Liprine2/3, ELKS et RIM-BP. Cependant, la fonctionnalité de la protéine Bassoon n'a pas encore été étudiée. Bien que nous ayons démontré que 30% des terminaisons axonales DAergiques expriment la protéine Bassoon, principalement dans celles localisées à proximité ou en contact d'une cellule cible, il serait particulièrement intéressant de réaliser une délétion conditionnelle au sein des neurones DAergiques pour en évaluer son importance. En effet, de par son rôle essentiel lors du développement des terminaisons axonales (voir partie 6.1) il est fort probable que l'organisation moléculaire d'une partie des terminaisons DAergiques soit fortement perturbée en l'absence de la protéine de zone active Bassoon. Une combinaison d'enregistrements électrochimiques associés à de la microscopie électronique permettrait d'évaluer le rôle de Bassoon dans la libération de DA ainsi que de visualiser son rôle dans l'organisation moléculaire des terminaisons DAergiques. De plus, en lien avec l'expression de la protéine de zone active Bassoon, il pourrait être intéressant d'évaluer la stabilité des terminaisons non-synaptiques établies par les neurones DAergiques. En effet, des travaux précédents sur le système glutamatergique ont rapporté que durant le développement axonal ces neurones avaient la capacité de former de façon transitoire des terminaisons non-synaptiques fonctionnelle et contenant la protéine de zone active Bassoon (Krueger et al., 2003). Ainsi, il serait intéressant d'extrapoler cette étude puis de voir si certaines terminaisons DAergiques non-synaptiques ont la capacité de devenir synaptique.

8.2. Quel rôle pour les autres protéines d'adhésion cellulaire dans la synaptogénèse

DAergique ?

Du côté de la synaptogénèse, nos travaux sont les premiers du genre à étudier le rôle des Nrns et des Nlgn dans la formation, le maintien et la fonction des synapses établies par les neurones DAergiques. Bien qu'inédits, ces travaux restent pour le moment incomplet puisque nous n'avons pas pu étudier l'ensemble de ces protéines. En utilisant une approche virale de surexpression il serait alors intéressant d'évaluer le rôle de la Nrnx-1 β , Nrnx-2 α/β et de la Nrnx-3 α/β sur la synaptogénèse DAergique. Les approches pourraient être *in vitro* mais également *in vivo* pour mesurer l'impact d'une telle surexpression le comportement animal. Également, il serait pertinent d'élargir cette étude aux autres familles de protéines transynaptiques telles que LAR-PTPS et les LRRTMs. Finalement, une des autres options qui s'offre à nous, serait de connaître l'ensemble des gènes nécessaires à la formation des synapses au sein d'une population neuronale purement synaptique (ex : neurones glutamatergiques) et d'en faire la comparaison avec ceux exprimés au sein des neurones DAergiques de l'ATV et de la SNC.

8.3. Connectivité non-synaptique et vulnérabilité des neurones DAergiques dans le contexte de la maladie de Parkinson.

Finalement, ces neurones DAergiques dotés d'une connectivité si particulière, sont également connus pour dégénérer dans la maladie de Parkinson. Il est bien établi que les synapses sont fondamentales pour la survie des neurones puisqu'en effet, des facteurs neurotrophiques comme le *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) activent des voies de survie cellulaire via des récepteurs tels que le récepteur à tyrosine kinase de type B (TrK-B), localisés à la synapse (Kaplan and Miller, 2000; Ginty and Segal, 2002). Pourquoi les neurones dopaminergiques, notamment

ceux de la SNc, dégèrent plus largement dans la maladie de Parkinson reste une question actuellement non résolue. Curieusement, les neurones DA de l'ATV, bien que moins vulnérables dans la maladie de Parkinson et dotés d'une arborisation axonale moins développée, établissent proportionnellement plus de synapses que ceux de la SN (Descarries et al., 2008; Stuber et al., 2010; Pacelli et al., 2015). Notre hypothèse est que le faible nombre de synapses établies par les neurones DA de la SNc pourrait être en partie responsable de leur plus grande vulnérabilité. Dans nos travaux, nous avons montré que la surexpression de la Nr1x1 augmentait de façon significative la proportion de synapses établies par les neurones DAergiques. Ainsi, il serait intéressant de tester l'hypothèse qu'une augmentation du nombre de synapses diminue la vulnérabilité des neurones DA de la SNc au 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP+) et à la roténone, deux agents toxiques fréquemment utilisés pour induire la mort des neurones DAergiques *in vitro*. Cette série d'expériences pourrait permettre de tester une nouvelle hypothèse concernant la vulnérabilité des neurones DA dans la maladie de Parkinson.

Références

- Agnati LF, Zoli M, Stromberg I, Fuxe K (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69:711-726.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.
- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3:226-230.
- Altrock WD et al. (2003) Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon. *Neuron* 37:787-800.
- Anderson GR, Aoto J, Tabuchi K, Foldy C, Covy J, Yee AX, Wu D, Lee SJ, Chen L, Malenka RC, Sudhof TC (2015) beta-Neurexins Control Neural Circuits by Regulating Synaptic Endocannabinoid Signaling. *Cell* 162:593-606.
- Antonopoulos J, Dori I, Dinopoulos A, Chiotelli M, Parnavelas JG (2002) Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. *Neuroscience* 110:245-256.
- Aoto J, Foldy C, Ilcus SM, Tabuchi K, Sudhof TC (2015) Distinct circuit-dependent functions of presynaptic neurexin-3 at GABAergic and glutamatergic synapses. *Nat Neurosci* 18:997-1007.
- Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W, Mukherjee K, Nosyreva ED, Fernandez-Chacon R, Missler M, Kavalali ET, Sudhof TC (2007) Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2525-2530.
- Augustin I, Korte S, Rickmann M, Kretzschmar HA, Sudhof TC, Herms JW, Brose N (2001) The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J Neurosci* 21:10-17.
- Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1987) Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 10:633-693.
- Banerjee A, Lee J, Nemcova P, Liu C, Kaeser PS (2020a) Synaptotagmin-1 is the Ca(2+) sensor for fast striatal dopamine release. *Elife* 9.
- Banerjee A, Imig C, Balakrishnan K, Kershberg L, Lipstein N, Uronen R-L, Wang J, Cai X, Benseler F, Rhee JS, Cooper BH, Liu C, Wojcik SM, Brose N, Kaeser PS (2020b) Molecular and functional architecture of striatal dopamine release sites. [bioRxiv:2020.2011.2025.398255](https://doi.org/10.1101/2020.2011.2025.398255).
- Barbeau A, Murphy GF, Sourkes TL (1961) Excretion of dopamine in diseases of basal ganglia. *Science* 133:1706-1707.
- Barrow SL, Constable JR, Clark E, El-Sabeawy F, McAllister AK, Washbourne P (2009) Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev* 4:17.
- Beaudet A, Descarries L (1978) The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* 3:851-860.

- Beaudet A, Sotelo C (1981) Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum. *Brain Res* 206:305-329.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182-217.
- Bertler A, Rosengren E (1959) Occurrence and distribution of catechol amines in brain. *Acta Physiol Scand* 47:350-361.
- Berube-Carriere N, Riad M, Dal Bo G, Levesque D, Trudeau LE, Descarries L (2009) The dual dopamine-glutamate phenotype of growing mesencephalic neurons regresses in mature rat brain. *J Comp Neurol* 517:873-891.
- Berube-Carriere N, Guay G, Fortin GM, Kullander K, Olson L, Wallen-Mackenzie A, Trudeau LE, Descarries L (2012) Ultrastructural characterization of the mesostriatal dopamine innervation in mice, including two mouse lines of conditional VGLUT2 knockout in dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 35:527-538.
- Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* 272:2520-2526.
- Biederer T, Scheiffele P (2007) Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation. *Nat Protoc* 2:670-676.
- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531.
- Birgner C, Nordenankar K, Lundblad M, Mendez JA, Smith C, le Greves M, Galter D, Olson L, Fredriksson A, Trudeau LE, Kullander K, Wallen-Mackenzie A (2010) VGLUT2 in dopamine neurons is required for psychostimulant-induced behavioral activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:389-394.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787-788.
- Birnbaum R, Weinberger DR (2017) Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 18:727-740.
- Bolam JP, Pissadaki EK (2012) Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Mov Disord* 27:1478-1483.
- Bolliger MF, Frei K, Winterhalter KH, Gloor SM (2001) Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem J* 356:581-588.
- Boucard AA, Chubykin AA, Comoletti D, Taylor P, Sudhof TC (2005) A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* 48:229-236.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 249 Suppl 3:III/1-5.
- Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256:1021-1025.

- Brose N, Hofmann K, Hata Y, Sudhof TC (1995) Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans unc-13* gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem* 270:25273-25280.
- Brown BL, Albano JD, Ekins RP, Sgherzi AM (1971) A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem J* 121:561-562.
- Budreck EC, Scheiffele P (2007) Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci* 26:1738-1748.
- Budreck EC, Kwon OB, Jung JH, Baudouin S, Thommen A, Kim HS, Fukazawa Y, Harada H, Tabuchi K, Shigemoto R, Scheiffele P, Kim JH (2013) Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:725-730.
- Caille I, Dumartin B, Bloch B (1996) Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res* 730:17-31.
- Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11:490-493.
- Carlsson A, Falck B, Hillarp NA (1962) Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand Suppl* 56:1-28.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127:471.
- Chanda S, Hale WD, Zhang B, Wernig M, Sudhof TC (2017) Unique versus Redundant Functions of Neuroligin Genes in Shaping Excitatory and Inhibitory Synapse Properties. *J Neurosci* 37:6816-6836.
- Chen LY, Jiang M, Zhang B, Gokce O, Sudhof TC (2017) Conditional Deletion of All Neurexins Defines Diversity of Essential Synaptic Organizer Functions for Neurexins. *Neuron* 94:611-625 e614.
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307:1324-1328.
- Choi WS, Palmiter RD, Xia Z (2011) Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J Cell Biol* 192:873-882.
- Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Sudhof TC (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54:919-931.
- Ciccarone D (2011) Stimulant abuse: pharmacology, cocaine, methamphetamine, treatment, attempts at pharmacotherapy. *Prim Care* 38:41-58.
- Courvoisier S, Fournel J, Ducrot R, Kolsky M, Koetschet P (1953) [Pharmacodynamic properties of 3-chloro-10-(3-dimethylaminopropyl)-phenothiazine hydrochloride (R.P. 4560); experimental study of a new substance used in potentialized anesthesia and in artificial hibernation]. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 92:305-361.
- Couteaux R (1963) The Differentiation of Synaptic Areas. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158:457-480.

- Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS (1996) Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16:3166-3177.
- Dachtler J, Glasper J, Cohen RN, Ivorra JL, Swiffen DJ, Jackson AJ, Harte MK, Rodgers RJ, Clapcote SJ (2014) Deletion of alpha-neurexin II results in autism-related behaviors in mice. *Transl Psychiatry* 4:e484.
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl:SUPPL 232:231-255.*
- Dal Bo G, St-Gelais F, Danik M, Williams S, Cotton M, Trudeau LE (2004) Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J Neurochem* 88:1398-1405.
- Dal Bo G, Berube-Carriere N, Mendez JA, Leo D, Riad M, Descarries L, Levesque D, Trudeau LE (2008) Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156:59-70.
- Daniel JA, Galbraith S, Iacovitti L, Abdipranoto A, Vissel B (2009) Functional heterogeneity at dopamine release sites. *J Neurosci* 29:14670-14680.
- Delay J, Deniker P, Harl, Grasset A (1952) [N-dimethylamino-propylchlorophenothiazine (4560 RP) therapy of confusional states]. *Ann Med Psychol (Paris)* 110:398-403.
- Deng L, Kaeser PS, Xu W, Sudhof TC (2011) RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron* 69:317-331.
- Descarries L, Mechawar N (2000) Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 125:27-47.
- Descarries L, Beaudet A, Watkins KC (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100:563-588.
- Descarries L, Watkins KC, Lapierre Y (1977) Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Res* 133:197-222.
- Descarries L, Gisiger V, Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53:603-625.
- Descarries L, Bosler O, Berthelet F, Des Rosiers MH (1980) Dopaminergic nerve endings visualised by high-resolution autoradiography in adult rat neostriatum. *Nature* 284:620-622.
- Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Bosler O, Doucet G (1996) Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol* 375:167-186.
- Descarries L, Berube-Carriere N, Riad M, Bo GD, Mendez JA, Trudeau LE (2008) Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev* 58:290-302.

- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.
- Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, Kinahan PE, Grace AA, Price JL, Mathis CA (2001) Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol Psychiatry* 49:81-96.
- Ducrot C, Bourque M-J, Delmas CVL, Racine A-S, Bello DG, Delignat-Lavaud B, Lycas MD, Fallon A, Michaud-Tardif C, Nanni SB, 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:2020.2005.2011.088351](https://doi.org/10.1101/2020.05.2011.088351).
- Dunah AW, Hueske E, Wyszynski M, Hoogenraad CC, Jaworski J, Pak DT, Simonetta A, Liu G, Sheng M (2005) LAR receptor protein tyrosine phosphatases in the development and maintenance of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 8:458-467.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 38:1236-1239.
- Eid L, Parent M (2015) Morphological evidence for dopamine interactions with pallidal neurons in primates. *Front Neuroanat* 9:111.
- El Beheiry M, Dahan M (2013) ViSP: representing single-particle localizations in three dimensions. *Nat Methods* 10:689-690.
- El Mestikawy S, Wallen-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12:204-216.
- Espinosa F, Xuan Z, Liu S, Powell CM (2015) Neuroligin 1 modulates striatal glutamatergic neurotransmission in a pathway and NMDAR subunit-specific manner. *Front Synaptic Neurosci* 7:11.
- Etherton MR, Blaiss CA, Powell CM, Sudhof TC (2009) Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17998-18003.
- Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A (1982) Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *Brain Res Bull* 9:xi-xv.
- Fasano C, Thibault D, Trudeau LE (2008) Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3:Unit 3 21.
- Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachee-Chardin M, Chedeville G, Tamary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G (2003) Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115:461-473.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 25:203-214.
- Fortin GM, Ducrot C, Giguere N, Kouwenhoven WM, Bourque MJ, Pacelli C, Varaschin RK, Brill M, Singh S, Wiseman PW, Trudeau LE (2019) Segregation of dopamine

- and glutamate release sites in dopamine neuron axons: regulation by striatal target cells. *FASEB J* 33:400-417.
- Fortin GM, Bourque MJ, Mendez JA, Leo D, Nordenankar K, Birgner C, Arvidsson E, Rymar VV, Berube-Carriere N, Claveau AM, Descarries L, Sadikot AF, Wallen-Mackenzie A, Trudeau LE (2012) Glutamate corelease promotes growth and survival of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 32:17477-17491.
- Frank T, Rutherford MA, Strenzke N, Neef A, Pangrsic T, Khimich D, Fejtova A, Gundelfinger ED, Liberman MC, Harke B, Bryan KE, Lee A, Egner A, Riedel D, Moser T (2010) Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca(2)+ channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68:724-738.
- Fu Z, Washbourne P, Ortinski P, Vicini S (2003) Functional excitatory synapses in HEK293 cells expressing neuroligin and glutamate receptors. *J Neurophysiol* 90:3950-3957.
- Garner CC, Waites CL, Ziv NE (2006) Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. *Cell Tissue Res* 326:249-262.
- Gauthier J, Parent M, Levesque M, Parent A (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834:228-232.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441-466.
- Giannone G, Mondin M, Grillo-Bosch D, Tessier B, Saint-Michel E, Czondor K, Sainlos M, Choquet D, Thoumine O (2013) Neurexin-1beta binding to neuroligin-1 triggers the preferential recruitment of PSD-95 versus gephyrin through tyrosine phosphorylation of neuroligin-1. *Cell Rep* 3:1996-2007.
- Giguere N, Burke Nanni S, Trudeau LE (2018) On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. *Front Neurol* 9:455.
- Giguere N, Delignat-Lavaud B, Herborg F, Voisin A, Li Y, Jacquemet V, Anand-Srivastava M, Gether U, Giros B, Trudeau LE (2019) Increased vulnerability of nigral dopamine neurons after expansion of their axonal arborization size through D2 dopamine receptor conditional knockout. *PLoS Genet* 15:e1008352.
- Gill GN, Garren LD (1969) On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: the binding of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate to an adrenal cortical protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:512-519.
- Ginty DD, Segal RA (2002) Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12:268-274.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917-925.
- Gonzalez-Hernandez T, Barroso-Chinea P, Acevedo A, Salido E, Rodriguez M (2001) Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons. *Eur J Neurosci* 13:57-67.
- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013-1026.

- Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93:420-433.
- Guadarrama Bello D, Fouillen A, Badia A, Nanci A (2017) A nanoporous titanium surface promotes the maturation of focal adhesions and formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions by osteogenic cells. *Acta Biomater* 60:339-349.
- Gundelfinger ED, Reissner C, Garner CC (2015) Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front Synaptic Neurosci* 7:19.
- Han Y, Kaeser PS, Sudhof TC, Schneggenburger R (2011) RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron* 69:304-316.
- Hardman CD, Henderson JM, Finkelstein DI, Horne MK, Paxinos G, Halliday GM (2002) Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei. *J Comp Neurol* 445:238-255.
- Hata Y, Butz S, Sudhof TC (1996) CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligins. *J Neurosci* 16:2488-2494.
- Held RG, Kaeser PS (2018) ELKS active zone proteins as multitasking scaffolds for secretion. *Open Biol* 8.
- Heuser JA, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L (1979) Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81:275-300.
- Hnasko TS, Chuhma N, Zhang H, Goh GY, Sulzer D, Palmiter RD, Rayport S, Edwards RH (2010) Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron* 65:643-656.
- Howes OD, Kapur S (2009) The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull* 35:549-562.
- Ichtchenko K, Nguyen T, Sudhof TC (1996) Structures, alternative splicing, and neuroligin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem* 271:2676-2682.
- Ichtchenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, Sudhof TC (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81:435-443.
- Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Sudhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277:1511-1515.
- Ivanova D, Dirks A, Fejtova A (2016) Bassoon and piccolo regulate ubiquitination and link presynaptic molecular dynamics with activity-regulated gene expression. *J Physiol* 594:5441-5448.
- Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Sudhof TC (2011) RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144:282-295.
- Kaneko T, Akiyama H, Nagatsu I, Mizuno N (1990) Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res* 507:151-154.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.

- Kebabian JW, Petzold GL, Greengard P (1972) Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2145-2149.
- Ko J, Fuccillo MV, Malenka RC, Sudhof TC (2009) LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron* 64:791-798.
- Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB (1997) Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* 7:368-373.
- Kotake C, Hoffmann PC, Heller A (1982) The biochemical and morphological development of differentiating dopamine neurons co-aggregated with their target cells of the corpus striatum in vitro. *J Neurosci* 2:1307-1315.
- Krueger SR, Kolar A, Fitzsimonds RM (2003) The presynaptic release apparatus is functional in the absence of dendritic contact and highly mobile within isolated axons. *Neuron* 40:945-957.
- Kuo JF, Greengard P (1969) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:1349-1355.
- Kwon HB, Kozorovitskiy Y, Oh WJ, Peixoto RT, Akhtar N, Saulnier JL, Gu C, Sabatini BL (2012) Neuroligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci* 15:1667-1674.
- Kwon SK, Woo J, Kim SY, Kim H, Kim E (2010) Trans-synaptic adhesions between netrin-G ligand-3 (NGL-3) and receptor tyrosine phosphatases LAR, protein-tyrosine phosphatase delta (PTPdelta), and PTPsigma via specific domains regulate excitatory synapse formation. *J Biol Chem* 285:13966-13978.
- LaConte LE, Chavan V, Liang C, Willis J, Schonhense EM, Schoch S, Mukherjee K (2016) CASK stabilizes neurexin and links it to liprin-alpha in a neuronal activity-dependent manner. *Cell Mol Life Sci* 73:3599-3621.
- Lehmann HC, Hartung HP, Kieseier BC (2007) Leopold Ordenstein: on paralysis agitans and multiple sclerosis. *Mult Scler* 13:1195-1199.
- Lehmann HE, Hanrahan GE (1954) Chlorpromazine; new inhibiting agent for psychomotor excitement and manic states. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 71:227-237.
- Li J, Ashley J, Budnik V, Bhat MA (2007) Crucial role of Drosophila neurexin in proper active zone apposition to postsynaptic densities, synaptic growth, and synaptic transmission. *Neuron* 55:741-755.
- Li X, Qi J, Yamaguchi T, Wang HL, Morales M (2013) Heterogeneous composition of dopamine neurons of the rat A10 region: molecular evidence for diverse signaling properties. *Brain Struct Funct* 218:1159-1176.
- Li Y, Mund M, Hoess P, Deschamps J, Matti U, Nijmeijer B, Sabinina VJ, Ellenberg J, Schoen I, Ries J (2018) Real-time 3D single-molecule localization using experimental point spread functions. *Nat Methods* 15:367-369.
- Liu C, Kershberg L, Wang J, Schneeberger S, Kaeser PS (2018) Dopamine Secretion Is Mediated by Sparse Active Zone-like Release Sites. *Cell* 172:706-718 e715.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Longenecker HE, Jr., Hurlbut WP, Mauro A, Clark AW (1970) Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction. Effects on end-plate potential, miniature end-plate potential and nerve terminal spike. *Nature* 225:701-703.
- Lu J, Machius M, Dulubova I, Dai H, Sudhof TC, Tomchick DR, Rizo J (2006) Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch. *PLoS Biol* 4:e192.
- Luo F, Sclip A, Jiang M, Sudhof TC (2020) Neurexins cluster Ca²⁺ channels within the presynaptic active zone. *EMBO J* 39:e103208.
- Martel P, Leo D, Fulton S, Berard M, Trudeau LE (2011) Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS One* 6:e20402.
- Martin KA, Spuhler IA (2013) The fine structure of the dopaminergic innervation of area 10 of macaque prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 37:1061-1071.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T (2009) Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci* 29:444-453.
- Matsushita N, Okada H, Yasoshima Y, Takahashi K, Kiuchi K, Kobayashi K (2002) Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem* 82:295-304.
- Mendez JA, Bourque MJ, Dal Bo G, Bourdeau ML, Danik M, Williams S, Lacaille JC, Trudeau LE (2008) Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci* 28:6309-6318.
- Missler M, Sudhof TC (1998) Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet* 14:20-26.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Sudhof TC (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939-948.
- Miyamoto E, Kuo JF, Greengard P (1969) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. 3. Purification and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. *J Biol Chem* 244:6395-6402.
- Monsma FJ, Jr., Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR (1990) Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6723-6727.
- Mukherjee K, Sharma M, Urlaub H, Bourenkov GP, Jahn R, Sudhof TC, Wahl MC (2008) CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. *Cell* 133:328-339.
- Mukherjee K, Yang X, Gerber SH, Kwon HB, Ho A, Castillo PE, Liu X, Sudhof TC (2010) Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6504-6509.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239:2910-2917.

- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024-1031.
- Naito Y, Tanabe Y, Lee AK, Hamel E, Takahashi H (2017) Amyloid-beta Oligomers Interact with Neurexin and Diminish Neurexin-mediated Excitatory Presynaptic Organization. *Sci Rep* 7:42548.
- Nguyen T, Sudhof TC (1997) Binding properties of neuroligin 1 and neurexin 1beta reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 272:26032-26039.
- Ogura T, Ogata M, Akita H, Jitsuki S, Akiba L, Noda K, Hoka S, Saji M (2005) Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 51:299-308.
- Pacelli C, Giguere N, Bourque MJ, Levesque M, Slack RS, Trudeau LE (2015) Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr Biol* 25:2349-2360.
- Parent M, Parent A (2006) Relationship between axonal collateralization and neuronal degeneration in basal ganglia. *J Neural Transm Suppl*:85-88.
- Parent M, Parent A (2010) Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. *Can J Neurol Sci* 37:313-319.
- Pereira DB, Schmitz Y, Meszaros J, Merchant P, Hu G, Li S, Henke A, Lizardi-Ortiz JE, Karpowicz RJ, Jr., Morgenstern TJ, Sonders MS, Kanter E, Rodriguez PC, Mosharov EV, Sames D, Sulzer D (2016) Fluorescent false neurotransmitter reveals functionally silent dopamine vesicle clusters in the striatum. *Nat Neurosci* 19:578-586.
- Perez-Lopez JL, Contreras-Lopez R, Ramirez-Jarquín JO, Tecuapetla F (2018) Direct Glutamatergic Signaling From Midbrain Dopaminergic Neurons Onto Pyramidal Prefrontal Cortex Neurons. *Front Neural Circuits* 12:70.
- Peters A, Palay SL (1996) The morphology of synapses. *J Neurocytol* 25:687-700.
- Pfeffer ME, Pronot M, Angelo M-F, Walle R, Cordelières FP, Levet F, Claverol S, Lacomme S, Petrel M, Martin C, Pitard V, Desmedt-Peyrusse V, Biederer T, Trifilieff P, Herzog E (2020) Synaptic and supra-synaptic organisation of the dopaminergic projection to the striatum. *bioRxiv:2020.2002.2018.952978*.
- Pickel VM, Joh TH, Reis DJ (1976) Monoamine-synthesizing enzymes in central dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. Immunocytochemical localization by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 24:792-306.
- Pickel VM, Beckley SC, Joh TH, Reis DJ (1981) Ultrastructural immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the neostriatum. *Brain Res* 225:373-385.
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F (2009) Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63:628-642.

- 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. *J Neurosci* 21:7247-7260.
- Rahbek-Clemmensen T, Lycas MD, Erlendsson S, Eriksen J, Apuschkin M, Vilhardt F, Jorgensen TN, Hansen FH, Gether U (2017) Super-resolution microscopy reveals functional organization of dopamine transporters into cholesterol and neuronal activity-dependent nanodomains. *Nat Commun* 8:740.
- Rice ME, Cragg SJ (2008) Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev* 58:303-313.
- Robinson BG, Bunzow JR, Grimm JB, Lavis LD, Dudman JT, Brown J, Neve KA, Williams JT (2017) Desensitized D2 autoreceptors are resistant to trafficking. *Sci Rep* 7:4379.
- Rothwell PE, Fuccillo MV, Maxeiner S, Hayton SJ, Gokce O, Lim BK, Fowler SC, Malenka RC, Sudhof TC (2014) Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly impair striatal circuits to boost repetitive behaviors. *Cell* 158:198-212.
- Sanchez G, Varaschin RK, Bueler H, Marcogliese PC, Park DS, Trudeau LE (2014) Unaltered striatal dopamine release levels in young Parkin knockout, Pink1 knockout, DJ-1 knockout and LRRK2 R1441G transgenic mice. *PLoS One* 9:e94826.
- Sano I, Gamo T, Kakimoto Y, Taniguchi K, Takesada M, Nishinuma K (1959) Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim Biophys Acta* 32:586-587.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.
- Schultz W (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30:259-288.
- Seeman P (2020) Oleh Hornykiewicz-In Memoriam. *Neuropsychopharmacology*.
- Seguela P, Watkins KC, Descarries L (1988) Ultrastructural features of dopamine axon terminals in the anteromedial and the suprarhinal cortex of adult rat. *Brain Res* 442:11-22.
- Sesack SR, Aoki C, Pickel VM (1994) Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci* 14:88-106.
- Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA (1995) Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J Comp Neurol* 363:264-280.
- Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT (2003a) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 179:9-16.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT (2003b) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23:10756-10764.

- Siddiqui TJ, Pancaroglu R, Kang Y, Rooyakkers A, Craig AM (2010) LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *J Neurosci* 30:7495-7506.
- Siksou L, Silm K, Biesemann C, Nehring RB, Wojcik SM, Triller A, El Mestikawy S, Marty S, Herzog E (2013) A role for vesicular glutamate transporter 1 in synaptic vesicle clustering and mobility. *Eur J Neurosci* 37:1631-1642.
- Silinsky EM, Ginsborg BL (1983) Inhibition of acetylcholine release from preganglionic frog nerves by ATP but not adenosine. *Nature* 305:327-328.
- Smiley JF, Morrell F, Mesulam MM (1997) Cholinergic synapses in human cerebral cortex: an ultrastructural study in serial sections. *Exp Neurol* 144:361-368.
- Snyder SH (2011) What dopamine does in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18869-18871.
- Song JY, Ichtchenko K, Sudhof TC, Brose N (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1100-1105.
- Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A (2010) Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J Neurosci* 30:8229-8233.
- Sudhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.
- Sudhof TC (2017) Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171:745-769.
- Sugita S, Khvochtev M, Sudhof TC (1999) Neurexins are functional alpha-latrotoxin receptors. *Neuron* 22:489-496.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4588-4602.
- Surmeier DJ, Graves SM, Shen W (2014) Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 29:109-117.
- Taber KH, Hurley RA (2014) Volume transmission in the brain: beyond the synapse. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 26:iv, 1-4.
- Tabuchi K, Sudhof TC (2002) Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 79:849-859.
- Takahashi H, Arstikaitis P, Prasad T, Bartlett TE, Wang YT, Murphy TH, Craig AM (2011) Postsynaptic TrkC and presynaptic PTPsigma function as a bidirectional excitatory synaptic organizing complex. *Neuron* 69:287-303.
- Taniguchi H, Gollan L, Scholl FG, Mahadomrongkul V, Dobler E, Limthong N, Peck M, Aoki C, Scheiffele P (2007) Silencing of neuroligin function by postsynaptic neurexins. *J Neurosci* 27:2815-2824.
- tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 142:499-509.
- Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76:33-50.

- Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL (2012) Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490:262-266.
- Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL (2016) Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci* 17:139-145.
- Tritsch NX, Oh WJ, Gu C, Sabatini BL (2014) Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. *Elife* 3:e01936.
- Trudeau LE, El Mestikawy S (2018) Glutamate Cotransmission in Cholinergic, GABAergic and Monoamine Systems: Contrasts and Commonalities. *Front Neural Circuits* 12:113.
- Trudeau LE, Hnasko TS, Wallen-Mackenzie A, Morales M, Rayport S, Sulzer D (2014) The multilingual nature of dopamine neurons. *Prog Brain Res* 211:141-164.
- Uchigashima M, Ohtsuka T, Kobayashi K, Watanabe M (2016) Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:4206-4211.
- Ullrich B, Ushkaryov YA, Sudhof TC (1995) Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* 14:497-507.
- Um JW, Ko J (2013) LAR-RPTPs: synaptic adhesion molecules that shape synapse development. *Trends Cell Biol* 23:465-475.
- Umbriaco D, Watkins KC, Descarries L, Cozzari C, Hartman BK (1994) Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *J Comp Neurol* 348:351-373.
- Usdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11168-11171.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Sudhof TC (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 257:50-56.
- Valdivia O (1971) Methods of fixation and the morphology of synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 142:257-273.
- Valtorta F, Madeddu L, Meldolesi J, Ceccarelli B (1984) Specific localization of the alpha-latrotoxin receptor in the nerve terminal plasma membrane. *J Cell Biol* 99:124-132.
- Van Lieshout EM, Van der Heijden I, Hendriks WJ, Van der Zee CE (2001) A decrease in size and number of basal forebrain cholinergic neurons is paralleled by diminished hippocampal cholinergic innervation in mice lacking leukocyte common antigen-related protein tyrosine phosphatase activity. *Neuroscience* 102:833-841.
- Varoqueaux F, Jamain S, Brose N (2004) Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol* 83:449-456.
- Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, Brose N, Enk C, Reim K, Rosenmund C (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal

- synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9037-9042.
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Sudhof TC, Brose N (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51:741-754.
- Waites CL, Leal-Ortiz SA, Okerlund N, Dalke H, Fejtova A, Altmann WD, Gundelfinger ED, Garner CC (2013) Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation. *EMBO J* 32:954-969.
- Wall NR, De La Parra M, Callaway EM, Kreitzer AC (2013) Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron* 79:347-360.
- Wang A, Xiang YY, Yang BB, Lu WY (2019) Neurexin-1alpha regulates neurite growth of rat hippocampal neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 11:115-125.
- Wang SSH, Held RG, Wong MY, Liu C, Karakhanyan A, Kaeser PS (2016) Fusion Competent Synaptic Vesicles Persist upon Active Zone Disruption and Loss of Vesicle Docking. *Neuron* 91:777-791.
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593-598.
- Wang Y, Schnitzbauer J, Hu Z, Li X, Cheng Y, Huang ZL, Huang B (2014) Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm. *Opt Express* 22:15982-15991.
- Wildenberg GA, Sorokina AM, Koranda JL, Monical A, Heer C, Sheffield ME, Zhuang X, McGehee D, Kasthuri N (2020) Cocaine causes rapid remodeling of dopaminergic axons, synapses, and mitochondria. *bioRxiv:2020.2009.2029.318881*.
- Woo J, Kwon SK, Choi S, Kim S, Lee JR, Dunah AW, Sheng M, Kim E (2009) Trans-synaptic adhesion between NGL-3 and LAR regulates the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 12:428-437.
- Xu J, Pang ZP, Shin OH, Sudhof TC (2009) Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release. *Nat Neurosci* 12:759-766.
- Yamaguchi K, Tanaka M, Mizoguchi A, Hirata Y, Ishizaki H, Kaneko K, Miyoshi J, Takai Y (2002) A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14536-14541.
- Yorgason JT, Espana RA, Jones SR (2011) Demon voltammetry and analysis software: analysis of cocaine-induced alterations in dopamine signaling using multiple kinetic measures. *J Neurosci Methods* 202:158-164.
- Zhang B, Chen LY, Liu X, Maxeiner S, Lee SJ, Gokce O, Sudhof TC (2015a) Neuroligins Sculpt Cerebellar Purkinje-Cell Circuits by Differential Control of Distinct Classes of Synapses. *Neuron* 87:781-796.
- Zhang S, Qi J, Li X, Wang HL, Britt JP, Hoffman AF, Bonci A, Lupica CR, Morales M (2015b) Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat Neurosci* 18:386-392.
- Zhou QY, Palmiter RD (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83:1197-1209.

Ziv NE, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly.
Nat Rev Neurosci 5:385-399.