

Université de Montréal

Mécanismes de la libération de dopamine dans le cerveau de souris

Par

Benoît Delignat-Lavaud

Département de Neurosciences

Faculté de Médecine

Thèse présentée

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

en Neurosciences

Université 
de Montréal



Août 2021

©Benoît Delignat-Lavaud, 2021

Université de Montréal

Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

**Mécanismes de la libération de dopamine dans le cerveau de
souris**

Présenté par

Benoît Delignat-Lavaud

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr Pierre-Paul Rompré
Président-rapporteur

Dr Louis-Éric Trudeau
Directeur de recherche

Dre Elvire Vaucher
Membre du jury

Dre Margaret E. Rice
Examineur externe

Résumé

Les neurones dopaminergiques (DA) du mésencéphale jouent un rôle clé dans le contrôle moteur, les comportements motivés et la cognition. Les neurones dopaminergiques peuvent libérer la DA non seulement à partir de leurs terminaisons axonales, mais également à partir de leur compartiment somatodendritique (STD). Une partie de cette libération dépend de l'activité électrique des neurones (libération phasique de DA), de l'influx de calcium et de l'activation de senseurs calciques, tandis que d'autres formes de libération impliquent l'activation locale d'afférences synaptiques en provenance d'autres neurones ou survient de manière spontanée. Les mécanismes et rôles physiologiques de ces différentes formes de libération sont encore méconnus. Dans cette thèse, je me suis intéressé spécifiquement à la libération phasique de dopamine et au rôle joué par les senseurs calciques régulateurs de l'exocytose de la famille des synaptotagmines (Syts). En utilisant des modèles *in vivo* de souris *knock-out* de certaines isoformes de cette famille, j'ai ainsi démontré que Syt1 est la principale isoforme impliquée dans la libération phasique de dopamine au niveau des terminaisons axonales, tandis que les isoformes Syt4 et Syt7 jouent un rôle plus spécifique dans la libération au niveau du soma et des dendrites. La souris Syt1 cKO^{DA} a par ailleurs révélé l'exceptionnelle résilience de certaines fonctions dopamino-dépendantes, notamment dans le contrôle de la locomotion spontanée et induites par des drogues, qui sont surprenamment conservées dans un contexte de quasi-abolition de la libération phasique de DA. Des adaptations importantes du système DA ont été observées chez les souris Syt1 cKO et sont comparables à celles observées dans les stades précoces de la maladie de Parkinson. Ces travaux apportent ainsi un nouvel éclairage sur pourquoi une perte drastique de l'innervation dopaminergique est requise pour aboutir aux symptômes moteurs typiques de cette maladie. Ils apportent également de nouvelles perspectives et modèles à l'étude des mécanismes et fonctions de la libération tonique (spontanée) de DA dans le cerveau.

Mots clés : dopamine, libération axonale, libération somatodendritique, synaptotagmines, maladie de Parkinson.

Abstract

Dopaminergic (DA) neurons in the midbrain play a key role in motor control, motivated behaviors and cognition. Dopaminergic neurons can release DA not only from axon terminals, but also from their somatodendritic compartment (STD). Part of this release depends on electrical activity (phasic release of DA), calcium influx and activation of calcium sensors, while other forms of release involve local activation of synaptic inputs from other neurons or occurs spontaneously. The mechanisms and physiological roles of these different forms of release are still poorly understood. In this thesis, I focused on the phasic release of DA and the role played by calcium sensors from the synaptotagmin (Syt) family regulating exocytosis. By using in vivo knockout mouse models of isoforms from this family, I demonstrated that Syt1 is the main calcium sensor involved in phasic DA release at axonal endings, while the Syt4 and Syt7 isoforms play a more specific role in the release at the level of the soma and dendrites. Syt1 cKO^{DA} model also revealed the exceptional resilience of certain DA-dependent functions such as spontaneous and drug-induced locomotion, which are surprisingly preserved in a context of a near abolition of phasic DA release. Important adaptations in the DA system were observed in Syt1 cKO mice and are comparable to those seen at early stages of Parkinson's disease. This work thus sheds new light on why a drastic loss of dopaminergic innervation is required to lead to the motor symptoms typical of this disease. They also bring new perspectives and models to the study of the mechanisms and functions of tonic (spontaneous) DA release in the brain.

Keywords: dopamine, axonal release, somatodendritic release, synaptotagmins, Parkinson disease

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	xii
Remerciements	xv
Chapitre 1 – Introduction	1
1.1. Le système dopaminergique	1
1.1.1. Aspects historiques.....	1
1.1.2. Anatomie du système dopaminergique	4
1.1.2.1. Nomenclature	4
1.1.2.2. Les noyaux dopaminergiques	5
1.1.2.3. Les voies de projections dopaminergiques	12
1.1.2.3.1. La voie nigrostriée	13
1.1.2.3.2. La voie mésolimbique et mésocorticale	13
1.1.2.3.3. Autres voies dopaminergiques.....	14
1.1.3. Hétérogénéité des neurones dopaminergiques	15
1.1.3.1. Hétérogénéité anatomique	15
1.1.3.2. Hétérogénéité neurochimique	17
1.1.3.3. Hétérogénéité fonctionnelle	18
1.1.3.4. Hétérogénéité génétique.....	19
1.1.4. Ontogenèse du système dopaminergique	22
1.2. Libération axonale de dopamine	24
1.2.1. Métabolisme de la dopamine.....	24
1.2.1.1. Biosynthèse de la dopamine.....	24
1.2.1.1.1. Hydroxylation de la tyrosine en L-DOPA par la TH.....	25
1.2.1.1.2. Décarboxylation de la L-DOPA en dopamine par la DCAA	26
1.2.1.1.3. Décarboxylation de la tyramine en dopamine par les Cyp2D	27
1.2.1.2. Stockage de la dopamine	29

1.2.1.3.	Libération exocytotique de dopamine.....	31
1.2.1.3.1.	Trafic vésiculaire	31
1.2.1.3.2.	Arrimage (docking)	32
1.2.1.3.3.	Amorçage (priming)	32
1.2.1.3.4.	Fusion	33
1.2.1.4.	Élimination extracellulaire de la dopamine	37
1.2.1.4.1.	Recapture de la dopamine.....	37
1.2.1.4.2.	Catabolisme de la dopamine.....	38
1.2.2.	Neurotransmission de la dopamine	39
1.2.2.1.	Récepteurs de la dopamine	39
1.2.2.1.1.	Famille D1	41
1.2.2.1.2.	Famille D2	41
1.2.2.2.	Voie de signalisation dopaminergique.....	43
1.2.2.3.	Fonctions des récepteurs dopaminergiques	44
1.2.2.4.	Concept de transmission volumique au compartiment axonal	46
1.2.2.5.	Activité tonique et phasique des neurones dopaminergiques	47
1.3.	Libération somatodendritique de dopamine.....	48
1.3.1.	Aspects historiques et méthodologiques	48
1.3.2.	Caractéristiques de la libération somatodendritique de dopamine.....	53
1.3.2.1.	Dépendance envers l'activité électrique	53
1.3.2.2.	Dépendance envers le calcium.....	55
1.3.2.2.1.	Conductances calciques	55
1.3.2.2.2.	Dépendance envers le calcium extracellulaire.....	57
1.3.2.2.3.	Rôle des canaux calciques voltage-dépendant (VGCCs).....	61
1.3.2.2.4.	Dépendance envers le calcium intracellulaire	64
1.3.3.	Stockage somatodendritique de dopamine.....	65
1.3.4.	Concept de transmission volumique de dopamine dans le compartiment somatodendritique	68
1.3.5.	Régulation de la libération somatodendritique de dopamine	70
1.3.5.1.	Régulation par les autorécepteurs D2	70
1.3.5.2.	Régulation par le glutamate et GABA	71

1.3.5.3.	Régulation par le peroxyde d'hydrogène	72
1.3.6.	Mécanismes de la libération somatodendritique	73
1.3.6.1.	Libération par le DAT via un transport inversé	73
1.3.6.1.1.	Cas de l'inversion induite par le sodium et le chlore	73
1.3.6.1.2.	Cas de l'inversion induite par l'amphétamine	73
1.3.6.1.3.	Cas de l'inversion induite par transmission synaptique	74
1.3.6.2.	Mécanismes exocytotiques de la libération somatodendritique de dopamine ..	76
1.3.6.2.1.	Machinerie moléculaire impliquée dans la libération somatodendritique ...	76
1.3.6.2.2.	Rôle de la famille des synaptotagmines	78
1.3.6.2.2.1.	Synaptotagmines 1, 2 et 9	81
1.3.6.2.2.2.	Synaptotagmine 7	81
1.3.6.2.2.3.	Synaptotagmine 4	86
1.3.6.2.2.4.	Synaptotagmine 11	88
1.3.7.	Fonctions de la libération somatodendritique	91
1.3.8.	Objectifs de la thèse	92
Chapitre 2 – Rôle de Syt4 et Syt7 dans la libération de dopamine (article I)		94
2.1. Abstract		97
2.2. Introduction		98
2.3. Materials and methods		100
2.4. Results		105
2.4.1.	D2 autoreceptors and DAT limit the extent of somatodendritic dopamine overflow in mouse VTA slices	105
2.4.2.	Optogenetic stimulation reveals strong use-dependent attenuation of evoked STD DA release in the VTA.....	106
2.4.3.	DA release in the VTA and striatum exhibit similar calcium dependency	107
2.4.4.	Dopamine neurons in vivo express the calcium-sensors synaptotagmin 1, 4 and 7	108
2.4.5.	Double knockout of Syt4 and Syt7 strongly reduces STD DA release.....	108
2.5. Discussion		110
2.6. References		113
2.7. Figures		116

Chapitre 3 – Rôle de Syt1 dans la libération de dopamine (article II)	124
3.1. Summary	127
3.2. Introduction	128
3.3. Methods	130
3.4. Results	141
3.4.1. Syt1 is the main calcium sensor for fast axonal dopamine release.	141
3.4.2. Syt1 deletion also reduces DA release in the ventral mesencephalon.	141
3.4.3. Somatodendritic optogenetic stimulation reveal unaltered STD DA release in the absence of Syt1.....	142
3.4.4. Syt1 cKO ^{DA} mice do not exhibit substantial motor defects.	144
3.4.5. Increased D2 autoreceptor and DAT function in Syt1 cKO ^{DA} mice.....	145
3.4.6. Higher D2 receptor density with no change in affinity in Syt1 cKO ^{DA} mice.	147
3.4.7. Adaptations of DA synthesis and packaging in Syt1 cKO ^{DA} mice.	148
3.4.8. Acute deletion of Syt1 in adult mice impairs DA release but prevents adaptations. 150	
3.4.9. Basal extracellular DA levels and total tissue DA are not altered in Syt1 cKO ^{DA} mice. 151	
3.5. Discussion	153
3.6. Figures and legends	160
3.7. Supplemental information	172
3.8. References	181
Chapitre 4 – Discussion	190
4.1. Caractéristiques de la libération somatodendritique de DA mesurés par voltammétrie cyclique dans des tranches mésencéphaliques de souris	190
4.2. Implication des synaptotagmines 4 et 7 dans la libération axonale et somatodendritique de dopamine	193
4.2.1. Rôle de Syt4 et Syt7 dans la libération de DA.....	193
4.2.2. Limitations de l'étude.....	194
4.2.2.1. Emploi de modèles de délétions constitutives	194
4.2.2.2. Rôle de Syt4 et 7 au niveau des astrocytes et concept de gliotransmission....	195

4.2.2.3. Limitations techniques et méthodologiques.....	197
4.3. Rôle de la synaptotagmine 1 dans la libération phasique de dopamine.....	199
4.3.1. Rôle de Syt1 dans la libération phasique axonale de dopamine	199
4.3.2. Rôle de Syt1 dans la libération phasique somatodendritique de dopamine	200
4.3.3. Rôle de la libération phasique de dopamine dans la régulation des comportements locomoteurs	204
4.3.4. Adaptations neurodéveloppementales chez les souris Syt1 cKO ^{DA}	206
4.3.4.1. Effet du KO de Syt1 sur le développement et la survie des neurones DA	206
4.3.4.2. Effet du KO de Syt1 sur la synthèse et le stockage de la DA	208
4.3.4.3. Effet du KO de Syt1 sur la recapture de la dopamine.....	208
4.3.4.4. Effet du KO de Syt1 sur la neurotransmission de la dopamine	211
 Chapitre 5 – Perspectives	213
5.1. Étude fonctionnelle du rôle de la libération phasique de dopamine.....	213
5.2. Étude des mécanismes et rôles de la libération asynchrone et spontanée de dopamine.....	217
5.3. Étude des mécanismes de trafic intracellulaire et de fusion des tubulovésicules contenant la dopamine	220
5.4. Implications dans un contexte pathologique : cas de la maladie de Parkinson....	222
 Conclusions	228
Bibliographie.....	229

Liste des tableaux

Tableau 1. – Propriétés génétiques, structurales et pharmacologiques des sous-types de récepteurs dopaminergiques (chez l’humain).	40
Tableau 2. – Voies de signalisation des récepteurs dopaminergiques.....	43
Tableau 3. – Évaluation de l’effet des VGCCs sur la libération STD de dopamine.	62
Tableau 4. – Localisation et fonctions des synaptotagmines dans le SNC.	79
Tableau 5. – Résumé des comportements analysés chez la souris NMDA cKODA présentant une libération phasique de DA altérée.	216

Liste des figures

Introduction

Figure 1. –	Nombre de publications par années, de 1945 à 2020, portant sur la dopamine et autres neurotransmetteurs.....	3
Figure 2. –	Distribution des différents groupes de neurones DA dans le cerveau de rongeur durant le développement (a) et chez l'adulte (b).....	5
Figure 3. –	Coupes coronales montrant la distribution anatomique et la cytoarchitecture des groupes de neurones A8, A9 et A10 selon l'axe rostro-caudal.	8
Figure 4. –	Nombres estimés de neurones dopaminergiques chez l'Homme, le singe, le rat et la souris dans la substance noire pars compacta (SNpc) et l'aire tegmentale ventral (VTA).....	12
Figure 5. –	Localisation des neurones dopaminergiques et leurs lieux de projections.....	14
Figure 6. –	Images d'IHC de cerveau de rat adulte montrant les neurones dopaminergiques de la SN et VTA du tiers ventral (vt) et dorsal (dt) du complexe mésencéphalique ventral.	16
Figure 7. –	Les modes de décharges lents et rapides des neurones dopaminergiques sont déterminés selon leurs zones de projection axonale.....	19
Figure 8. –	Voies de projections de sous-types de neurones dopaminergiques définies par génétique intersectionnelle.....	21
Figure 9. –	Facteurs moléculaires impliqués dans le développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral.....	23
Figure 10. –	Voies de biosynthèse et catabolisme de la dopamine.....	28
Figure 11. –	Remplissage vésiculaire des monoamines par le transporteur VMAT2.....	30
Figure 12. –	Représentation schématique de l'exocytose régulée par les protéines SNARE/SM.	35
Figure 13. –	Machinerie moléculaire impliquée dans la libération axonale de dopamine.....	36
Figure 14. –	Modèle de conductances ioniques dans la SNC et leur probable distribution dans l'espace.	57
Figure 15. –	Dépendance au calcium des voies nigrostriée et mésolimbique chez le cobaye. .	60
Figure 16. –	Stockage et libération de la dopamine au niveau somatodendritique.....	67
Figure 17. –	Régulation de la libération somatodendritique de dopamine par le glutamate, GABA et H ₂ O ₂ .	72

Figure 18. – Fonctions de Syt7 dans l'exocytose et l'endocytose au niveau synaptique.	85
Figure 19. – Rôle de Syt4 et Syt11 dans un modèle de Parkinson associé à parkin.....	90

Article I

Figure 1. – Optogenetic and electrical stimulation trigger comparable levels of somatodendritic dopamine release in mouse VTA slices.....	116
Figure 2. – Optogenetic stimulation reveals strong use-dependent attenuation of evoked STD DA release in the VTA.....	118
Figure 3. – Somatodendritic and axonal dopamine release exhibit a similar calcium dependency.	119
Figure 4. – Dopamine neurons express the calcium-sensors synaptotagmin 1, 4 and 7.....	120
Figure 5. – Double KO of Syt4 and Syt7 strongly reduces STD DA release.....	121
Figure 6. – Supplementary figure 1: Knockout validation of Syt4 and Syt7 antibodies	122

Article II

Figure 1. – Syt1 is the main calcium sensor for fast axonal dopamine release.	160
Figure 2. – Somatodendritic optogenetics reveals unaltered STD DA release in the absence of Syt1.	161
Figure 3. – Syt1 cKO ^{DA} mice do not exhibit any substantial motor defects.	163
Figure 4. – Increased D2 autoreceptor and DAT function in Syt1 cKO ^{DA} mice.....	165
Figure 5. – Higher D2 receptor density with no change in affinity in Syt1 cKO ^{DA} mice.	166
Figure 6. – Adaptations of DA synthesis and packaging in Syt1 cKO ^{DA} mice.....	167
Figure 7. – Acute deletion of Syt1 in adult mice impairs DA release but prevents adaptations.	169
Figure 8. – Basal extracellular DA levels and total tissue DA are not altered in Syt1 cKO ^{DA} mice.	171
Figure 9. – Figure S1- FSCV recordings in Syt1 cKO ^{DA} mice.	173
Figure 10. – Figure S2: Somatodendritic subcellular localization of Chr2-Kv in cultured dopamine neurons.	174

Figure 11. –	Figure S3: Autoradiography of D1 and D2 receptors in Syt1 cKO ^{DA} mice.....	175
Figure 12. –	Figure S4: Regional adaptations of the dopaminergic system of Syt1 cKO ^{DA} mice. 176	
Figure 13. –	Figure S5: No significant changes in the overall morphological development of cultured DA neurons.	178
Figure 14. –	Figure S6: Gene expression and protein levels in Syt1 cKO ^{DA} mice.....	180

Perspectives

Figure 1. –	Résultat de l’analyse de transcriptome présentant les principaux senseurs calciques exprimés dans des neurones purifiés du striatum, SN et VTA, provenant de souris nouveau-nées (P0) C57BL/6-JTH-GFP+.	219
Figure 2. –	La libération STD de DA est plus résistante que la libération axonale dans un modèle de lésion à la 6-OHDA.	225

Liste des sigles et abréviations

DA : Dopamine

STD : Somatodendritique

(c)KO : (conditional) Knock-out

WT : Wild-Type (type sauvage)

Syt : Synaptotagmine

(L-)DOPA : (L-)3,4-dihydroxyphenylalanine

HVA : homovanilic Acid (acide homovanilique)

MAO : Monoamines-oxydases

COMT : catéchol-O-méthyltransférase

5-HT : Sérotonine

NE : Norépinephrine (noradrénaline)

Adr : Adrénaline

Ach : Acétylcholine

SNC : Système Nerveux Central

SNe : Substantia Nigra pars compacta (Substance Noire compacte)

SNr : Substantia Nigra pars reticulata (Substance Noire réticulaire)

VTA : Ventral tegmental area (Aire Tegmentale Ventrale)

TDAH : Trouble du Déficit de l'Attention avec Hyperactivité

TH : Tyrosine Hydroxylase

RRF : Retrorubral Field (aire rétrorubral)

RLi : Rostral linear nucleus (noyau rostral linéaire)

CLi : Caudal linear nucleus (noyau caudal linéaire)

GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

PBP : Parabrachial pigmented nucleus (noyau pigmentée parabrachial)

PIF : parainterfascicular nucleus (noyau para-interfasciculaire)

IF : Interfascicular nucleus (noyau interfasciculaire)

PN : Paranigral nucleus (noyau paranigral)

GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

AP : Antéro-Postérieur

DV : Dorso-Ventral

ML : Médio-Latéral

DAT: Dopamine Transporter (transporteur de la dopamine)

VMAT2 : Vesicular Monoamine Transporter 2 (transporteur vésiculaire des monoamines 2)

MAP2 : Microtubule-associated protein 2

MSN : Medium Spiny Neuron (neurone épineux moyen)

MFB : Medial Forebrain Bundle (faisceau télencéphalique médian)

DCAA : Décarboxylase des acides-aminés aromatiques

vGAT : Vesicular GABA Transporter (transporteur vésiculaire du GABA)

vGlut : Vesicular Glutamate Transporter (transporteur vésiculaire du glutamate)

GIRK2 : G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2 (canal potassique à rectification entrante activé par les protéines G)

ALDH1a1 : aldéhyde déshydrogénase 1a1

Nac: Nucleus accumbens (noyau accumbens)

DRD : Dopaminergic Receptor (récepteur DA)

qRT-PCR : quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase quantatative avec transcription inverse)

GTP/GDP : guanosine triphosphate/diphosphate

ROS/RNS : Reactive Oxygen/Nitrogen Species (dérivés réactifs de l'oxygène/de l'azote)

SNARE : Soluble NSF-Attachment Protein Receptor

VAMP : vesicle-associated membrane protein

SNAP : synaptosomal associated protein

RRP : readily releasable pool

GPCRs : G-protein-coupled receptors (récepteurs couplés aux protéines G)

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

NMDA : N-methyl-D-aspartate

i.p. ; intra-péritonéale

IHC : Immuno-histochimie

ICC : Immuno-cytochimie

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)

IPSC/EPSC : Inhibitory/excitatory Postsynaptic Current (courant postsynaptique inhibiteur/excitateur)

TTX : Tétrodotoxine

FSCV : Fast Scan Cyclic Voltammetry

VGCC : voltage-gated Ca²⁺ channels (canaux calcique voltage dépendant)

RE : Reticulum endoplasmique

À ma famille

Remerciements

Le doctorat est une route longue et sinueuse, pavée de frustrations et d'expériences ratées, de week-end dans la salle froide et noire du microscope confocal. Néanmoins, en rétrospective et devant le fait établi de mettre un point final à son manuscrit de thèse, c'est également le moment où l'on réalise que c'est aussi une expérience des plus formatrices, autant d'un point de vue professionnel, que personnel. C'est avant tout une aventure humaine, et de ce fait n'aurait jamais pu être réalisée sans l'aide apportée par les nombreuses personnes que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces années.

En premier lieu, j'aimerais évidemment adresser mes remerciements à mon directeur de thèse, Louis-Eric Trudeau, pour sa confiance qu'il m'a accordé dans la réalisation de ce projet et également pour son support, son expertise et la passion qui l'anime dans la science.

Un très grand merci également à Marie-Josée Bourque, notre « boss officieuse » pour tout ce que qu'elle a apporté au laboratoire durant ces années. J'ai pu admirer sa grande intégrité scientifique, ses compétences techniques incroyables, son sens de la pédagogie et son écoute. Mais avant tout, ce sont ses qualités humaines que nous devons tous louer. Cela a été un grand honneur d'avoir pu travailler avec elle.

Merci à mes parrains, Jean-Claude Lacaille et Jonathan Brouillette, ainsi qu'aux membres de mon jury de thèse Pierre-Paul Rompré, Elvire Vaucher et Margaret E. Rice.

Merci également à tous mes collègues, stagiaires, collaborateurs et amis, particulièrement à ceux m'ayant aidé à la réalisation de mes projets : Charles Ducrot, Samuel Burke-Nanni, Nicolas Giguère, Willemieke Kouwenhoven, Sriparna Mukherjee, Nina Feller, Jana Kano, Catherine Lévesque, Daniel Lévesque, Ian Massé, Louis De Beaumont, Luc Moquin et Pedro Rosa-Neto.

Un très grand merci à mes amis m'ayant suivi dans mon aventure montréalaise, voir pour certains depuis plus longtemps encore : Olivier Kerdiles, Clément Bourguignon, Clémence Peyrot, Chloé Guinaudie, Julie Bailly, Aurélien Morel, Lola Welsch, Alexa Pichet Binette et David Potrel.

Enfin évidemment un très grand merci à ma famille, mes parents, mes frères Augustin et Antoine, ma sœur Marie-Eulalie et ma belle-sœur Pauline. Leur soutien indéfectible a vraiment été un moteur qui m'a permis d'aller si loin. Un très grand merci.

Chapitre 1 – Introduction

Dans ce premier chapitre introductif nous allons faire une description globale du système dopaminergique, en étudiant ses aspects historiques, neuroanatomiques et fonctionnels. Nous allons en particulier nous concentrer sur les mécanismes connus de la libération de la dopamine, à deux niveaux : dans un premier temps au niveau du compartiment axonal et dans un second temps au niveau des corps cellulaires et des dendrites de ces neurones.

1.1. Le système dopaminergique

1.1.1. Aspects historiques

La dopamine (DA) a été initialement synthétisée en 1910 par George Barger et James Ewens au *Wellcome laboratories* de Londres. La même année, un de leur collègue, Henry Dale, étudie l'activité biologique de cette molécule, encore sans autre nom que celui donné par la nomenclature chimique : la 3,4-dihydroxyphényléthylamine. Il lui découvre alors une faible activité sympathicomimétique, de manière analogue à l'hormone adrénaline. Pour les contemporains de l'époque, il ne s'agissait alors de rien de plus qu'une observation intéressante, et de fait, dans les 30 années qui suivirent sa synthèse, aucune nouvelle découverte notable ne fut faite concernant la DA.

En 1938, le pharmacologiste allemand Peter Holtz fait la découverte de l'enzyme dopa-décarboxylase et de son activité biologique dans des homogénats de tissus (en particulier de rein). Il démontre l'activité de cette enzyme dans la synthèse de DA à partir de levodopa ou L-DOPA (1-3,4-dihydroxyphenylalanine). Celle-ci a été isolée pour la première fois en 1913 par Marcus Guggenheim à partir de plantules de *Vicia faba*, mais n'a montré initialement aucune activité biologique. Sur la base de cette découverte Hermann Blaschko à Cambridge, établit en 1939 pour la première fois la voie de synthèse des catécholamines. Dans celle-ci, la DA apparaît comme un simple intermédiaire dans la voie de synthèse conduisant à la noradrénaline (et donc d'adrénaline). Le rôle de la DA est alors négligé, essentiellement parce que ses propriétés sympathicomimétiques sont très faibles par rapport à celles de la noradrénaline.

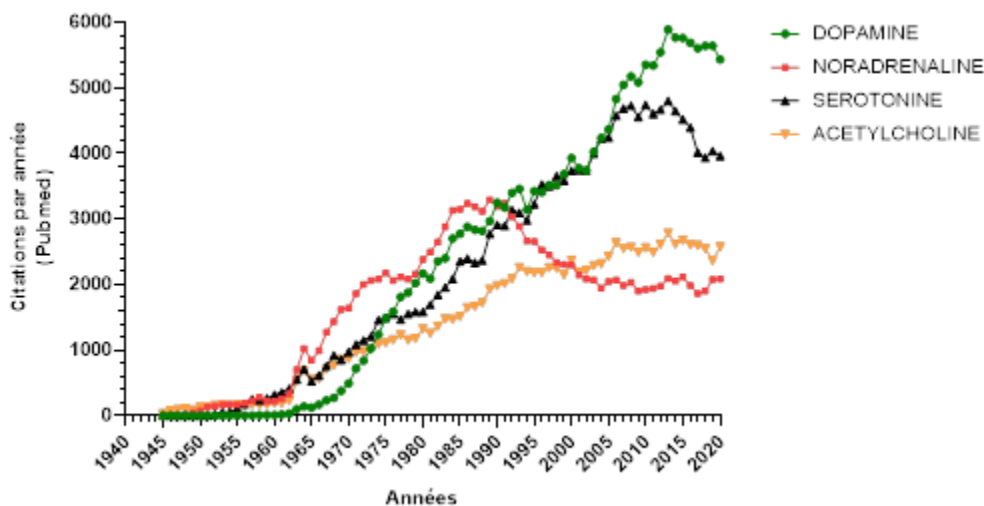
Dans les années 1950, des observations de la présence de DA dans des tissus périphériques (glande surrénale, cœur, nerfs adrénrgiques...) poussent Blaschko à émettre pour la première fois l'idée que la DA pourrait avoir son propre rôle physiologique. Une idée supportée par le fait que la DA chez le lapin et le cobaye avait la propriété d'abaisser la pression sanguine ; un effet pouvant être potentialisé par l'inhibition des monoamines-oxydases (MAO), impliquées dans le catabolisme des monoamines dont fait partie la DA (*Blaschko, 1957*). La même année, Kathleen Montagu démontre pour la première fois la présence de DA dans le cerveau humain (*Montagu, 1957*). Cette découverte sera suivie peu après par la démonstration par Arvid Carlsson (lauréat du prix Nobel de médecine et physiologie de 2000), en collaboration avec Lindqvist, Magnusson et Waldeck, que la DA joue le rôle de neurotransmetteur dans le cerveau. Carlsson et ses collègues se sont d'abord intéressés aux effets sédatifs de la réserpine, dont l'injection chez des lapins conduit à un état akinétique et également à une déplétion des niveaux de DA dans le cerveau. De manière intéressante, cet effet pouvait être renversé par l'injection intraveineuse du précurseur dans la voie de synthèse de la DA (et noradrénaline) : la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA). L'injection de DOPA a conduit à une restauration des niveaux de DA sans affecter les niveaux de noradrénaline, ce qui a suggéré que l'état akinétique des animaux tirait son origine de la déplétion initiale en DA (*Carlsson et al., 1957*). Par ailleurs, en mettant au point une nouvelle méthode de dosage très sensible, Carlsson et ses collaborateurs démontrèrent également que la DA est distribuée dans le cerveau d'une manière distincte de celle de la noradrénaline, et est particulièrement concentrée dans les ganglions de la base (*Carlsson et al., 1958*). Ces découvertes amenèrent logiquement Carlsson à penser que la DA devait donc posséder des fonctions lui étant propres, et n'est pas simplement un précurseur métabolique de la noradrénaline (*Carlsson, 1959*).

Ces observations ont été à l'origine d'une série de découvertes historiques dans l'histoire des neurosciences, mais également en clinique, comme dans le cas notable de la maladie de Parkinson. Sur la base des travaux montrant que la majeure partie de la DA dans le cerveau se trouvait dans le striatum (*Bertler and Rosengren, 1959; Sano et al., 1959*), Oleh Hornykiewicz et Herbert Ehringer montrèrent que la distribution de la DA dans le cerveau humain post-mortem est drastiquement réduite chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (*Ehringer et Hornykiewicz, 1960*). Ces résultats ont mené aux premiers essais de L-DOPA chez des patients atteints de la maladie par Walther Birkmayer et Oleh Hornykiewicz à Vienne (*Birkmayer et Hornykiewicz, 1961*), par André Barbeau, Ted Sourkes et Gerald Murphy à Montréal (*Barbeau A, Sourkes TL, Murphy, 1962*) et

finalement par George Cotzias, à New York, avec le premier traitement oral à haute dose de L-DOPA, encore utilisé en clinique aujourd'hui (Cotzias *et al.*, 1967).

Depuis ces travaux pionniers en la matière, la DA a été au cœur de nombreuses recherches ces dernières années, passant du statut de substance chimique presque anecdotique à celui de neurotransmetteur majeur dans le cerveau. En atteste la bibliométrie montrant depuis les années 60 une explosion du nombre de publications traitant de la DA (**figure 1**). En 2020, on retrouve environ 180 000 entrées relatives à la DA sur la base de données Pubmed, avec une fréquence moyenne de plus de 5000 articles scientifiques par an, témoignant de l'intérêt porté à cette molécule.

Figure 1. – Nombre de publications par années, de 1945 à 2020, portant sur la dopamine et autres neurotransmetteurs.



Les critères de recherche sur la banque de données Pubmed étaient {dopamine OR hydroxytyramine}, {noradrenalin OR noradrenaline OR norepinephrin OR norepinephrine}, {serotonin OR 5-HT OR 5-hydroxytryptamine} et {acetylcholine OR ACh}. Source : pubmed, et adapté de Björklund et Dunnett, 2007a.

La DA en tant que neurotransmetteur sécrété par les neurones dopaminergiques du système nerveux central (SNC), joue un rôle majeur dans de nombreuses fonctions telles que la motricité, la cognition, la motivation, les émotions, les comportements d'appétence normaux et anormaux voués à la survie de l'organisme et de l'espèce, la nausée, la lactation et la douleur (Wood, 2008; Klein *et al.*, 2019). En dehors du SNC, elle joue aussi un rôle dans la motilité intestinale, la fonction rénale, pancréatique, cardio-vasculaire et immunitaire (Basu et Dasgupta, 2000; Missale *et al.*, 1998). De par ces nombreuses fonctions, le système dopaminergique a été montré comme étant

impliqué dans de nombreux troubles neurologiques et psychiatriques tels que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la schizophrénie, le trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH) et les troubles d'utilisation de substances (*substance use disorder, SUD*). Comprendre les mécanismes physiologiques de la neurotransmission dopaminergique apparaît ainsi critique dans notre compréhension mécanistique de ces maladies.

1.1.2. Anatomie du système dopaminergique

1.1.2.1. Nomenclature

Avant l'avènement des techniques d'immunohistochimie au début des années 80, la localisation précise des neurones dopaminergiques était une tâche ardue. Kathleen Montagu a été la première chercheuse à avoir identifié chimiquement la DA dans le cerveau de nombreuses espèces, incluant l'Homme, en se servant de la technique de chromatographie sur papier (*Montagu, 1957*).

La localisation des neurones dopaminergiques n'a pu cependant être réalisée que quelques années plus tard au moyen d'une nouvelle méthode d'histofluorescence développée par Falck et Hillarp, reposant sur l'utilisation de vapeur de formaldéhyde (*Falck et al., 1962*). Le formaldéhyde, en convertissant les catécholamines en molécules d'isoquinoline fluorescente a ainsi permis à Carlsson, Falck et Hillarp, d'aboutir à la première visualisation, *in situ*, des neurones dopaminergiques et noradrénergiques dans le cerveau (*Carlsson et al., 1962*). Deux ans plus tard, Dahlström et Fuxe, en utilisant la technique de Falck-Hillarp, furent les premiers à établir la description anatomique détaillée des neurones catécholaminergiques dans le cerveau de rat (*Dahlstroem et Fuxe, 1964a, b*). Ils ont ainsi défini une nomenclature regroupant ces neurones en 12 groupes de cellules distribuées de la medulla oblongata jusqu'à l'hypothalamus et désignés par les lettres et chiffres de A1 à A12.

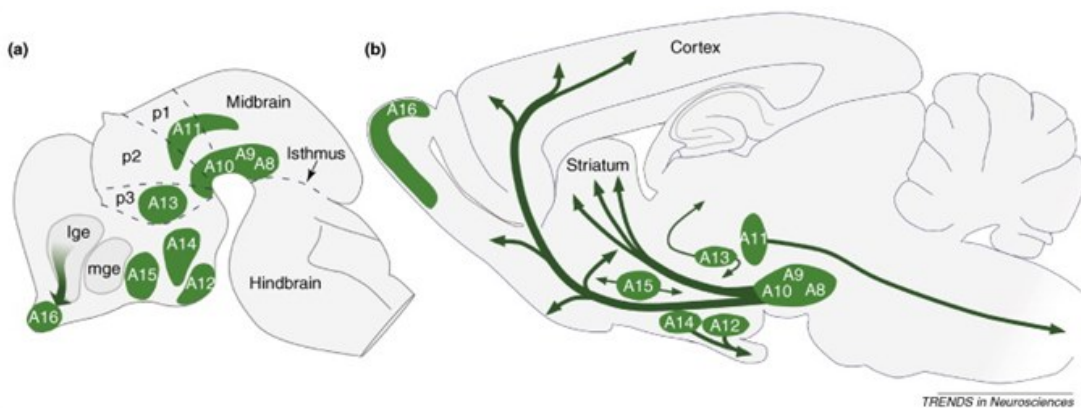
Les observations initiales de Dahlström et Fuxe furent par la suite confirmées et affinées par l'utilisation des techniques modernes d'immunohistochimie en employant des anticorps dirigés contre les enzymes de synthèse des catécholamines (notamment la tyrosine hydroxylase, décarboxylase des acides aminés aromatiques et dopamine- β -hydroxylase). L'utilisation de ces différents marqueurs a ainsi permis d'aboutir à une meilleure cartographie des systèmes catécholaminergiques et une meilleure distinction entre eux (*Hökfelt et al., 1976, 1977; Hokfelt et*

al., 1984). Aux 12 premiers noyaux, se sont ainsi ajoutés 5 autres (A13-A17) localisés dans le diencéphale, le bulbe olfactif et la rétine, et 3 noyaux adrénérgiques (C1-C3). Cette nomenclature est à l'heure actuelle toujours utilisée, car elle permet de bien rendre compte de l'hétérogénéité des structures catécholaminérgiques. Par ailleurs, la distribution des corps cellulaires au sein de chaque groupe peut varier considérablement entre différentes espèces. La nomenclature est ainsi pratique pour distinguer les différents noyaux et comparer les données provenant de différentes espèces.

1.1.2.2. Les noyaux dopaminérgiques

Selon la nomenclature de Dahlström et Fuxe, les corps cellulaires des neurones dopaminérgiques se retrouvent dans neuf noyaux différents (A8 à A16), retrouvés dans le mésencéphale, l'hypothalamus et le bulbe olfactif (**figure 2**). Malgré la diversité de localisation des neurones dopaminérgiques, la grande majorité se trouve située dans le mésencéphale ventral, composés des noyaux A8, A9 et A10 qui forment respectivement l'aire rétro-rubrale (RRF), la *substantia nigra* ou substance noire (SN) et l'aire tegmentaire ventrale (VTA).

Figure 2. – Distribution des différents groupes de neurones DA dans le cerveau de rongeur durant le développement (a) et chez l'adulte (b).



Les noyaux sont indiqués selon la nomenclature de Dahlström et Fuxe de 1964. Les principales projections DA sont indiquées par les flèches. Lge : lateral ganglionic eminence (éminence ganglionnaire latérale) ; mge : medial ganglionic eminence (éminence ganglionnaire médiale) ; p1-p3 : prosomères 1-3. Source : Björklund et Dunnett, 2007b.

L'aire rétro-rubrale ou RRF (groupe A8) est située, comme son nom l'indique, en arrière du noyau rouge, dans la formation réticulée du mésencéphale. Il ne doit pas être confondu avec le

« noyau rétro-rubral », qui est un groupe de cellules non dopaminergiques dans le rhombencéphale rostral (Fu et al., 2012). Le petit groupe de neurones dopaminergique du groupe A8 présente une cytoarchitecture ne permettant aucune subdivision, contrairement aux groupes A9 et A10 (Cavalcanti et al., 2014; German et Manaye, 1993).

La substance noire ou SN (comprenant le groupe dopaminergique A9) tient son nom du fait de sa couleur noire dans le cerveau humain adulte (du latin *nigra*, noire) en raison de l'accumulation de neuromélanine, un pigment biologique sous-produit par la synthèse de DA. Elle contient principalement des neurones qui synthétisent et libèrent la DA et des neurones de projections GABAergiques et glutamatergiques (Tepper et Lee, 2007; Yamaguchi et al., 2013). Ces populations de neurones sont ségréguées en deux sous-régions : la *substance noire pars compacta* (SNc) où l'on retrouve la majorité des corps cellulaires de neurones dopaminergiques (elle-même divisée en tiers ventral SNcV, dorsal SNcD et latéral SNcL et un regroupement médian SNcM), et la *substance noire pars reticulata* (SNr), principalement composée de neurones GABAergiques ainsi que par les dendrites des neurones dopaminergiques provenant de la SNc.

L'aire tegmentaire ventrale ou VTA (comprenant le groupe dopaminergique A10) se divise elle aussi de manière plus complexe en plusieurs sous-structures basées sur la distribution et la densité des types cellulaires s'y trouvant, avec des différences selon les espèces (McRitchie et al., 1998; Ikemoto, 2007). Chez le rongeur, différentes nomenclatures existent pour qualifier ces régions (Ferreira et al., 2008; Ikemoto, 2007). On retrouve de manière générale un premier groupe sur la ligne médiane comprenant le noyau interfasciculaire (*Interfascicular nucleus, IF*), le noyau rostral linéaire (*Rostral Linear nucleus, RLi*) et le noyau caudal linéaire (*Caudal Linear nucleus of the raphe, CLi*) ; un groupe médian comprenant le noyau paranigral (*PN*) et parainterfasciculaire (*PIF*) recouvrant la fosse interpédonculaire ; et un groupe latéral, en forme d'aile, comprenant la partie rostrale de l'aire tegmentaire ventrale (*ventral tegmental area rostral part, VTAR*) et le noyau pigmentée parabrachial (*PBP*), situées sur la partie médiodorsale de la SN. Comme pour la SN, la VTA est également composée de neurones GABAergiques, glutamatergiques et peptidergiques (Yamaguchi et al., 2011; Gorelova et al., 2012; Taylor et al., 2014; Collins et al., 2019).

La SN (*reticulata* et dans une moindre mesure *compacta*) et la VTA peuvent recevoir également une innervation sérotoninergique relativement dense en provenance du raphé dorsal et médian (Hervé et al., 1987; Lavoie et Parent, 1990; Corvaja et al., 1993; Van Bockstaele et al., 1994;

Moukhles et al., 1997), et également noradrénergique en provenance du locus cœruleus (groupe A6), en particulier la VTA (*Jones and Moore, 1977; Collingridge et al., 1979; Mejías-Aponte et al., 2009*). Il convient également de noter la présence d'une petite populations de neurones DA dans le raphé dorsal (*Descarries et al., 1986; Dougalis et al., 2012*) jouant un rôle dans les comportements d'appétence (*Cho et al., 2017; Groessl et al., 2018; Lin et al., 2020; Cho et al., 2021*).

L'ensemble des subdivisions des différents groupes dopaminergiques sont clairement montrées sur la **figure 3** issue de *Fu et col. (2012)* du groupe de George Paxinos et Charles Watson, dont les atlas histologiques et stéréologiques sont devenus des outils incontournables dans les neurosciences.

Figure 3. – Coupes coronales montrant la distribution anatomique et la cytoarchitecture des groupes de neurones A8, A9 et A10 selon l'axe rostro-caudal.

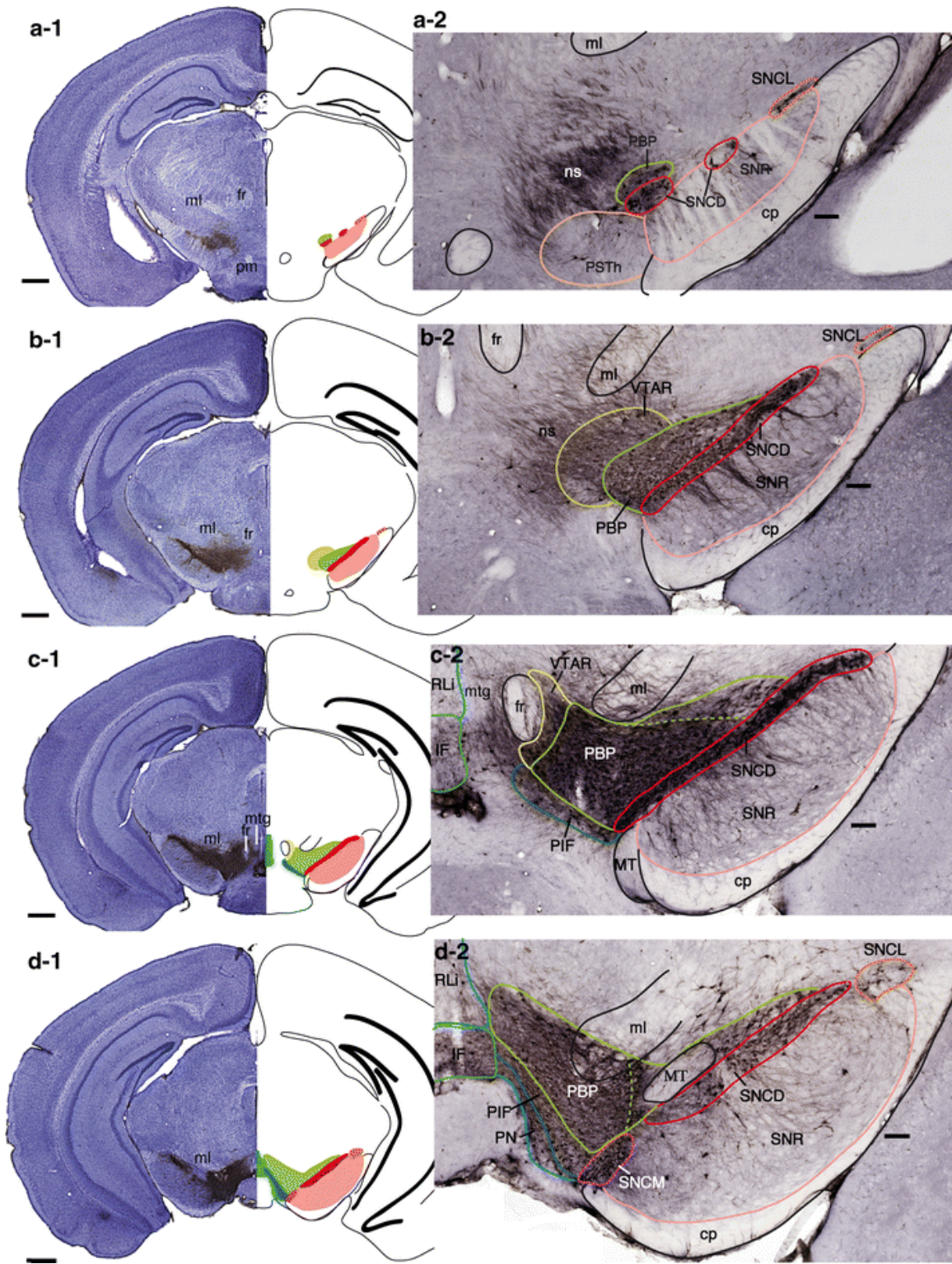


Figure 3. – (2/3)

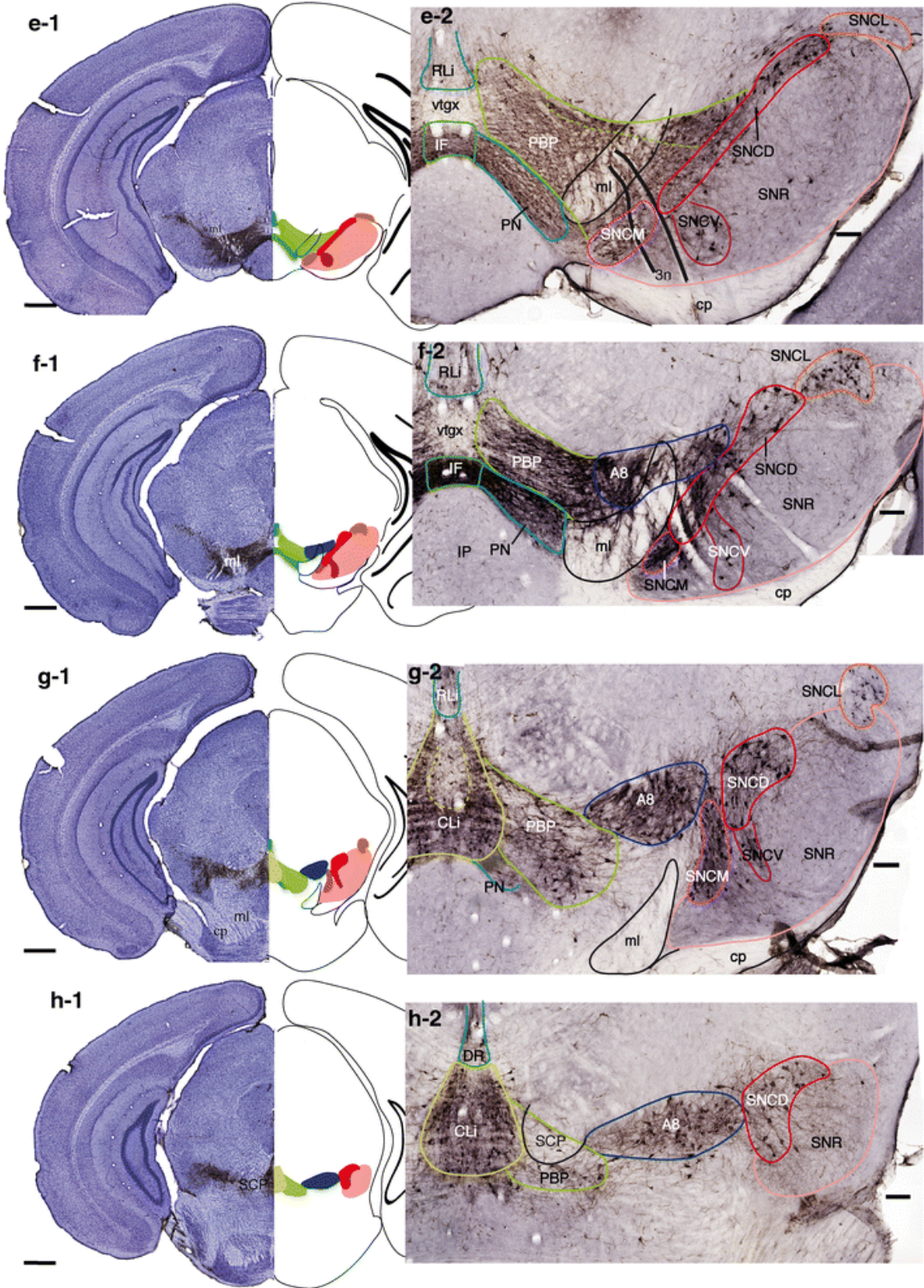
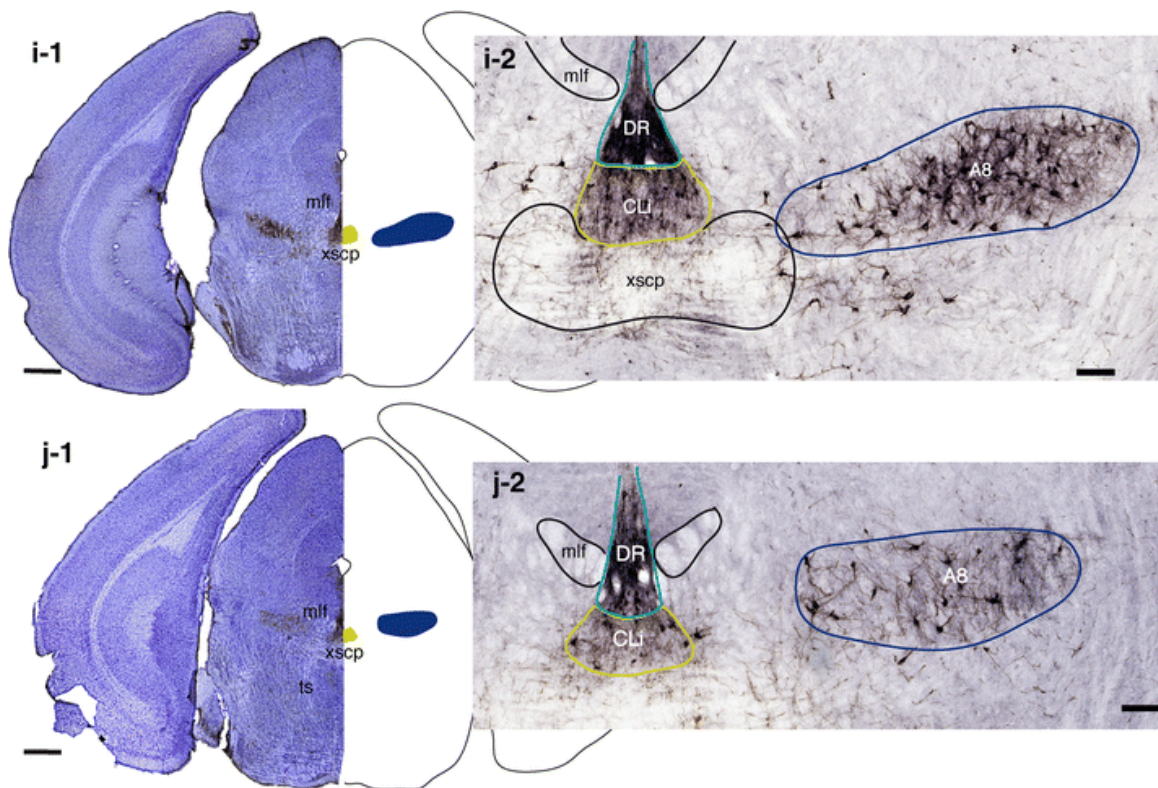


Figure 3. – (3/3)



Le panneau de gauche montre les différentes coupes de cerveau issues d'une même souris C57BL/6J en coloration de Nissl (moitié gauche) et en représentation schématique (moitié droite), ce qui donne un aperçu général de la distribution et de l'apparence des amas de neurones dopaminergiques (barre d'échelle : 500 μm). Le panneau de droite montre les détails cytoarchitecturaux de chaque région (barre d'échelle : 100 μm). La distance entre deux tranches consécutives est de 80 μm et couvre la région cérébrale allant de -2.52 mm à -4.18 mm par rapport à bregma. Source : Fu et al., 2012 (Paxinos et Watson)





Les frontières n'étant pas clairement délimitées entre les groupes de neurones dopaminergiques, on les réfère également sous l'appellation collective de « complexe dopaminergique mésencéphalique ventral », comme suggéré par Yetnikoff et al. (2014).

Le nombre de neurones dopaminergiques et la complexité de leur arborisation axonale sont variables selon les espèces. À titre d'exemple, on peut compter bilatéralement approximativement entre 10 000 et 25 000 neurones dopaminergiques chez la souris et entre 40 000 et 50 000 chez le rat (German et Manaye, 1993). Ce nombre est augmenté chez les espèces au système nerveux plus

avancé comme le singe, avec entre 160 000 et 320 000 neurones, ou l'humain, avec entre 400 000 et 700 000 neurones (*Björklund et Dunnett, 2007b*).

La **figure 4** présente également selon les espèces les valeurs estimées du nombre de neurones dopaminergiques par région, en ne comptant que les deux plus importantes, à savoir la SNc et la VTA. Il est à noter que les variations entre les études du nombre de neurones TH-positifs pour une espèce spécifique peuvent être dues, au moins en partie, à des différences interindividuelles entre les sujets des études, mais également aux techniques et méthodes statistiques employées pour calculer le nombre total de neurones dopaminergiques dans la SNc et VTA. Les chiffres avancés ici ne constituent donc que des valeurs moyennes pour chaque espèce. Par ailleurs, le fond génétique des animaux est connu comme pouvant affecter le nombre de neurones dopaminergiques de la SNc, qui peut différer jusqu'à 33% entre les différentes lignées consanguines de souris (*Baker et al., 1980; Muthane et al., 1994*). Ce fait est d'ailleurs souvent négligé lors de l'analyse des modèles murins de Parkinson. On remarque également selon les espèces une variation du ratio de neurones entre SNc et VTA. Chez le rongeur, ce ratio se rapproche de 50:50 alors que chez l'homme plus de 70% des neurones dopaminergiques se retrouvent dans la SNc. Cette différence pourrait être due au fait que chez les espèces au système nerveux plus évolué, la SNc couvre un territoire d'innervation largement plus grand, en particulier au niveau du néocortex (*Bentivoglio et Morelli, 2005; Björklund et Dunnett, 2007b; Lewis et al., 1998*).

Figure 4. – Nombres estimés de neurones dopaminergiques chez l’Homme, le singe, le rat et la souris dans la substance noire pars compacta (SNc) et l’aire tegmentaire ventral (VTA) bilatéralement

SNpc DA neurons	SPECIES	VTA DA neurons	Références
200,000 - 420,000	 Human	60,000 - 65,000	(Chu et al., 2002; Damier et al., 1999a; Hirsch et al., 1988; McRitchie et al., 1997)
120,000 - 270,000	 Monkey	110,000	(Collier et al., 2007; Emborg et al., 1998; Kanaan et al., 2007; McCormack et al., 2004)
21,000 - 25,000	 Rat	20,000 - 40,000	(German et Manaye, 1993; Nair-Roberts et al., 2008)
8,000 - 12,000	 Mouse	8,000 - 12,000	(German et al., 1983; German et Manaye, 1993; Jackson-Lewis et Przedborski, 2007)

Source : Brichta et Greengard, 2014

1.1.2.3. Les voies de projections dopaminergiques

Malgré leur faible nombre dans le cerveau, les neurones dopaminergiques sont à l’origine d’une innervation massive, notamment au niveau du striatum et de structures corticales et sous-corticales (Gauthier et al., 1999; Prensa et al., 2009). À titre d’exemple, chez le rat, un unique neurone dopaminergique peut donner naissance à un demi-mètre d’axone tellement ramifié qu’il peut occuper jusqu’à 3% du volume striatal total (Matsuda et al., 2009). Il est estimé qu’un seul neurone dopaminergique de la SNc possède plus de 300 000 terminaisons axonales (Arbuthnott et Wickens, 2007; Bolam et Pissadaki, 2012).

Il existe trois grandes voies de projections des neurones dopaminergiques : la voie nigrostriée (ou mésostriée), la voie mésolimbique et la voie mésocorticale (**figure 5**). Il existe des voies secondaires comme la voie tubéro-infundibulaire et les projections hypothalamo-spinales.

1.1.2.3.1. La voie nigrostriée

La voie nigrostriée est formée majoritairement par les projections des neurones dopaminergiques de la SNc (A9) formant le faisceau télencéphalique médian (*Medial Forebrain Bundle, MFB*) ascendant en direction de la portion dorsale du striatum (noyau caudé-putamen, formant le néostriatum). Là, elles innervent majoritairement des neurones GABAergiques, appelés *medium spiny neurons* (MSN), qui représentent environ 95% des neurones du striatum (*David Smith et Paul Bolam, 1990; Kemp Janet M. et al., 1971*), ainsi qu'une minorité d'interneurones cholinergiques (*Bolam et al., 1984; Kawaguchi et al., 1995*). La voie nigrostriée est impliquée dans le contrôle du mouvement volontaire en tant que système modulateur des aires corticales motrices. La perte de ces projections est d'ailleurs associée aux symptômes moteurs principaux de rigidité musculaire et de tremblements caractéristiques de la maladie de Parkinson.

1.1.2.3.2. La voie mésolimbique et mésocorticale

De par leur provenance commune (noyau A8 et A10), les voies mésolimbique et mésocorticale sont souvent associées et se retrouvent sous l'appellation de « voie mésocorticolimbique ».

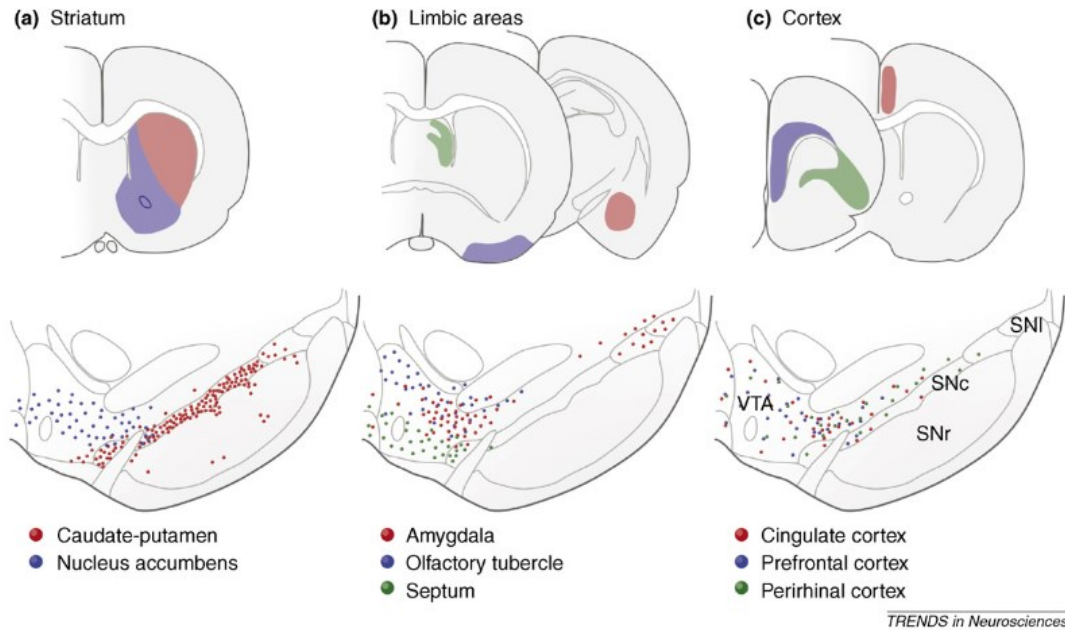
La voie mésolimbique est formée par les projections des neurones dopaminergiques de la VTA et de la RRF qui innervent, via le MFB, la portion ventrale du striatum, appelée noyau accumbens (*Nucleus Accumbens, Nac*) et des structures faisant partie du système limbique, comprenant la *stria terminalis*, le tubercule olfactif, le septum, l'amygdale, l'habenula et l'hippocampe.

La voie mésocorticale est formée par les projections des neurones dopaminergiques de la VTA et RRF qui innervent, via le MFB, le cortex préfrontal, le gyrus cingulaire antérieur et l'aire entorhinale.

Ces voies jouent un rôle dans le système de la récompense, de renforcements positifs, la mémoire, la motivation, l'attention, la prise de décision et dans les troubles d'utilisation de substances. Une altération de la transmission mésocorticolimbique est notamment associée à la schizophrénie, à la dépendance aux drogues, à la dépression, ainsi qu'à certains troubles de la

cognition comme l'attention ou les fonctions exécutives (Meyer-Lindenberg et al., 2002; Robinson et Berridge, 1993; Swerdlow et Koob, 1987).

Figure 5. – Localisation des neurones dopaminergiques et leurs lieux de projections



Localisation des neurones dopaminergiques de la SNc (rouge), VTA (bleu) et RRF (vert) au niveau du mésencéphale ventral (partie du bas), ainsi que leurs lieux de projections (partie du haut), chez le rat. (a) Voie nigrostriée, (b) voie mésolimbique et (c) voie mésocorticale. Source : (Björklund et Dunnett, 2007b)

1.1.2.3.3. Autres voies dopaminergiques

D'autres systèmes dopaminergiques existent. La voie tubéro-infundibulaire part des neurones dopaminergiques du noyau arqué (ou infundibulaire) de l'hypothalamus (noyau A12 et A14, voir **figure 2**), qui émettent des projections en direction de la glande pituitaire antérieure (ou hypophyse). La DA libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire permet de jouer un rôle de modulateur dans la sécrétion de certaines hormones, inhibant notamment la production de la prolactine, ayant notamment un rôle dans la croissance des glandes mammaires et la production de lait chez la femme (Fitzgerald et Dinan, 2008). Les projections hypothalamo-spinales partant en direction de la moelle épinière prennent naissance des noyaux A11 et A13 localisés dans l'hypothalamus (voir **figure 2**) (Cechetto et Saper, 1988; Skagerberg et Lindvall, 1985). Elles sont impliquées dans la régulation des neurones préganglionnaires sympathiques ainsi que dans la fonction locomotrice.

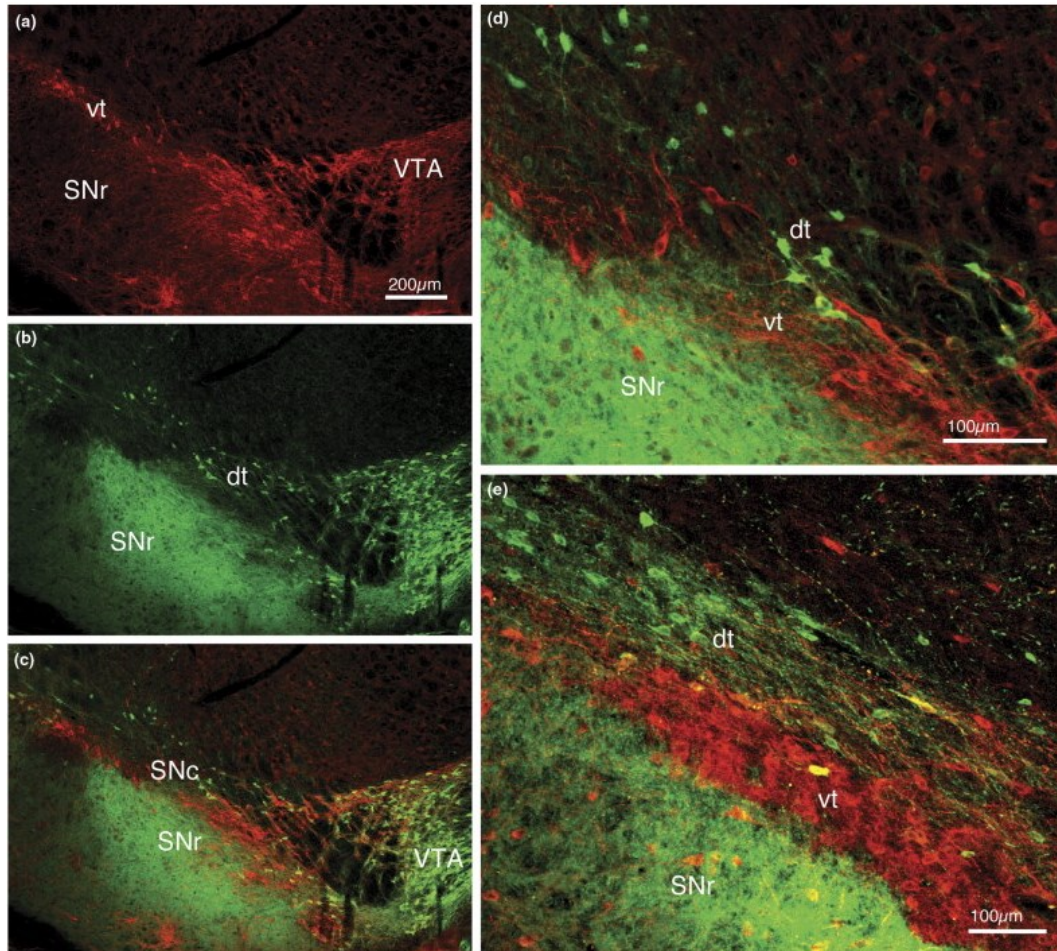
1.1.3. Hétérogénéité des neurones dopaminergiques

La classification des neurones dopaminergiques du mésencéphale sur la base de leur cytoarchitecture ou bien de leurs projections s'avère en réalité bien plus complexe. Pendant de nombreuses années, cette population de neurones a été considérée comme étant homogène. Il existe un nombre croissant de données démontrant au contraire une grande hétérogénéité, tant anatomique, moléculaire et fonctionnelle, au sein même des groupes de neurones dopaminergiques.

1.1.3.1. Hétérogénéité anatomique

Une première distinction peut être faite sur la base de la localisation et des lieux de projections des neurones dopaminergiques du complexe mésencéphalique ventral : le tiers dorsal et le tiers ventral (*Björklund et Dunnett, 2007b; Fu et al., 2012 ; et voir figure 6*). Le tiers dorsal inclut des cellules des parties dorsales de la VTA, de la SNc et de la RRF, majoritairement de forme ronde ou fusiforme et caractérisées biochimiquement par une faible expression du transporteur de la dopamine (DAT) et une expression positive de la calbindine (Calb), une protéine liant le calcium et impliquée dans la signalisation calcique. Le tiers ventral inclut, quant à lui, les neurones des parties ventrales de la VTA et de la SNc qui forment un feuillet dense de cellules allongées et angulaires reposant sur la SNr. Elles sont caractérisées par des niveaux plus élevés de DAT, par une faible expression de la calbindine et sont également majoritairement positives pour le canal potassique à rectification entrante activé par les protéines G GIRK2 (*G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2*). Les neurones des tiers ventral et dorsal diffèrent également par leurs voies de projections. Les neurones du tiers ventral projettent presque exclusivement en direction du striatum dorsal où ils innervent les striosomes. Certains neurones de cette région possèdent également des dendrites projetant en direction de la SNr. Les neurones du tiers dorsal innervent quant à eux le striatum ventral, les aires corticales et limbiques, ainsi que les compartiments matriciels du striatum dorsal (*Bentivoglio et Morelli, 2005; Gerfen et al., 1987; Lynd-Balta et Haber, 1994; Prensa et Parent, 2001*). Ces sous-populations définies anatomiquement et biochimiquement peuvent aussi être distinguées par leur vulnérabilité dans la maladie de Parkinson. En particulier les neurones du tiers ventral de la SNc qui sont négatifs pour la calbindine sont les plus vulnérables à la mort cellulaire dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson, tandis que les neurones positifs pour la calbindine de l'étage dorsal sont généralement plus résilients (*Damier et al., 1999b; Yamada et al., 1990*).

Figure 6. – Images d'IHC de cerveau de rat adulte montrant les neurones dopaminergiques de la SNc et VTA du tiers ventral (vt) et dorsal (dt) du complexe mésencéphalique ventral.



La distinction des tiers ventral et dorsal peut se faire sur la base de l'expression par les neurones dopaminergiques du canal ionique GIRK2 (rouge) et de la calbindine (vert). Source : Björklund et Dunnett, 2007b

1.1.3.2. Hétérogénéité neurochimique

Des études ont également montré une hétérogénéité supplémentaire au regard des neurotransmetteurs libérés, de prime abord concernant la DA. Divers travaux ont montré que les niveaux d'expression de la tyrosine hydroxylase (TH) dans les neurones dopaminergiques peuvent changer au cours du temps (notamment diminuer avec l'âge) et varier en fonction de la demande et de l'état physiopathologique (*Emborg et al., 1998; Lynd-Balta et Haber, 1994; McCormack et al., 2004; Prensa et Parent, 2001; Thompson et al., 2005*). D'un point de vue pratique, cela signifie que la mesure de cette enzyme de synthèse à des niveaux détectables en immunohistochimie pour identifier les neurones dopaminergiques n'est pas toujours fiable, même si elle demeure le marqueur le plus sensible et le plus constant encore actuellement à disposition.

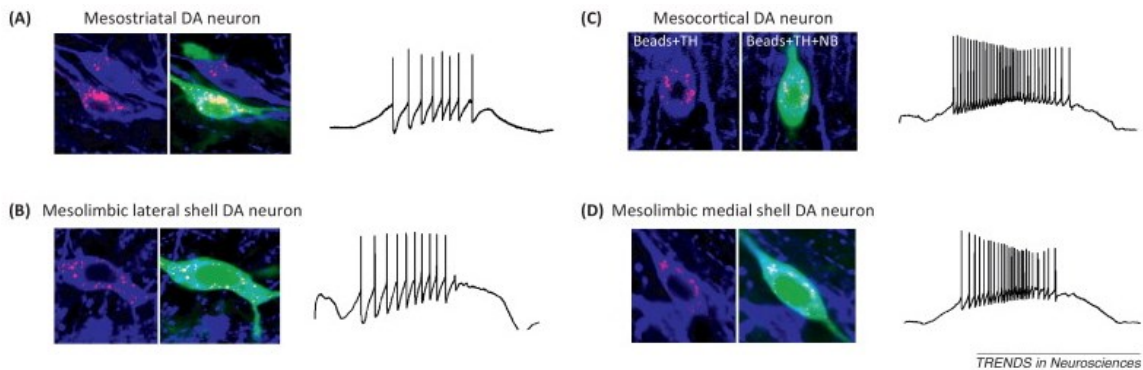
Des sous-populations de neurones dopaminergiques peuvent également être distinguées sur la base de la co-libération d'autres neurotransmetteurs comme le glutamate et/ou le GABA (*El Mestikawy et al., 2011; Trudeau et al., 2014; Tritsch et al., 2016*). En ce qui concerne la capacité à libérer le glutamate, environ 5 à 20% des neurones dopaminergiques de la VTA peuvent exprimer le transporteur vésiculaire du glutamate VGlut2 (*Mendez et al., 2011*). Dans la SNc, seulement une petite fraction de la portion latérale l'exprime (*Yamaguchi et al., 2007, 2011, 2015*). Ces résultats concordent avec les études d'optogénétique montrant que les courants synaptiques glutamatergiques induits par la stimulation des axones dopaminergiques peuvent être facilement détectés dans le striatum ventral, mais rarement dans le dorsal (*Stuber et al., 2010; Tecuapetla et al., 2010*). En ce qui concerne la capacité à libérer le GABA, des courants synaptiques GABAergiques induits par la stimulation des axones dopaminergiques ont pu être détectés dans le striatum dorsal indiquant un phénomène de co-libération par les neurones dopaminergiques de la SNc (*Tritsch et al., 2012*). Cependant, à part une petite fraction de neurones dopaminergiques, ces neurones n'expriment ni les enzymes de synthèse du GABA, ni son transporteur vésiculaire (vGAT) (*Tritsch et al., 2016, 2012*). L'étude du groupe de Tritsch a également montré que le VMAT2 est nécessaire pour la transmission GABAergique des neurones dopaminergiques, ce qui soulève la possibilité que la DA et le GABA ne soient pas seulement co-libérés, mais aussi co-empaquetés dans les vésicules dopaminergiques des neurones de la SNc. Par ailleurs cette conclusion est corroborée par la découverte en 2015 d'une nouvelle voie de synthèse du GABA médié par l'aldéhyde déshydrogénase 1a1 (ALDH1a1) (*Kim et al., 2015*). Cette enzyme est

hautement exprimée dans les neurones dopaminergiques de la SNc et est nécessaire à la co-libération DA-GABA.

1.1.3.3. Hétérogénéité fonctionnelle

En plus de la diversité des neurones dopaminergiques du complexe mésencéphalique ventral en termes de morphologie, localisation et connectivité, les études d'électrophysiologie et d'optogénétique ont été très utiles pour démontrer l'existence d'une diversité fonctionnelle des neurones dopaminergiques au sein de ce complexe. Les travaux pionniers de Grace et Bunney dans les années 80 avec des enregistrements unitaires de neurones dopaminergiques du mésencéphale ont permis de dégager un ensemble de caractéristiques propres à cette population neuronale, à savoir une activité de décharge spontanée de type pacemaker autonome (c'est-à-dire non dépendante d'afférences excitatrices), avec deux modes différents : l'un avec des potentiels d'action unitaire à basse fréquence (1-5 Hz) et l'autre avec des décharges en bouffées (*bursting*) à haute fréquence (>15 Hz) ; ainsi qu'un mécanisme d'auto-inhibition assuré par la stimulation des autorécepteurs de type D2 (Grace et Bunney, 1984a, 1984b). À partir de là, les chercheurs se sont attachés à explorer la diversité fonctionnelle des neurones dopaminergiques, principalement dans la VTA (Lammel et al., 2008, 2011, 2012; Stamatakis et al., 2013). Ceux situés dans la partie dorso-latérale de la VTA projettent jusqu'à la coquille latérale du noyau accumbens (*Nac shell*) et présentent des propriétés électrophysiologiques conventionnelles comme celles observées dans les neurones de la SNc. Par contre, les neurones de la VTA ventro-médiale qui projettent vers le cortex préfrontal médial, l'amygdale baso-latérale ou le cœur et la coquille médiale du noyau accumbens (*Nac core* et *shell* médial) présentent des modes de décharges plus élevés et persistants (>20 Hz), avec des potentiels d'action présentant de faibles composantes d'hyperpolarisation, en comparaison avec les neurones de la SNc. Les courants cationiques entrants activé par hyperpolarisation (I_h) peuvent également être responsable de l'activité de décharges en bouffées des neurones DA et leur magnitude varie grandement selon les neurones dopaminergiques de la SNc et de la VTA (Mercuri et al., 1995; Seutin et al., 2001; Neuhoff et al., 2002; Lammel et al., 2008; Dufour et al., 2014; Krashia et al., 2017). Certaines de ces différentes électrophysiologiques sont résumées dans la **figure 7**.

Figure 7. – Les modes de décharge lents et rapides des neurones dopaminergiques sont déterminés selon leurs zones de projection axonale.



Des exemples représentatifs de décharges évoquées *in vitro* des neurones dopaminergiques sont représentés ici, associés avec leur lieu de projection identifié par traçage rétrograde *in vivo* (billes rouges). Le caractère dopaminergique des neurones enregistrés a été confirmé par remplissage à la neurobiotine (vert) suivi d'un marquage à la TH. L'activité électrique a été évoquée par l'injection de rampes de 2s de courant dépolarisant. Source : Roeper, 2013 et adapté de Lammel et al., 2008.

Par ailleurs, malgré l'apparente homogénéité des propriétés électrophysiologiques des neurones de la SNc, du moins chez le rongeur, des données semblent également indiquer une diversité fonctionnelle au sein de cette population (Lerner et al., 2015; Matsumoto et Hikosaka, 2009; Roeper, 2013). Cette caractérisation reste néanmoins encore incomplète bien que pourrait s'avérer pertinente compte tenu de la vulnérabilité sélective de cette population neuronale dans la maladie de Parkinson par exemple.

1.1.3.4. Hétérogénéité génétique

De nombreuses études ont par ailleurs montré une différence d'expression de gènes entre les populations neuronales de la SNc et de la VTA (Anderegg et al., 2015). Il faut toutefois noter que malgré des différences fonctionnelles des neurones dopaminergiques au sein du complexe mésencéphalique ventral, les signatures d'expression génique sont extrêmement similaires : 97-99% des gènes sont exprimés à la fois dans la SNc et la VTA (Chung et al., 2005; Greene et al., 2005; Grimm et al., 2004). Cependant une hétérogénéité existe donc sur les 1-3% des gènes restants et ils pourraient, par exemple, jouer un rôle essentiel dans la connectivité de ces neurones ainsi que

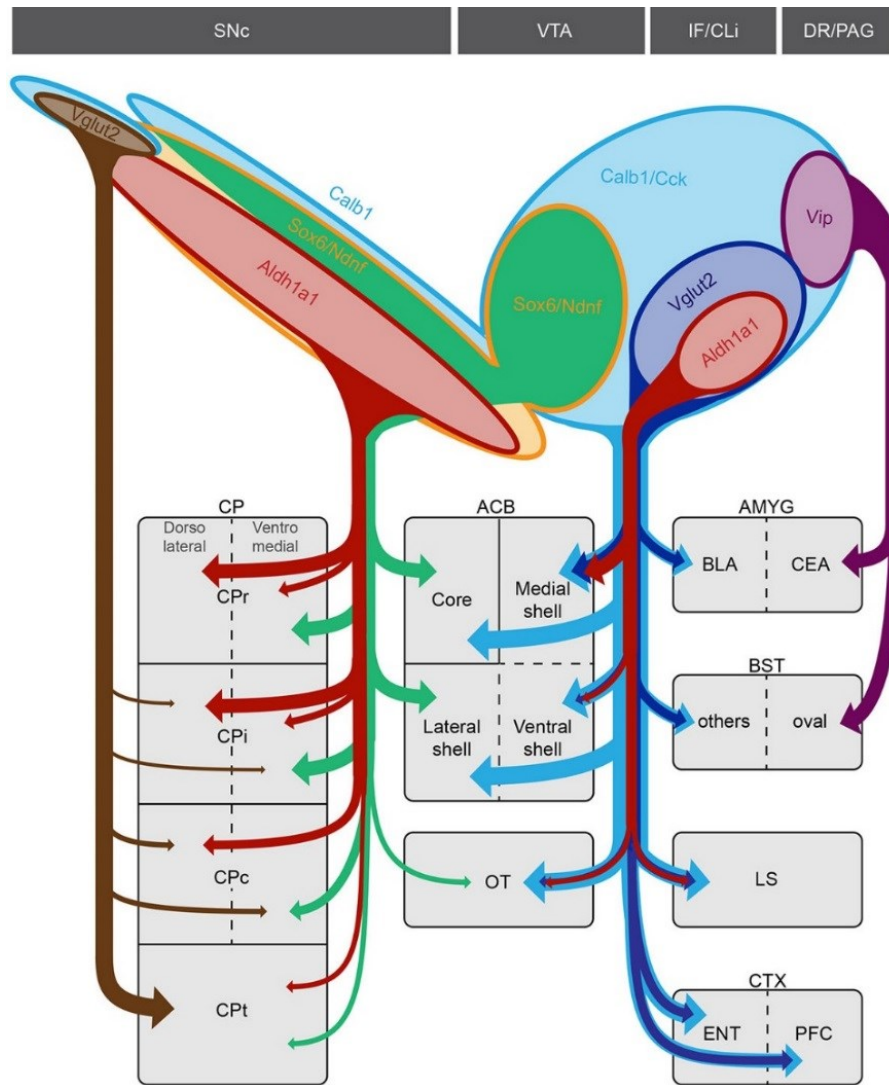
dans leur vulnérabilité dans la maladie de Parkinson. Ces études, en combinaison avec des évaluations immunohistochimiques, ont révélé que les gènes différemment exprimés entre la SNc et la VTA peuvent être regroupés en 4 groupes :

- Les gènes impliqués dans la neurotransmission dopaminergique : Slc6a3 (transporteur de la DA), DRD1, DRD2 (récepteurs DA de type D1 et D2) et ALDH1a1 ;
- Les gènes impliqués dans l'activité neuronale : KCNJ6 (GIRK2), KCNN3 (K_{Ca}2.3 ou SK3; *small conductance calcium-activated potassium channel 3*) et CALB1 (calbindine) ;
- Les gènes impliqués dans la survie neuronale : facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) et de la glie (GDNF, *Glial cell-derived neurotrophic factor*) ;
- Certains facteurs de transcription, notamment impliqués dans la différenciation en neurones dopaminergiques : PITX3, OTX2, SOX6.

Il convient cependant de souligner que ces différences d'expression rapportées ne se présentent jamais au sein des structures selon un mode « tout ou rien », mais sont le plus souvent décrits dans la littérature par la terminologie « forte », « faible », « enrichie » etc. Cela peut être problématique, car on ne peut pas savoir si on se réfère au sein d'une région donnée à une expression génique générale des neurones dopaminergiques ou bien spécifiquement à une sous-population de neurones au sein de cette population.

Ces lacunes pourraient cependant être comblées par l'utilisation de techniques modernes telles que l'analyse du transcriptome de neurone dopaminergique unitaire (*single-cell transcriptomic*) (Poulin et al., 2014; Anderegge et al., 2015; Poulin et al., 2016; Hook et al., 2018; Tiklová et al., 2019), ou bien des approches de génétique intersectionnelle, permettant une identification des voies de projections de neurones dopaminergiques moléculairement définies (Poulin et al., 2018 et **figure 8**).

Figure 8. – Voies de projections des sous-types de neurones dopaminergiques définies par génétique intersectionnelle.



Trois grands patrons de projections peuvent être identifiés. Le premier provient de neurones $Aldh1a1^+/Sox6^+/Ndnf^+$ qui correspondent aux neurones de la SNc projetant majoritairement vers le noyau-caudé rostral (CPr), intermédiaire (CPi) et caudal (CPc). Ces fibres sont par ailleurs denses dans la région dorso-latérale et dans les striosomes, correspondant aux aires locomotrices du striatum et qui est la plus vulnérable dans les modèles de Parkinson. Le 2^e patron provient des neurones $Calb1^+/Sox6^+/Aldh1a1^-$ de la SNc dorsal ainsi que le PBP et innervent le CPr médial et le CPi et CPc ventro-médial. Le 3^e patron provient des neurones $Vglut2^+/Calb1^+/Sox6^-$ de la SNc latérale qui envoie des projections vers la queue du noyau-caudé (CPt). Source : Poulin et al., 2018.

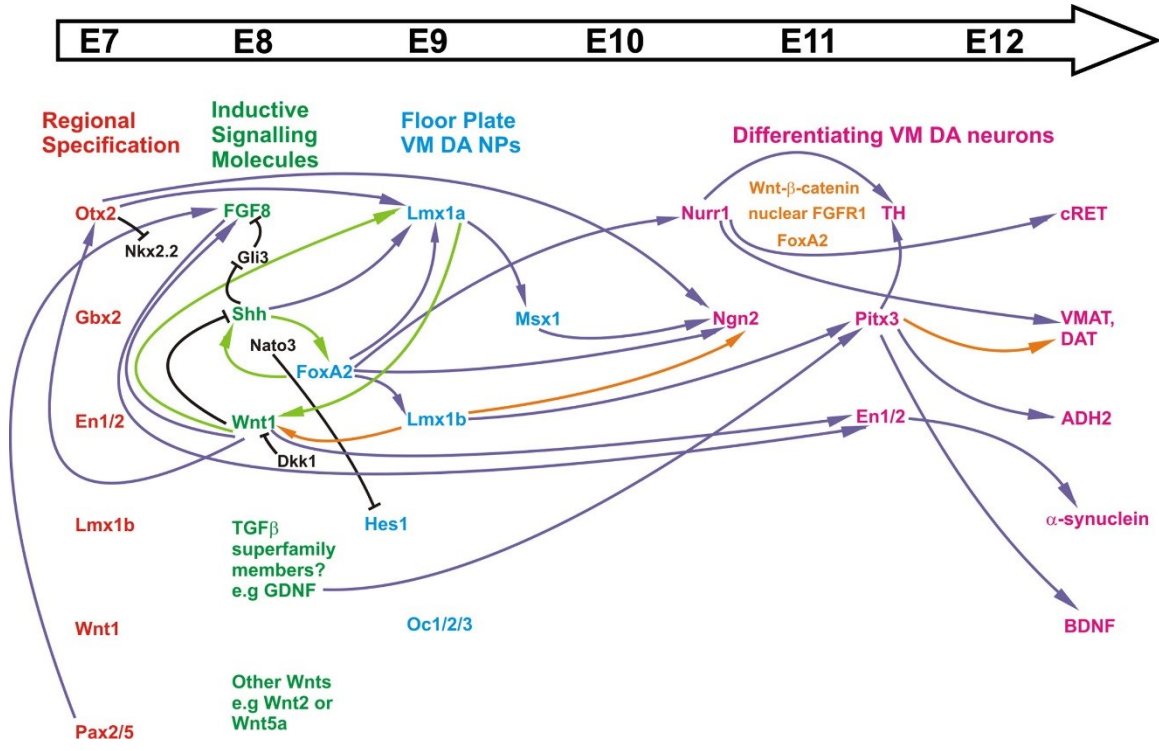
1.1.4. Ontogenèse du système dopaminergique

Le développement du système dopaminergique s'établit en plusieurs phases. Brièvement, après la mise en place du tube neural vers 7.5 jours, l'action combinée de facteurs de transcription et de morphogènes conduisent à la définition de l'identité régionale du mésencéphale ventral, la spécification et prolifération de progéniteurs dopaminergiques, la neurogenèse des neurones dopaminergiques mésencéphaliques, leur migration, leur différenciation et leur survie (*Arenas et al., 2015*). La complexité de tels processus peut être résumée dans la **figure 9** montrant les différents partenaires moléculaires impliqués (*Hegarty et al., 2013*).

Les facteurs *Otx2*, *Gbx2*, *En1/2* (*homeobox protein engrailed-1/2*), *Lmx1b* (*LIM homeobox transcription factor 1 beta*), *Wnt1* et *Pax2/5* (*paired box gene 2/5*) jouent un rôle crucial dans l'établissement de la région mésencéphalique et également dans la neurogenèse. Les facteurs de signalisation diffusibles *FGF8* (*fibroblast growth factor 8*), *Shh* (*sonic hedgehog*) et *Wnt1* induisent la neurogenèse des progéniteurs dopaminergiques via l'induction de l'expression de *FoxA2*, *Lmx1a/1b*, et *Msx1*. Par la suite, l'induction de l'expression de *Nurr1* et *Pitx3* promeuvent la différenciation des progéniteurs dopaminergiques en cellules post-mitotiques. *Nurr1*, en coopération avec d'autres facteurs, induit également l'expression de gènes clés du phénotype dopaminergique (*TH*, *VMAT2* et *DAT*). Ces différentes phases s'établissent chez la souris du 7^e au 12^e jour de développement embryonnaire.

À partir du 13^e jour, les neurones dopaminergiques nouvellement formés migrent et commencent leur croissance axonale pour former des connexions avec le striatum vers E14 et avec le cortex à E16. L'innervation continue ensuite une semaine après la naissance. Un phénomène naturel d'apoptose des neurones surnuméraires a également lieu à partir de la naissance, atteignant un pic entre P2 et P14, puis s'atténuant vers P20.

Figure 9. – Facteurs moléculaires impliqués dans le développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral.



La couleur des flèches indique l'effet des facteurs sur l'expression génique : violette = régulation positive, noire = régulation négative, verte = boucle d'autorégulation, orange = régulation coopérative.

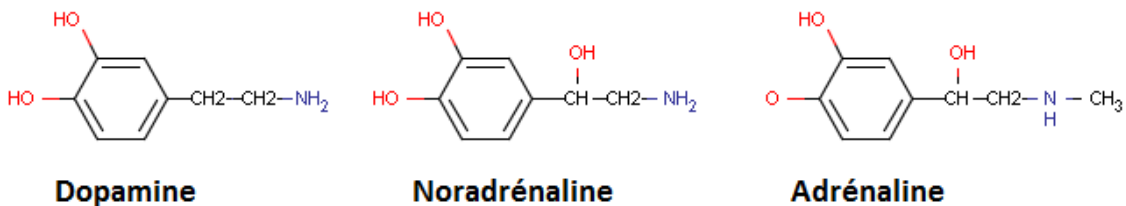
L'étude de base du système dopaminergique se termine ici. Elle était un prérequis avant d'entrer dans le vif du sujet de mon projet de thèse portant sur les mécanismes de la libération axonale et somatodendritique de DA qui restent encore aujourd'hui méconnus. En particulier, les informations détaillées et spécifiques sur la machinerie moléculaire de la libération de DA sont rares, et les mécanismes sont souvent supposés à partir des études sur l'exocytose rapide des vésicules synaptiques ou sur la sécrétion neuroendocrine des autres systèmes neuronaux.

1.2. Libération axonale de dopamine

Depuis les premières découvertes par Carlsson à la fin des années 50, les rôles de la DA ont été étudiés de manière extensive, principalement au niveau des terminaisons axonales du striatum qui concentre la majorité de l'innervation dopaminergique dans le cerveau. Les sections suivantes s'attachent à décrire l'état actuel des connaissances concernant le métabolisme de la DA, incluant sa biosynthèse, son stockage, sa libération, son catabolisme et la neurotransmission dopaminergique, survenant au niveau des terminaisons axonales.

1.2.1. Métabolisme de la dopamine

La dopamine (4-(2-aminoéthyl)benzène-1,2-diol ou 3,4-dihydroxyphényl-éthylamine ou plus simplement hydroxytyramine) est une molécule de la famille des catécholamines (dont fait partie aussi la noradrénaline et l'adrénaline) qui sont caractérisées par un noyau catéchol (groupement benzène avec deux groupes hydroxyl) et une chaîne latérale éthylamine. La présence d'un unique groupement amine permet de classer également la DA, noradrénaline et adrénaline dans la famille des monoamines qui comprend également la sérotonine et l'histamine.



Longtemps considérée comme un simple intermédiaire dans la synthèse de NA et Adr, la DA a vu son rôle de neurotransmetteur établi par Carlsson en 1958. La dopamine répond en effet à tous les critères nécessaires pour être considérée en tant que tel : synthèse et stockage vésiculaire dans l'élément présynaptique, libération en réponse à une stimulation de l'élément présynaptique, action sur des récepteurs spécifiques postsynaptiques (et présynaptiques) et enfin moyens de dégradation et de recapture afin de mettre fin à son action. Ces processus seront décrits dans les prochaines sections.

1.2.1.1. Biosynthèse de la dopamine

La synthèse de la DA et des autres catécholamines (établi pour la première fois par Blaschko en 1939) se fait à partir de L-tyrosine, un acide aminé non essentiel pouvant être synthétisé *de novo* par hydroxylation de la phénylalanine. Ce dernier étant un acide aminé essentiel, il doit être apporté

par l'alimentation. La biosynthèse de la DA comprend deux grandes étapes catalysées par deux enzymes : la tyrosine hydroxylase (TH) et la décarboxylase des acides aminés aromatiques (DCAA) (**figure 10**).

1.2.1.1.1. Hydroxylation de la tyrosine en L-DOPA par la TH

Après s'être rendue aux neurones dopaminergiques via la circulation sanguine, la tyrosine est d'abord convertie en L-3,4-dihydroxyphenylalanine par hydroxylation de son anneau phénolique par la tyrosine hydroxylase (**figure 10**). Ceci constitue l'étape limitante de la réaction (*Levitt et al., 1965*), qui est irréversible et nécessite la présence de fer ferreux, d'oxygène ainsi que de tétrahydrobioptérine (BH₄), un cofacteur synthétisé à partir du guanosine triphosphate (GTP) par la GTP cyclohydrolase. C'est donc la quantité et l'activité de la TH qui déterminent la quantité de catécholamines produites, et ce, sans lien avec la quantité de tyrosine présente dans les neurones.

Cette enzyme clé est toujours exprimée par un unique gène, bien que différents variants d'épissage existent selon les espèces : 4 chez l'humain, 2 chez le primate et 1 chez les autres mammifères (*Haycock, 2002; Kobayashi et al., 1988; Lewis et al., 1993*). Chaque isoforme adopte la même conformation : une extrémité N-terminale régulatrice (~150aa), un domaine central catalytique (~300aa) et une extrémité C-terminale dont la glissière à leucine permet l'adoption d'une forme tétramérique indispensable à son fonctionnement (*Goodwill et al., 1998; Vrana et al., 1994*).

Cette étape est un point clé dans la régulation de la synthèse de DA, et l'activité de la TH peut être fortement régulée, essentiellement au niveau de son extrémité N-terminale. La régulation s'opère au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par des modifications covalentes, interactions protéine-protéine et par régulation allostérique (*Daubner et al., 2011; Dunkley et al., 2004; Kumer et Vrana, 1996*). Tout d'abord, les catécholamines synthétisées peuvent entrer en compétition avec le cofacteur BH₄ pour la liaison de l'ion ferrique au site catalytique de la TH. Des taux élevés en catécholamines conduisent donc à une inhibition de l'activité de la TH et donc à une diminution de leur propre concentration par feedback négatif (*Nagatsu et al., 1964*). L'autre grand mécanisme de régulation de la TH se fait par phosphorylation de résidus sérine (la plus importante étant la sérine 40) sur son domaine régulateur par de nombreuses kinases (PKA, PKC CaMPKII, PKG, MPK, ERK), avec pour résultat une augmentation de sa stabilité et/ou activité (*Dunkley et al., 2004*). Cette régulation peut venir en partie de l'activité électrique des neurones, par l'ouverture

de canaux calciques voltage dépendant, augmentation du calcium intracellulaire et activation des kinases phosphorylant TH. La stabilité de la TH peut également être contrôlée par des interactions avec d'autres protéines sur l'extrémité N-terminale (DJ-1, α -synucléine, VMAT2, DCAA, GTPCH) (Daubner et al., 2011).

Il existe des phosphatases (PP2A et PP2C) pouvant retirer les groupements phosphates de la TH et diminuer son activité (Bevilaqua et al., 2003). L'inactivation de la TH peut également se faire par nitration via les espèces réactives de l'azote (*reactive nitrogen species, RNS*) comme le peroxy-nitrite ou par thiolation de résidus cystéine (Ara et al., 1998; Ischiropoulos, 2003). Les formes déphosphorylées de la TH sont plus stables que les formes phosphorylées, ce qui est le reflet d'un plus grand turnover de la forme activée, sans doute en raison du caractère neurotoxique de la DA à trop forte concentration (Ben-Shachar et al., 2004). Enfin, l'oxygène joue également un rôle, d'abord en favorisant l'oxydation de la DA ce qui conduit à une élévation des niveaux de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species, ROS*), et aussi en ayant une action directe sur l'activité de la TH (Kumar et al., 2003; Studer et al., 2000).

1.2.1.1.2. Décarboxylation de la L-DOPA en dopamine par la DCAA

La 2^e étape dans la synthèse de DA fait intervenir la décarboxylase des acides aminés aromatiques (*aromatic amino acid decarboxylase, AADC*) qui assure la conversion de la L-DOPA en DA par clivage de son groupement carboxyle, en utilisant le phosphate de pyridoxal (vitamine B6) comme cofacteur (Blaschko, 1942)(**figure 10**). La DCAA n'est pas spécifique de la DOPA, mais peut catalyser également d'autres acides aminés aromatiques comme la L-tyrosine, L-tryptophane et L-histidine et donc rentre en jeu dans la synthèse d'autres neurotransmetteurs.

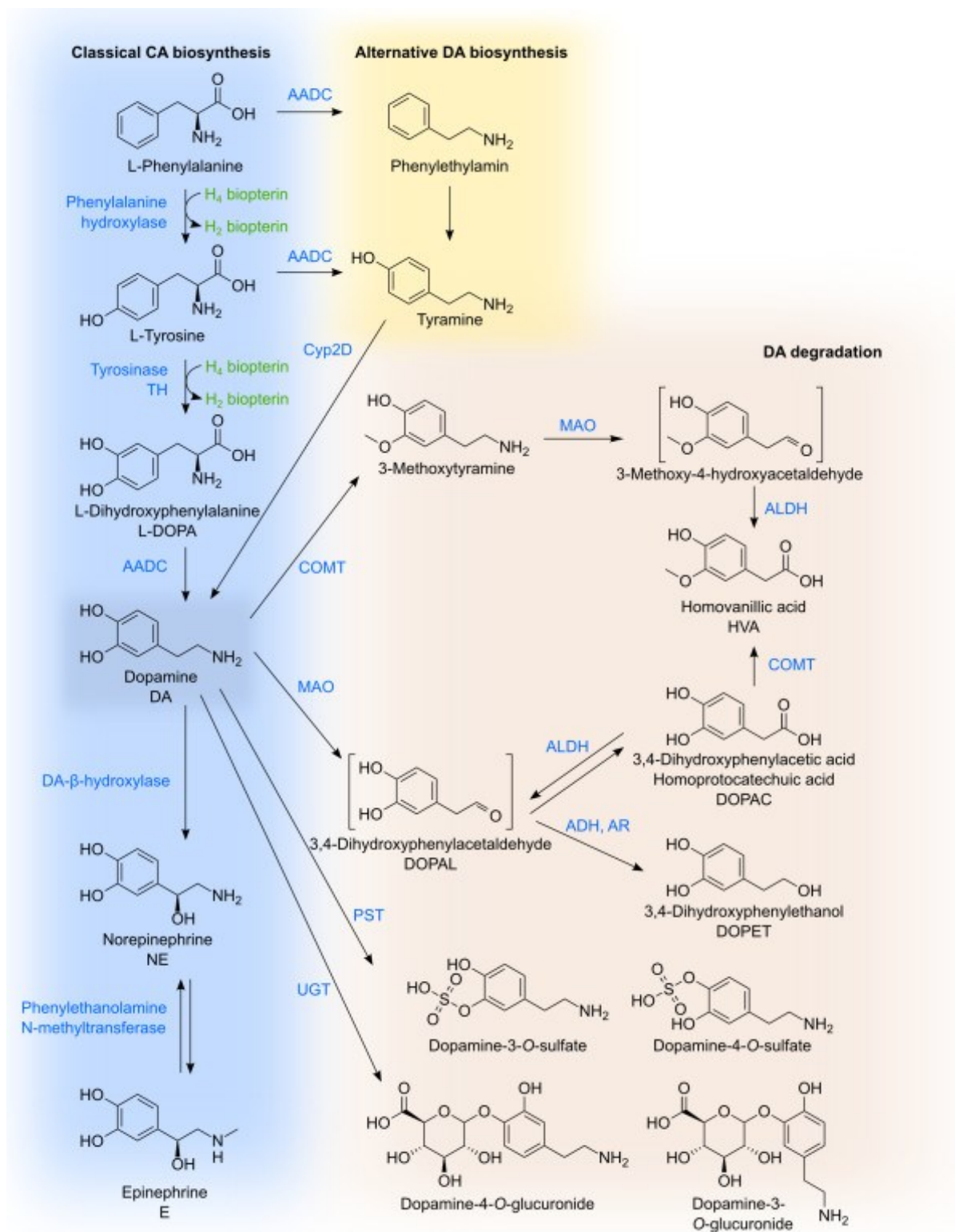
La DCAA est régulée au niveau transcriptionnel par épissage alternatif (O'Malley et al., 1995) et au niveau post-transcriptionnel par phosphorylation (Duchemin et al., 2000) et par l'activation des récepteurs dopaminergiques D1, rendant son activité dépendante des niveaux en DA (Rossetti et al., 1990; Hadjiconstantinou et al., 1993; Cumming et al., 1997). Ainsi, l'utilisation d'antagonistes dopaminergiques permet d'augmenter l'activité de la DCAA, tandis que des agonistes vont la diminuer (Hadjiconstantinou et Neff, 2008). Il est cependant à noter que contrairement à la TH, qui est l'enzyme limitante dans la synthèse de DA, la forte activité catalytique de la DCAA permet le maintien de niveaux très bas de L-DOPA. Pour cette raison, il est possible d'augmenter drastiquement les niveaux de DA par l'administration systémique de L-

DOPA, qui à la différence de la DA, peut traverser la barrière hématoencéphalique via des transporteurs des acides aminés de type L (L-amino acid transporter) (*Sampaio-Maia et al., 2001*).

1.2.1.1.3. Décarboxylation de la tyramine en dopamine par les Cyp2D

Il existe une voie alternative à la synthèse de DA médiée par des enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450). Dans cette voie, la décarboxylation précède l'hydroxylation : la tyrosine est donc décarboxylée en tyramine pouvant être par la suite hydroxylé par les protéines Cyp2D, en particulier l'isoforme Cyp2D6 (*Bromek et al., 2011, 2010; Hiroi et al., 1998*) (**figure 10**). Chez le rat, seules 3 isoformes de Cyp2D peuvent assurer cette conversion (Cyp2D2, 2D4, et 2D18) et étant moins efficace que l'isoforme Cyp2D6, il a ainsi été envisagé que cette voie de biosynthèse serait de plus grande importance chez l'humain. Cependant, la contribution exacte de cette voie par rapport à la voie classique n'est pas bien connue à l'heure actuelle (*Bromek et al., 2010*).

Figure 10. – Voies de biosynthèse et catabolisme de la dopamine.



Source : Meiser et al., 2013

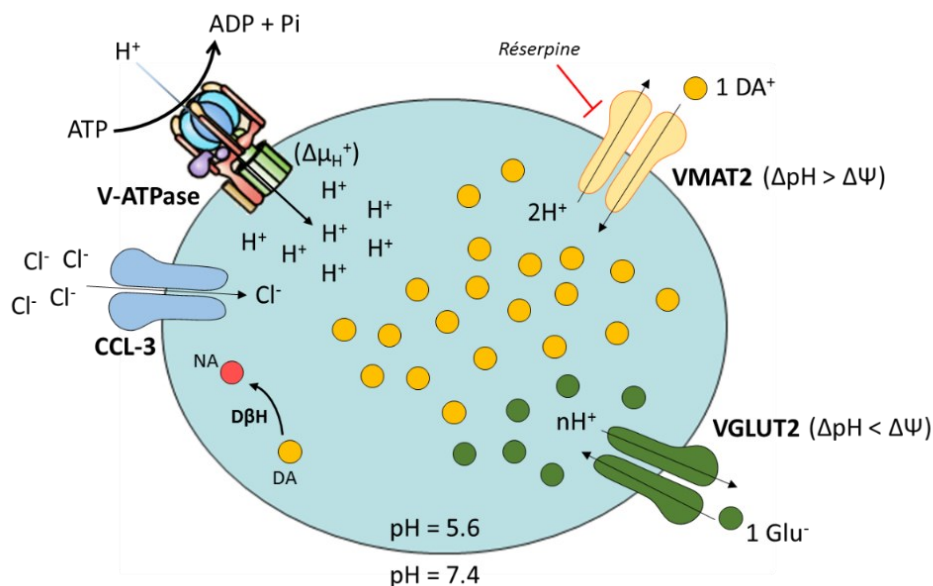
1.2.1.2. Stockage de la dopamine

La DA nouvellement synthétisée est ensuite stockée dans des petites vésicules synaptiques sphériques (*small synaptic vesicles, SSV*) d'environ 40 nm ou dans de larges vésicules denses (*large dense-core vesicle, LDCV*), d'environ 70-200 nm, en vue de sa libération (*Liu et al., 1994; Nirenberg et al., 1995*). Cette étape fait intervenir le transporteur vésiculaire des monoamines (*vesicular monoamine transporter, VMAT*) qui, par transport actif, amène à l'intérieur de la vésicule une molécule de DA en échange de 2 protons (*Chaudhry et al., 2008*). Ce processus nécessite la présence sur les vésicules de la pompe à proton vésiculaire V-ATPase (dépendant du Mg^{2+}) qui permet de générer le gradient électrochimique ($\Delta\mu H^+$) nécessaire au remplissage des vésicules (**figure 11**).

VMAT existe sous deux isoformes, VMAT1 et VMAT2, encodés par deux gènes distincts (*SLC18A1* et *SLC18A2* respectivement) et différenciés sur la base de leur affinité différente aux amines et leur inhibition par des drogues spécifiques. Par ailleurs, malgré une forte homologie de séquence, VMAT1 et VMAT2 sont différemment exprimés dans les organes synthétisant les amines biogènes (*Erickson et al., 1996; Henry et al., 1998*). Le VMAT1 (aussi appelé « *chromaffin granule amine transporter* », *CGAT*) semble présent uniquement dans les cellules endocrines périphériques alors que le VMAT2 est exprimé par les neurones et quelques cellules neuroendocrines du système nerveux central et périphérique (*Eiden et al., 2004; Zanner et al., 2002*). Le VMAT2 peut être bloqué de manière irréversible par la réserpine, ce qui empêche le remplissage des vésicules en DA. Par cette propriété, elle a été une drogue de choix pour étudier le système dopaminergique, servant autrefois à miner l'akinésie parkinsonienne (*Carlsson et al., 1957*) ou bien anciennement à traiter certains symptômes de la schizophrénie causés par un excès de DA (*Braun, 1960*).

L'intérêt du stockage vésiculaire est double. Premièrement, il facilite la libération de DA aux terminaisons par un mécanisme exocytotique. Deuxièmement, le pH acide des vésicules (≈ 5.6) permet de protéger la DA de l'oxydation, pouvant générer un stress pour la cellule (*Segura-Aguilar et Paris, 2014; Umek et al., 2018; Vergo et al., 2007*). Le stress oxydatif est par ailleurs minimisé par la formation de complexes fonctionnels associant TH, DCAA et VMAT2 (*Cartier et al., 2010*).

Figure 11. – Remplissage vésiculaire des monoamines par le transporteur VMAT2.



La pompe V-ATPase génère un gradient électrochimique $\Delta\mu_{H^+}$ à travers la membrane vésiculaire. La présence de canaux ioniques perméables au chlore (CCL-3) permet un influx d'ions Cl^- qui neutralise la charge positive des ions H^+ , ce qui dissipe le gradient électrique et permet à la pompe V-ATPase de transporter plus de protons. Les transporteurs vésiculaires utilisent ce gradient pour amener les neurotransmetteurs (DA et autres monoamines) à l'intérieur de la vésicule. Les différents transporteurs qui existent s'appuient à des degrés différents sur les deux composantes (ΔpH et $\Delta\psi$) de ce gradient. Le transporteur VMAT2 transporte les monoamines qui sont chargées positivement par antiport avec 2 ions H^+ , et le transport dépend donc essentiellement du gradient chimique en proton (ΔpH). Le transport peut être bloqué par certaines drogues, notamment la réserpine. Les transporteurs du glutamate VGLUTs, quant à eux, doivent amener une molécule chargée négativement à l'intérieur de la vésicule et donc dépendent plus du potentiel de membrane $\Delta\psi$ que du gradient chimique. Le cas du transport VGLUT2 est montré ici, car il est exprimé par certaines populations de neurones dopaminergiques, qui ont comme propriété de pouvoir colibérer le glutamate en plus de la DA. C'est également au sein des vésicules synaptiques que peut s'effectuer la conversion de la DA en noradrénaline (NA), catalysée par la dopamine β -hydroxylase (DβH).

1.2.1.3. Libération exocytotique de dopamine

La libération de DA au niveau des terminaisons synaptiques se fait par exocytose (*du grec -exo "hors de" et de -kutos "cavité, cellule"*), qui a lieu quand des vésicules contenant la DA fusionnent avec la membrane plasmique pour relarguer le neurotransmetteur dans le domaine extracellulaire. La découverte de ce mécanisme doit beaucoup aux travaux initiaux de Bernard Katz (prix Nobel de physiologie et médecine de 1970) sur la jonction neuromusculaire, qui s'intéressaient au mécanisme par lequel une impulsion nerveuse était transmise entre le nerf et le muscle (*Katz, 1969*). En utilisant des enregistrements électrophysiologiques Katz et ses collègues ont démontré que la transmission synaptique est initiée quand un potentiel d'action déclenche une libération de neurotransmetteurs (acétylcholine) au niveau de la terminaison axonale. Par ailleurs, Katz montra que l'acétylcholine n'était pas relâchée de façon continue, mais par petits paquets, appelés *quantum*, chacun produisant un petit signal dans la fibre musculaire. On sait aujourd'hui (notamment grâce à la microscopie électronique) que cela est dû au stockage des neurotransmetteurs dans les vésicules synaptiques suivi de leur libération par exocytose. Ce processus dépend notamment de l'activité électrique du neurone, du calcium et d'une machinerie universelle incluant notamment les protéines SNARE (pour "*soluble NSF-attachment protein receptor*") (*Söllner et al., 1993; Sudhof, 2004*).

Les sections suivantes vont décrire les grandes étapes de ce processus clé dans la transmission synaptique. Il convient cependant de noter que les mécanismes moléculaires de l'exocytose ont été à ce jour principalement caractérisés dans des systèmes non dopaminergiques (jonction neuromusculaire, neurones corticaux, neurones de l'hippocampe...). L'état actuel des connaissances concernant la machinerie exocytotique spécifique au niveau du système DA est encore limité (*Liu and Kaeser, 2019*).

1.2.1.3.1. Trafic vésiculaire

La première étape du cycle de vie d'une vésicule synaptique est sa formation au niveau de l'appareil de Golgi, suivi de son transport jusqu'aux terminaisons axonales le long des microtubules. Ceci se fait par un mécanisme dépendant des protéines motrices de la famille des kinésines (transport antérograde) et dynéines (transport rétrograde) et est régulé par des membres de la famille des Rab (petites GTPase) situés à la membrane des vésicules (*Hirokawa et al., 2010*).

Au niveau des terminaisons axonales, les vésicules synaptiques se remplissent de leurs neurotransmetteurs (**figure 11**) et se regroupent en deux pools : un pool compétent pour la

libération (*readily releasable pool* ou *RRP*) qui est amarré (« *docked* ») à la membrane plasmique dans des zones dites actives et un pool de réserve qui est lié au cytosquelette (*Richards et al., 2000; Voglmaier et Edwards, 2007*). Les vésicules amarrées aux zones actives peuvent spontanément fusionner à la membrane et libérer leur contenu. On parle alors d'exocytose constitutive ou spontanée, qui est peu régulée (*Burgess et Kelly, 1987*). À l'inverse, la forme régulée survient lorsqu'une dépolarisation du neurone entraîne l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage (*voltage-gated calcium channels, VGCC*), ce qui déclenche une entrée de calcium et l'exocytose (*Augustine et al., 1985; Thomas C. Südhof, 2013*).

Les vésicules sont immobilisées au niveau du stock de réserve par l'action de protéines de la famille des synapsines, qui peuvent se lier aux vésicules pour les accrocher les unes les autres ou au niveau de filaments d'actine du cytosquelette (*Fdez et Hilfiker, 2006*). La mobilisation des vésicules maintenues par la synapsine se fait après phosphorylation de celle-ci par les MAP kinases ou la protéine-kinase Ca^{2+} -calmoduline dépendante de type II (*CaMKII*) (*Hosaka et al., 1999*). La phosphorylation de la synapsine conduit à un détachement de celle-ci des vésicules synaptiques permettant leur mobilisation vers le RRP au niveau des zones actives pour initier l'exocytose.

1.2.1.3.2. Arrimage (*docking*)

L'arrimage (*docking*) consiste en l'étape où les vésicules synaptiques s'alignent avec la membrane plasmique au niveau des zones actives. Les mécanismes exacts de ce processus précoce ne sont pas encore complètement déterminés, même si l'on sait qu'il est dépendant du calcium et met en jeu des complexes de protéines, recrutées séquentiellement sous la dépendance d'un signal contrôlé par des petites GTPase de la famille des Rab. Notamment, les membres de la sous-famille Rab3 sont exprimés dans les neurones à la surface des vésicules synaptiques et participent à leur arrimage (*Binotti et al., 2016*).

1.2.1.3.3. Amorçage (*priming*)

L'amorçage (*priming*) constitue une étape importante dans la préparation à la fusion membranaire et fait intervenir plusieurs partenaires protéiques importants de la famille des SNARE (*SNAP Receptor*, récepteur des protéines SNAP). On peut faire la distinction selon qu'une protéine SNARE se trouve sur la membrane des vésicules (v-SNARE), comme c'est le cas pour la synaptobrevine (ou VAMP, *vesicle-associated membrane protein*), ou sur la membrane plasmique (t-SNARE, pour *target*, cible en anglais), comme c'est le cas pour la syntaxine et SNAP-25

(*synaptosomal associated protein-25*). Ces protéines SNARE s'assemblent pour former un complexe macromoléculaire (le *trans-SNARE*) traversant les deux membranes, ce qui les met en étroite apposition. L'importance de ces protéines dans l'exocytose a été notamment démontrée par l'utilisation des toxines tétaniques et botuliniques pouvant les cliver et inhibant de fait toute libération par exocytose (Blasi et al., 1993a, 1993b; Schiavo et al., 1992).

Il a été également proposé que les protéines d'échafaudages RIM (*Rab3 interacting molecule*) et Munc-13 (*mammalian uncoordinated-13*) participent au recrutement des vésicules aux zones actives pour les préparer à la libération (Deng et al., 2011; Dulubova et al., 2005). Munc-13 interagit avec RIM (partenaire de la GTPase Rab3) formant un complexe servant notamment à activer localement la machinerie SNARE. Les protéines RIM peuvent également recruter des canaux calciques nécessaires à l'exocytose au niveau des zones actives (Kaeser et al., 2011). Munc-18 (membre de la famille de protéines régulatrices SM pour *Sec1/Munc18-like*) joue également un rôle important durant l'amorçage de par ses interactions avec la syntaxine, la stabilisant et contrôlant son orientation spatiale dans le complexe *trans-SNARE* (Diao et al., 2010). Les protéines bassoon et piccolo sont quant à elles importantes pour l'assemblage et l'organisation moléculaire des zones actives (Gundelfinger et al., 2016). Enfin, parmi les protéines chaperonnes, on retrouve également la protéine CSP- α (*cysteine-string protein*) qui se lie à SNAP-25, ainsi que la famille des synucléines dont les 3 membres (α , β et γ -synucléine) peuvent se lier à la synaptobrevine et les phospholipides chargés négativement de la membrane. De par leur rôle de chaperonne, ces protéines contrôlent l'assemblage, la maintenance et la dégradation du complexe SNARE (Burré et al., 2010; Sharma et al., 2011).

1.2.1.3.4. Fusion

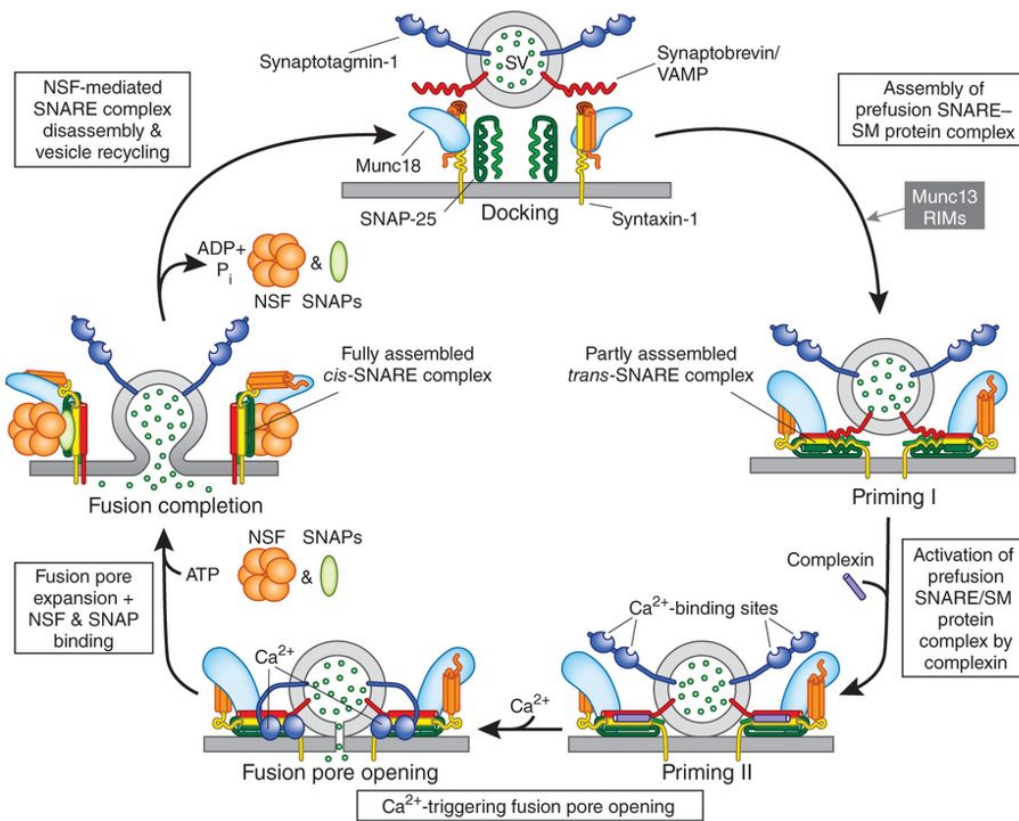
La dernière étape de l'exocytose correspond aux rapprochements des membranes vésiculaires et plasmiques et à la fusion de celles-ci pour créer un pore par lequel le contenu des vésicules va être libéré dans la fente synaptique. Cette étape implique l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de l'élément présynaptique ce qui dépolarise le neurone et permet l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage et une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium qui agit comme signal pour l'exocytose régulée.

Les protéines de la famille des synaptotagmines (dont le principal isoforme Syt1, est présent à la membrane vésiculaire) agissent comme senseur du calcium dans l'exocytose, grâce à leurs deux

domaines C2 (homologues à celui de la protéine kinase C) pouvant lier le calcium. En absence de calcium, la Syt, en interaction avec la protéine vésiculaire SV2, inhibe la fusion. En présence de calcium, un changement de conformation de la Syt conduit à son interaction avec le complexe *trans-SNARE* et les phospholipides de la membrane plasmique, ce qui déclenche l'ouverture du pore de fusion et la libération de neurotransmetteurs (*Davletov et Südhof, 1993; Xu et al., 2009*). Notons enfin que les Syts n'agissent pas seules dans la fusion, mais ont pour cofacteur les protéines de la famille des compléxines (*Jorquera et al., 2012; Tang et al., 2006*).

Le désassemblage des vésicules peut ensuite se faire par séparation de la syntaxine, SNAP-25 et la synaptobrevine via l'action de l'ATPase NSF (*NEM-Sensitive Fusion protein* ou protéine de fusion sensible à la N-éthylmaléimide) et ses protéines adaptatrices, les SNAPs (*Soluble NSF Attachment Proteins*, protéines solubles d'attachement de la NSF) (*Söllner et al., 1993*).

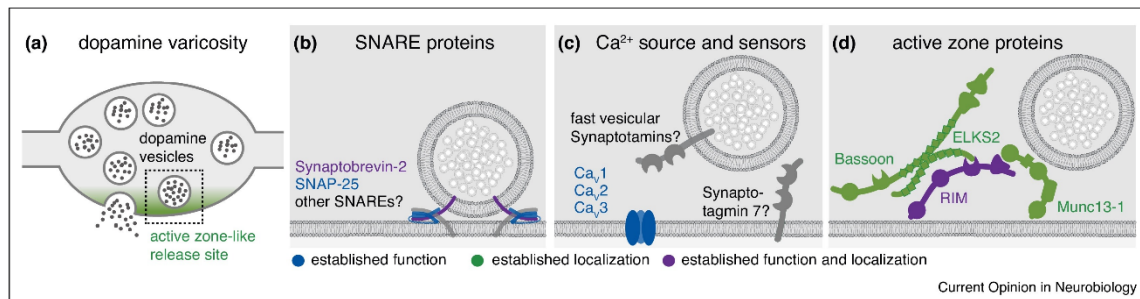
Figure 12. – Représentation schématique de l'exocytose régulée par les protéines SNARE/SM.



Amorçage (Priming) I : La synaptobrevine (protéine SNARE vésiculaire) s’assemble durant l’amorçage avec les protéines syntaxine-1 et SNAP-25 (protéines SNARE membranaires) pour former le complexe trans-SNARE. Cette étape fait intervenir plusieurs protéines régulatrices comme les RIMs ou Munc-13/18. **Amorçage II :** la fixation des complexines au complexe trans-SNARE augmente l’amorçage de ce dernier, le rendant prêt à la fusion. **Fusion :** suite à l’ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, des ions Ca²⁺ viennent se fixer à la synaptotagmine, ce qui provoque un changement de conformation rendant possible son interaction avec le complexe trans-SNARE et les phospholipides de la membrane. Le rapprochement des membranes vésiculaire et plasmique qui en résulte déclenche alors la fusion et la libération du contenu des vésicules. Le complexe trans-SNARE peut ensuite être désassemblé par action des ATPases NSF/SNAP et les vésicules peuvent être recyclées pour être réutilisées. Adapté de Südhof, 2013.

La majorité des mécanismes moléculaires présentés ici ont été démontré à partir d'études ayant porté sur l'exocytose rapide des neurotransmetteurs. Seulement une partie de ces acteurs ont été caractérisés dans le cas des systèmes neuromodulateurs, comme le système dopaminergique. Les protéines SNAP-25, synaptobrevine-2, Syt1, Syt7, SV2, bassoon, RIM, RIM-BP, ELKS et Munc 13-1 sont notamment retrouvés dans la plupart des varicosités synaptiques DA (Mendez et al., 2011; Liu et al., 2018; Ducrot et al., 2021). La libération de DA s'est montrée par ailleurs impactée par l'effet des toxines botuliniques A et B qui clivent SNAP-25 et la synaptobrevine-2 (Bergquist et al., 2002; Fortin et al., 2006; Hikima et al., 2021), au knock-out conditionnel de RIM (Liu et al., 2018), et récemment de Syt1 (Banerjee et al., 2020). L'isoforme Syt11 a par ailleurs été impliquée dans le remplissage du pool vésiculaire de DA et pourrait ainsi jouer un rôle dans le trafic des vésicules synaptiques (Wang et al., 2018). L'essentiel des connaissances concernant la machinerie moléculaire impliquée dans la libération de DA aux varicosités axonales est ainsi résumé dans la **figure 13**.

Figure 13. – Machinerie moléculaire impliquée dans la libération axonale de dopamine.



(a) Schéma d'une varicosité dopaminergique (zone active en vert). (b) Protéines SNARE dont le rôle a été démontré dans la libération axonale de DA. (c) Senseurs calciques impliqués dans l'exocytose des vésicules DA. Syt1 a montré récemment un rôle dans la libération phasique de DA tandis que Syt7 a été montré en partie impliqué dans la libération STD (Banerjee et al., 2020; Mendez et al., 2011; Delignat-Lavaud et al., 2021). Les canaux calciques Cav1 (type-L), Cav2.1 (type-P/Q), Cav2.2 (Type-N) et Cav3 (type-T) ont été montré impliqués dans la libération axonale (Brimblecombe et al., 2015), ainsi que (d) certaines protéines des zones actives (RIM, ELKS2 et Munc13-1) (Liu et al., 2018). Source : Liu et Kaeser, 2019.

1.2.1.4. Élimination extracellulaire de la dopamine

Suite à l'action de la DA libérée sur ses récepteurs postsynaptiques ou autorécepteurs présynaptiques (voir section 1.2.2. suivante), la signalisation dopaminergique est arrêtée, soit par recapture via un transporteur spécialisé, soit par catabolisme.

1.2.1.4.1. Recapture de la dopamine

Après libération, la DA peut être recapturée par l'action du transporteur de la dopamine (*dopamine transporter, DAT*) à la membrane plasmique des neurones dopaminergiques (*Eriksen et al., 2010; Giros et al., 1991*). La DA peut par la suite être en partie recyclée dans les vésicules synaptiques par le VMAT2. De cette façon, le DAT joue un rôle clé dans l'arrêt de la signalisation dopaminergique et dans le maintien de la réserve de DA libérable. Cela a été notamment démontré par l'analyse de souris knock-out pour le DAT, qui montrent un état hyperdopaminergique, résultant d'une clairance et d'un stockage vésiculaire de la DA réduits (*Giros et al., 1996*).

Le DAT est encodé par le gène SLC6A3 (*Solute Carrier Family 6 Member 3*) de la famille des SLC6, dont font également partie les transporteurs de la noradrénaline, sérotonine, glycine et GABA. Ces transporteurs utilisent le gradient transmembranaire du sodium (généralisé par la Na^+/K^+ ATPase) et un cotransport d'ions Cl^- pour déplacer leur substrat à travers la membrane plasmique (*Chen et al., 2004*). En faisant rentrer deux ions Na^+ et un ion Cl^- par molécule de DA, le DAT présente donc une activité électrogénique, pouvant dépolariser les neurones (*Carvelli et al., 2004; Storch et al., 2004; Zahniser et al., 1997*). Il a été proposé qu'en l'absence d'ions ou de substrats, le DAT bouge librement dans la membrane plasmique. Lors de la liaison avec le Na^+ , le DAT se trouve alors immobilisé et sa conformation change de manière à rendre compatible la liaison du Cl^- et de la DA. Une fois le substrat lié au DAT, son transport est assuré selon le gradient électrochimique. Ainsi, une hyperpolarisation de la membrane peut faciliter la liaison du Na^+ extracellulaire et donc le transport membranaire de DA, tandis que la dépolarisation de la membrane le réduira.

Le DAT est par ailleurs la cible principale des psychostimulants tels que la cocaïne et les amphétamines (*Fumagalli et al., 1998; Giros et al., 1996*). La cocaïne agit comme un inhibiteur compétitif qui se lie au site de liaison du DAT et bloque ainsi son activité de transport (*Beuming et al., 2008*). L'amphétamine, quant à elle, agit comme un substrat du DAT capable d'inverser la direction du transport de DA. Elle peut également dissiper le gradient de protons nécessaire au

VMAT2 pour le remplissage des vésicules. Cela conduit ainsi à une libération non vésiculaire de DA (indépendante de l'activité) (*Sulzer et al., 2005*).

La régulation du DAT peut survenir par différents mécanismes. La capacité de transport du DAT est réduite par l'activation de la protéine kinase C (PKC), pouvant le phosphoryler et également accélérer son endocytose par un mécanisme qu'on pense dépendant de la clathrine et de la dynamine (*Copeland et al., 1996; Vaughan et al., 1997*). L'amphétamine peut également causer l'internalisation du DAT (*Saunders et al., 2000*). L'expression et l'activité du DAT peuvent aussi être modulées par différentes protéines présynaptiques interagissant avec lui comme PICK1 (*PDZ domain-containing protein interacting with protein kinase C*), Hic-5 ou α -synucléine (*Lee et al., 2001; Torres et al., 2001; Carneiro et al., 2002*). Enfin, il a aussi été montré que l'activation de l'autorécepteur dopaminergique D2 terminal régule positivement la localisation du DAT à la membrane plasmique (*Bolan et al., 2007; Chen et al., 2013; Lee et al., 2007*).

1.2.1.4.2. Catabolisme de la dopamine

La DA peut enfin être catabolisée, principalement par l'action de deux familles d'enzymes, les monoamines oxydase (MAO) et les catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (*voir figure 10*).

Les MAO se retrouvent au niveau de la membrane interne des mitochondries, dans le SNC (neurones, microglies et astrocytes) et en périphérie. Il existe deux isoformes encodées par deux gènes distincts : les MAO-A et MAO-B (*Bach et al., 1988*). La DA présente une affinité identique pour les deux formes, mais il existe des différences interspèces. Ainsi, la DA sera principalement oxydée par la MAO-B chez l'humain, mais par la MAO-A chez le rat (*Napolitano et al., 1995*). Ces enzymes (avec leur cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide, FAD) catalysent la déamination oxydative de la DA pour produire du peroxyde d'hydrogène et du 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL). Celui-ci pourra ensuite être inactivé, soit par réduction en 3,4-dihydroxyphényléthanol (DOPET) par l'alcool déhydrogénase (ADH), soit par oxydation en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par aldéhyde déshydrogénase (ALDH).

La catéchol-O-méthyltransférase, quant-à-elle, catalyse une méthylation d'un des deux groupements hydroxyle du noyau catéchol du DOPAC en acide homovanilique (HVA), le principal produit de dégradation de la DA. Il en existe deux isoformes encodées par un seul gène (*Tenhunen et al., 1994*) ; une forme cytoplasmique soluble S-COMT localisée dans les cellules gliales et en

périphérie, et une forme membranaire M-COMT retrouvée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux des neurones.

1.2.2. Neurotransmission de la dopamine

1.2.2.1. Récepteurs de la dopamine

Une fois libérée, la DA exerce son action via des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) à 7 domaines transmembranaires. Il n'existe aucun récepteur ionotrope pour la DA chez les mammifères (mais voir *Ringstad et al., 2009* pour un récepteur ionotrope activé par la dopamine chez *C. elegans*). Selon la nature de la protéine G du récepteur, la transduction du signal qui en résulte sera différente (voir 1.2.2.2). Le classement des récepteurs dopaminergiques s'est établi en deux groupes selon leurs propriétés structurales, biochimiques et pharmacologiques : la famille des récepteurs D1 (D1R et D5R) et la famille des récepteurs D2 (D2R, D3R et D4R) (*Beaulieu et Gainetdinov, 2011; Kebabian et Calne, 1979*). À cause du manque de ligand spécifique pour chaque sous-type de récepteurs (en particulier D5), l'hybridation in situ et l'autoradiographie ont été beaucoup utilisés initialement pour étudier la distribution des ARNm des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau. Leur localisation subcellulaire dans les différentes régions a ensuite été précisée par le développement d'anticorps en immunohistochimie, bien que ces derniers manquent encore de spécificité, en particulier pour le D2 (*Bodei et al., 2009; Stojanovic et al., 2017*). Les différentes propriétés des récepteurs dopaminergiques sont présentées dans le **tableau 1**.

Tableau 1. – Propriétés génétiques, structurales et pharmacologiques des sous-types de récepteurs dopaminergiques (chez l'humain).

Sous-type de récepteur DA	D1	D2	D3	D4	D5
Gène	<i>DRD1</i>	<i>DRD2</i>	<i>DRD3</i>	<i>DRD4</i>	<i>DRD5</i>
Localisation chromosomique	5q35.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5	4p16.1
Nombres d'introns dans la région codante	Aucun	6	5	3	Aucun
Pseudogènes	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	<i>DRD5P1</i> , <i>DRD5P2</i>
Présence de variants d'épissage	Aucun	Oui D2S, D2L	Oui	Oui	Aucun
Nombre d'acide aminés	446	D2S, 414; D2L, 443	400	387-515	477
Poids moléculaire (kDa)	49,300	D2S, 47,347; D2L, 50,619	44,225	41,487	52,951
Couplage aux protéines G	Gas, Gaolf	Gai, Gao	Gai, Gao	Gai, Gao	Gas, Gaq
Agonistes préférentiels	Fenoldopam, SKF-38393, SKF-81297	Bromocriptine, pergolide, cabergoline, ropinirole	7-OH-DPAT, pramipexole, rotigotine, (+)-PD-128907	A-412997, ABT-670, PD-168,077	Aucun
Antagonistes préférentiels	SCH-23390, SCH-39166, SKF-83566	Haloperidol, spiperone, raclopride, sulpiride, risperidone	Nafadotride, GR 103,691, GR 218,231, SB-277011A	A-381393, FAUC 213, L-745,870, L-750,667	Aucun
Localisations	Striatum, noyau accumbens, bulbe olfactif, amygdale, hippocampe, substance noire, hypothalamus, cortex frontal	Striatum, noyau accumbens, cortex, substance noire, VTA, hypothalamus	Striatum, VTA bulbe olfactif, cortex	Striatum, îlots de Calleja, cortex	Cortex frontal, amygdale, hypothalamus, noyau accumbens
Fonctions	Locomotion, apprentissage et mémoire, attention, contrôle de l'impulsion, sommeil, fonction rénale	Locomotion, cognition, attention, prise de décision, apprentissage moteur, fonction rénale	Locomotion, apprentissage et mémoire, attention, sommeil, comportement de reproduction	Locomotion, cognition, attention, contrôle de l'impulsion, sommeil, régulation de la prise alimentaire	Cognition, contrôle de l'impulsion, sommeil, comportement de reproduction

Sources : Beaulieu et Gainetdinov, 2011 et Mishra et al., 2018

1.2.2.1.1. Famille D1

Les deux membres de la famille D1, les sous-types D1 et D5, sont couplés positivement à l'adénylate cyclase. Leur activation conduit donc à stimuler une protéine de type G α s ou G α olf dont la sous-unité α peut activer l'adénylate cyclase responsable d'une augmentation de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC)(*Hervé et al., 1993*).

Les récepteurs D1 et D5 sont génétiquement distincts, ayant 80% d'homologie dans leur séquence transmembranaire (*Missale et al., 1998; Sunahara et al., 1991*). Cela leur confère des propriétés pharmacologiques différentes (voir **tableau 1**). Par ailleurs, le récepteur D5 présente une affinité pour la DA 10 fois plus élevée que pour le récepteur D1 (*Sunahara et al., 1991*).

Les récepteurs D1 et D5 se trouvent aussi différemment distribués dans le cerveau (*Bergson et al., 1995; Sung Choi et al., 1995*). Le récepteur D1 est le récepteur dopaminergique le plus fortement exprimé dans le cerveau (*Dearry et al., 1990; Fremeau et al., 1991; Weiner et al., 1991*). Les ARNm du récepteur D1 ont été trouvés dans le striatum (noyau caudé-putamen et noyau accumbens), le tubercule olfactif, l'amygdale, le cortex frontal et dans une moindre mesure dans l'hypothalamus, le thalamus et le cervelet. Le récepteur D5 en comparaison au D1 est peu exprimé dans le cerveau, avec une distribution restreinte à l'hippocampe; les noyaux mamillaires latéraux et le thalamus (*Meador-Woodruff et al., 1992*), bien que la protéine a pu être retrouvée également dans le cortex cérébral, le striatum et dans une moindre mesure la substance noire (*Huntley et al., 1992; Rappaport et al., 1993; Sung Choi et al., 1995*).

Par ailleurs, les récepteurs D1 et D5 présentent une localisation majoritairement extrasynaptique, se retrouvant peu ou pas sur les neurones dopaminergiques eux-mêmes. Dans le striatum on les retrouve essentiellement au niveau des neurones épineux moyens GABAergiques (MSN) qui coexpriment la substance P et la dynorphine (*Bergson et al., 1995; Huang et al., 1992; Smiley et al., 1994a*).

1.2.2.1.2. Famille D2

Les membres de la famille D2, les sous-types D2, D3 et D4, sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. Leur activation conduit donc à stimuler une protéine de type G α i/o dont la sous-unité α va inhiber l'activité de l'AC et donc la production d'AMPC. Au niveau de la séquence de leur domaine transmembranaire, les récepteurs D3 et D4 ont respectivement 75% et 53%

d'homologie avec le récepteur D2. Les plus hauts niveaux d'expression des récepteurs D2 se retrouvent dans le striatum, le noyau accumbens et le tubercule olfactif. On retrouve également des niveaux significatifs dans la substance noire, la VTA, l'hypothalamus, les aires corticales, le septum, l'amygdale et l'hippocampe. Par ailleurs, le récepteur D2 possède deux isoformes : une forme courte D2s (*short*), majoritairement exprimée au niveau présynaptique et jouant le rôle d'autorécepteur et une forme longue D2L (*long*), retrouvée majoritairement au niveau postsynaptique (De Mei et al., 2009; Giros et al., 1989; Usiello et al., 2000; Jomphe et al., 2006). Au niveau du striatum on les retrouve essentiellement au niveau des neurones MSN GABAergiques qui coexpriment l'enképhaline (Le Moine et Bloch, 1995). On peut ainsi définir au sein du striatum deux sous-groupes de neurones MSN sur la base de leur expression en récepteurs dopaminergiques et leurs sites de projections (Shuen et al., 2008). Les MSN qui projettent vers le globus pallidus interne et la SNr forment la voie striatonigrale directe et expriment sélectivement le récepteur D1. Les MSN projetant vers le globus pallidus externe forment la voie striatopallidale indirecte et expriment quant à eux le récepteur D2. Cette vision simple est néanmoins complexifiée par l'existence de MSNs coexprimant les récepteurs D1 et D2 (Perreault et al., 2011) dont la proportion est toujours sujette à controverse. Des études reposant sur l'utilisation des méthodes d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie ou de PCR ont rapporté des pourcentages élevés de neurones striataux exprimant les deux récepteurs (Weiner et al., 1991; Meador-Woodruff et al., 1991; Lester et al., 1993; Le Moine and Bloch, 1995; Yung et al., 1995; Shetreat et al., 1996; Surmeier et al., 1996, 1998; Aizman et al., 2000; Aubert et al., 2000). Un nombre de neurones MSNs D1/D2 beaucoup plus faible a cependant été détecté chez des souris transgéniques exprimant des rapporteurs fluorescents pour le D1 et le D2 (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Shuen et al., 2008; Thibault et al., 2013; Gangarossa et al., 2013).

Le récepteur D3 a un patron de distribution plus limité, se retrouvant au niveau du système limbique dans des structures telles que le noyau accumbens, le tubercule olfactif, et les îlots de Calleja. À des niveaux significativement plus bas, le récepteur D3 est également détectable dans le striatum, la SNc, VTA, l'hippocampe, la zone septale, et dans diverses zones corticales (Sokoloff et al., 1992). Il a été proposé que le récepteur D3 puisse également jouer le rôle d'autorécepteur comme le D2 (Sokoloff et al., 2006), bien que ce résultat n'ait pas été démontré initialement (L'hirondel et al., 1998) et qu'il faudrait plus de données pour valider ce rôle. Le récepteur de la dopamine D4 a le niveau d'expression le plus bas des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau,

avec une expression retrouvée dans le cortex frontal, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus, le globus pallidus, la SNr et le thalamus.

1.2.2.2. Voie de signalisation dopaminergique

Tel que mentionné précédemment, l'activité des récepteurs dopaminergiques passe par une action sur différents types de protéines G qui sont des protéines membranaires hétérotrimériques présentant 3 sous-unités (α , β et γ). En l'absence de ligand agoniste, la sous-unité α est liée au GDP ce qui l'associe fortement aux sous-unités $\beta\gamma$ et le complexe trimérique est inactif. En présence d'un ligand agoniste (DA), le GDP est échangé pour du GTP, ce qui provoque la dissociation de la sous-unité α du complexe $\beta\gamma$. Les différentes sous-unités jouent alors le rôle de molécules de signalisation pour activer ou inhiber des effecteurs intracellulaires. Le **tableau 2** présente un résumé des voies de signalisation des récepteurs dopaminergiques.

Tableau 2. – Voies de signalisation des récepteurs dopaminergiques.

Effecteur	D1-like		D2-like		
	D1	D5	D2	D3	D4
Adénylate cyclase	+	+	–	–	–
Hydrolyse de phospholipides	+	?	+		
Libération d'acide arachidonique			+		+
Canaux Ca^{2+}			–	–	
Canaux K^+			+	?	
Échangeur Na^+/H^+	?	?	+	+	+
Recapture de [3H]Thymidine			+	+	

Symboles: +, stimulation; –, inhibition; ?, suggéré.

La première fonction des récepteurs dopaminergiques est la régulation de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et donc la production d'AMPc et, secondairement, l'activité de la protéine kinase A (PKA). Dans le cas des récepteurs de type D1 (D1 et D5) le couplage à une protéine $G_{\alpha s}$ active l'AC, tandis que dans le cas des récepteurs de type D2 (D2, D3 et D4), le couplage à une protéine $G_{\alpha i/o}$ inhibe l'AC et donc la production d'AMPc. De manière subséquente, l'activité des récepteurs dopaminergiques régule ainsi la phosphorylation de plusieurs substrats par la PKA tels que les récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA, le facteur de transcription CREB, la phosphoprotéine DARP-32 (impliquée dans la plasticité synaptique), ou certains canaux ioniques. Par ailleurs, les sous-unités $G_{\alpha q}$ (D5) et les complexes $\beta\gamma$ interviennent également sur d'autres voies de second messagers comme l'hydrolyse du phosphatidylinositol par la phospholipase C, la

mobilisation des stocks intracellulaires de calcium, la régulation de certains canaux calciques et potassiques (notamment à rectification entrante de type GIRK par le D2, qui hyperpolarise les neurones), la libération d'acide arachidonique dépendante du calcium, la régulation de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ (régulant le pH et le volume intracellulaire) et de la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ (régulant le gradient électrochimique)(*Beaulieu et Gainetdinov, 2011; Missale et al., 1998*).

1.2.2.3. Fonctions des récepteurs dopaminergiques

La DA joue physiologiquement un rôle critique dans de nombreux processus. Le rôle le plus largement étudié concerne les effets de la DA sur l'expression du comportement psychomoteur, qui est principalement contrôlée par l'activité des récepteurs D1, D2 et D3 (*Missale et al., 1998*). L'activation du récepteur D1, qui est presque exclusivement exprimé sur les neurones postsynaptiques, a un effet stimulant modéré sur l'activité locomotrice. Les rôles des récepteurs D2 et D3 sont, quant à eux, beaucoup plus complexes, car ils résultent de la combinaison de leurs expressions présynaptiques (autorécepteurs) et postsynaptiques.

Les autorécepteurs présynaptiques fournissent généralement un important mécanisme de rétroaction négative qui permet le contrôle des taux de décharges neuronales et sur la synthèse et la libération de DA en réponse aux changements des niveaux extracellulaires (*Missale et al., 1998; Wolf et Roth, 1990*). L'activation des autorécepteurs présynaptiques de classe D2 du striatum entraîne une diminution de la libération de DA entraînant à son tour une diminution de l'activité locomotrice, tandis que l'activation des récepteurs postsynaptiques stimule au contraire la locomotion. Comme les autorécepteurs de classe D2 sont généralement activés par une concentration d'agonistes dopaminergiques plus faible que celle nécessaire à l'activation des récepteurs postsynaptiques, le même agoniste peut induire un effet biphasique : entraînant une baisse d'activité à faible dose et une activation comportementale à forte dose (*Eilam and Szechtman, 1989*). Bien que le récepteur D2 semble être le type prédominant d'autorécepteur impliqué dans la régulation présynaptique de la décharge neuronale; la synthèse et la libération de DA via le récepteur de type D3 pourraient également contribuer à la régulation présynaptique de la libération tonique de DA (*Sokoloff et al., 2006; De Mei et al., 2009*), bien que d'autres travaux seraient nécessaires pour valider cette fonction d'autorécepteur.

Les récepteurs D1, D2 et, dans une moindre mesure, les récepteurs D3 de la DA jouent par ailleurs un rôle crucial dans les mécanismes de récompense et de renforcement. Ainsi, les

récepteurs de la DA sont depuis longtemps un sujet d'intérêt important dans la recherche sur la toxicomanie (*Sokoloff et al., 2006; Di Chiara and Bassareo, 2007; Koob and Volkow, 2010*). Les récepteurs D1 et D2 semblent par ailleurs tous deux essentiels à l'apprentissage et aux mécanismes de la mémoire, comme la mémoire de travail, principalement contrôlée par le cortex préfrontal (*Goldman-Rakic et al., 2004; T.-X. Xu et al., 2009*). Les récepteurs D3, D4 et, potentiellement, D5 semblent quant à eux avoir une influence modulatrice mineure sur certains aspects spécifiques des fonctions cognitives contrôlées par les zones hippocampiques (*Missale et al., 1998; Rondou et al., 2010; Sokoloff et al., 2006*). Au niveau pathologique, le fait que pratiquement tous les antipsychotiques possèdent la capacité de bloquer les récepteurs de DA D2, indique que ceux-ci sont susceptibles de jouer un rôle critique dans les psychoses observées dans la schizophrénie et le trouble bipolaire (*Roth et al., 2004; Snyder et al., 1970*).

En général, les rôles physiologiques spécifiques joués par les récepteurs D3, D4 et D5 de la DA dans le cerveau demeurent largement méconnus. Les récepteurs D3 semblent exercer des influences modulatrices mineures sur plusieurs des fonctions généralement attribuées aux récepteurs de la dopamine D2 (*Joseph et al., 2002; Sokoloff et al., 2006; Beaulieu et al., 2007*). Les fonctions des récepteurs dopaminergiques D4 et D5, telles que révélées par les études pharmacologiques et génétiques, semblent quant à elles très limitées (*Missale et al., 1998; Sibley, 1999; Rondou et al., 2010*).

D'autres fonctions sont contrôlées en partie par divers sous-types de récepteurs de la DA dans le cerveau, comme l'affect, l'attention, le contrôle des impulsions, la prise de décision, l'apprentissage moteur, le sommeil, les comportements reproductifs et la régulation de la prise alimentaire (*Missale et al., 1998; Iversen and Iversen, 2007*). À l'extérieur du système nerveux central, d'autres fonctions contrôlées par les récepteurs dopaminergiques comprennent l'olfaction, la vision et la régulation hormonale, telles que la régulation de la sécrétion de prolactine dans l'hypophyse par le récepteur D2, la sécrétion de rénine par le récepteur D1, d'aldostérone par les récepteurs D2 et D4 dans le rein, la régulation du tonus sympathique, de la tension artérielle, de la vasodilatation et de la motilité gastro-intestinale (*Missale et al., 1998; Aperia, 2000; Carlsson, 2001; Witkovsky, 2004; Li et al., 2006; Iversen and Iversen, 2007*).

1.2.2.4. Concept de transmission volumique au compartiment axonal

Le concept de transmission volumique a émergé à la suite de l'analyse anatomique du système dopaminergique, en particulier au niveau des terminaisons axonales du striatum. A ce niveau, une majorité des varicosités axonales dopaminergiques semblent ne pas disposer de partenaires synaptiques (pas de densités postsynaptiques avec un second neurone) et se terminer librement (*Freund et al., 1984; Smith et al., 1994; Descarries et al., 1996*). Ce constat a amené les auteurs à proposer que les neurones dopaminergiques disposent de deux types de sites de libération axonale : certains sont « synaptiques » et d'autres (la majorité) « non synaptique » ou « asynaptique » (*Beaudet and Descarries, 1978; Descarries et al., 1980; Pickel et al., 1981; Agnati et al., 1995; Descarries et al., 1996; Bérubé-Carrière et al., 2012; Fuxe et al., 2015; Ducrot et al., 2021*). Cette organisation structurale du système dopaminergique a ainsi amené au concept de transmission volumique de DA, où celle-ci une fois libérée diffuse vers des récepteurs extrasynaptiques, assurant un niveau ambiant de DA dans le striatum, ce qui rappelle un mode de sécrétion de type hormonal paracrine. Appuyant ces observations anatomiques, l'immunoréactivité des récepteurs D1 et D2 se situe principalement à l'extérieur des synapses dopaminergiques (*Levey et al., 1993; Sesack et al., 1994; Smiley et al., 1994b; Yung et al., 1995*). Il convient néanmoins de rappeler qu'il existe encore aujourd'hui des doutes concernant la spécificité des anticorps dirigés contre les récepteurs dopaminergiques (*Bodei et al., 2009; Stojanovic et al., 2017*). Une diffusion lente et imprécise de la DA est également compatible avec le fait que les récepteurs dopaminergiques soient couplés à des protéines G dont la signalisation est plus de deux fois plus lente que celle des récepteurs ionotropes. Par ailleurs, il n'existe aucun récepteur ionotrope activé par la DA connu, il n'y aurait donc pas besoin d'avoir un couplage direct et étroit entre une terminaison axonale DAergique et une cellule cible, ce qui est un argument en faveur du concept de transmission volumique. De plus, les données électrochimiques, notamment par voltammétrie cyclique, appuient également le fait que la transmission volumique est le mode majoritaire de libération. Une contribution majeure a notamment été apportée par *Rice et Cragg (2008)*, qui ont modélisé le comportement de la DA (diffusion/recapture) après libération sur la base de nombreuses données provenant de différents groupes étudiant la libération de la DA. Ils ont conclu que le processus de diffusion de la DA était trop rapide pour que le transporteur de la dopamine (DAT) puisse le contrecarrer (par recapture hors de l'espace extrasynaptique). Ainsi, le principal mode de communication

de la DA semble se faire via une transmission volumique à courte distance, qui peut activer des récepteurs dopaminergiques dans une portée de 7-8 μm .

1.2.2.5. **Activité tonique et phasique des neurones dopaminergiques**

Nous avons vu précédemment que les données d'électrophysiologie indiquent l'existence de deux modes de libération déclenchés par des potentiels d'action. En premier lieu, une **libération tonique** qui génère une augmentation légère et généralisée de la DA extracellulaire via la décharge spontanée (« *pacemaker* ») et non synchrone de certains neurones dopaminergiques (Grace, 2016). Il est estimé que 50 à 98% des neurones DA présentent une activité de décharge tonique *in vivo* (Dai and Tepper, 1998; Floresco et al., 2003). En second lieu, il existe une **libération phasique** entraînant une augmentation rapide et transitoire de la DA libérée, via une décharge synchronisée en rafale (Grace, 2016). Elle est généralement causée par une activation de récepteurs NMDA via des connexions excitatrices sur les neurones DA, à la suite de stimuli environnementaux (Floresco et al., 2003; Zweifel et al., 2009). Dans cette idée, la libération tonique engendrerait une libération volumique de DA, lente et spatialement imprécise, tandis que la libération phasique favoriserait une signalisation plus rapide (inférieure à la seconde) et spatialement plus localisée de la DA (Floresco et al., 2003; Marcott et al., 2014a; Yagishita et al., 2014; Howe and Dombeck, 2016). Cela est possible notamment de par la présence de sites de libération clairsemés ($\approx 30\%$ des varicosités chez la souris), présentant des zones actives spécialisées (Liu et al., 2018).

Il a été proposé que la libération tonique de DA génère des pics de DA transitoires et de courtes durées (quelques ms) au niveau de petits sous-ensembles de varicosités actives. La DA libérée diffuse rapidement et est recapturée par le DAT. C'est cette balance qui détermine les niveaux extracellulaires mesurés qui sont de l'ordre de 2 à 20 nM dans le striatum (Cragg and Rice, 2004; Chefer et al., 2009; Burrell et al., 2015; Yee et al., 2019). Ces niveaux sont normalement inférieurs au seuil d'activation de la plupart des récepteurs dopaminergiques (Bowery et al., 1994; Marcott et al., 2014b; Nair et al., 2015; Yapo et al., 2017), mais la sommation de ces pics de DA de courtes durées pourrait jouer sur l'activation des récepteurs. Il est aussi à noter que seulement 70% de la DA extracellulaire mesurée par la technique de microdialyse intracérébrale est causée par l'activité électrique des neurones (Liu et al., 2018; Banerjee et al., 2020). Les 30% de relâche restante sont indépendants des potentiels d'action et

des protéines de zone active RIM, MUNC13 et Syt1 et pourrait, par exemple, s'expliquer par une fusion vésiculaire spontanée.

La libération phasique de DA, quant à elle, est une importante forme de codage de la neurotransmission dopaminergique, qui se produit lorsqu'un grand nombre de sites de libération sont activés simultanément (décharges synchrones). Les mécanismes de recapture sont alors temporairement dépassés et l'élévation rapide des niveaux extracellulaires de DA (de l'ordre du μM chez le rongeur) pourrait ainsi conduire à l'activation de récepteurs DA postsynaptiques (« varicosités synaptiques »), mais également ceux éloignés des sites de libération. L'activité du DAT entre les différents sites de libération pourrait venir contrôler les caractéristiques spatio-temporelles de la signalisation phasique de DA (*Cragg and Rice, 2004*).

1.3. Libération somatodendritique de dopamine

1.3.1. Aspects historiques et méthodologiques

L'étude du système dopaminergique a été permise en grande partie grâce aux améliorations au cours des dernières décennies des techniques permettant la détection et la mesure de la DA, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. Ces améliorations ont notamment abouti à la découverte de la libération somatodendritique dont nous allons maintenant voir les aspects historiques.

Comme mentionné en introduction, le développement de la méthode d'histofluorescence de Falck et Hillarp a permis la première description des neurones catécholaminergiques dans le cerveau (*Carlsson et al., 1962; Falck et al., 1962*). De par cette approche, la présence de DA a pu être établie dans les corps cellulaires et au niveau des dendrites proximales des neurones dopaminergiques, mais n'a pas pu être démontrée dans leur arborisation dendritique (*Dahlstroem et Fuxe, 1964b; Fuxe, 1965a, 1965b*). Pour cette raison, il a été initialement supposé que les fibres contenant la DA correspondent aux axones des neurones dopaminergiques, et que les renflements fluorescents (les varicosités) correspondent à leurs boutons synaptiques. Par la suite, des modifications furent apportées à la méthode, avec l'utilisation d'acide glyoxylique pouvant provoquer en milieu aqueux l'autocatalyse des catécholamines en une molécule beaucoup plus fluorescente qu'avec la méthode originale (*Björklund et al., 1972; Lindvall et Björklund, 1974*).

Fort de cette sensibilité augmentée, Björklund et Lindvall découvrirent alors pour la première fois que les neurones dopaminergiques de la SNc de rat présentaient non seulement de la DA dans leurs axones, mais également dans leurs dendrites (*Björklund et Lindvall, 1975*), qui projettent et se ramifient abondamment dans la *pars reticulata* (SNr).

Par ailleurs, par une approche pharmacologique, Björklund et Lindvall furent les premiers à constater que les dendrites des neurones dopaminergiques ont la capacité de capturer et stocker la DA. En effet, la fluorescence observée dans les dendrites disparaît complètement 12-22h après injection de réserpine (5 mg/kg), déjà connue à l'époque pour dépléter les vésicules synaptiques de leur contenu. Cet effet fut renversé par l'incubation des tranches en présence de 5 μ M de DA, provoquant un retour de la fluorescence, qui peut également être abolie par le blocage du DAT après incubation de 10 μ M de désipramine et benztropine. Ces observations de stockage et de recapture de la DA par les dendrites étaient également en accord avec d'autres observations de l'époque. *Parizek et al., (1971)* et *Cuello et Kelly, (1977)* montrèrent en effet par autoradiographie que la DA tritiée (3 H-DA) injectée de façon intraventriculaire ou stéréotaxique dans la SNc pouvait se retrouver de manière subséquente au niveau des dendrites, suggérant sa recapture, tandis que *Hajdu et al., (1973)* observèrent en microscopie électronique la présence de vésicules au sein de certaines dendrites, suggérant son stockage. Ces observations amenèrent donc naturellement à questionner la capacité des dendrites à libérer la DA.

Il ne fallut pas attendre longtemps pour apporter les premières preuves de l'existence d'une libération somatodendritique (STD) de DA. *Geffen et al., (1976)*, montrèrent tout d'abord *ex vivo*, que la stimulation, avec 23.5 mM de potassium, de tranches de SNc ou de striatum de rat préalablement incubées en présence de DA tritiée, permettait d'évoquer la libération de DA. Cette libération évoquée était par ailleurs grandement altérée en absence de calcium ou en augmentant les concentrations en magnésium, ce qui était déjà connu comme inhibant l'exocytose. *Paden et al., (1976)* et *Beart et McDonald (1980)* eurent également recouru à la 3 H-DA pour démontrer l'existence d'une forme de libération STD, respectivement induite par l'amphétamine dans une préparation de SNc et par le potassium dans des tranches de VTA de rat. *Tagerud et Cuello (1979)* démontrèrent également de manière plus précise l'existence d'une libération STD de 3 H-DA, *ex vivo*, dans des tranches de SNc de rats préalablement lésés au niveau des noyaux du raphé dorsal,

afin de s'affranchir de toutes projections sérotoninergiques en direction de la SNc ; ces dernières pouvant également capter la DA tritiée.

L'utilisation de la technique de *push-pull canula* dans la SNc de chats anesthésiés permit d'apporter la première démonstration de la libération STD de $^3\text{H-DA}$, *in vivo* (Cheramy et al., 1981; Nieoullon et al., 1977). L'utilisation de divers traitements pharmacologiques contenus dans la canule permit en outre de dégager certaines propriétés de cette forme de libération. Celle-ci se trouvait augmentée en présence de potassium (dépolarisation), amphétamine (inversion du DAT), benztropine (anticholinergique et effet possiblement par blocage du DAT), de neurotransmetteurs présents dans la SNc comme la glycine, l'acétylcholine et la sérotonine, et plus surprenamment de tétradotoxine (bloqueur des canaux sodiques voltage-dépendants). La libération STD s'est trouvée diminuée en absence de calcium (inhibition de l'exocytose), par traitement à la substance P, de diazépam (modulateur allostérique positif des récepteurs GABA_A) ou bien par stimulation de l'activité de certains neurones établissant des connexions avec la SNc (aires corticales motrices et visuelles, noyaux cerebelleux fastigial et dentelé) (Nieoullon et al., 1978a, 1978b).

Par la suite, l'introduction de nouvelles techniques de détection de la DA permit la détection et l'étude *in vitro* et *in vivo* de la libération STD de DA endogène. Tout d'abord, la technique de microdialyse intracérébrale couplée à une détection électrochimique de la DA par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), supplanta la technique de push pull canula et permit l'évaluation des niveaux extracellulaires (exogènes ou endogènes) de DA au niveau somatodendritique (Bradberry et Roth, 1989; Kalivas et al., 1989; Elverfors et Nissbrandt, 1991; Robertson et al., 1991; Santiago et Westerink, 1991, 1992; Heeringa et Abercrombie, 1995; Bergquist et al., 2002; Sarre et al., 2004). Cette approche présente l'avantage d'avoir une excellente sensibilité (≈ 200 pM de DA) et spécificité, étant capable de distinguer les différentes monoamines et leurs métabolites (Alvarez et al., 1999; Hows et al., 2004). En revanche, son principal défaut est une mauvaise résolution temporelle (>1 min, nécessaire aux prélèvements des dialysats), la rendant incompatible à l'étude fine des mécanismes d'exocytose (Chen, 2005). Par ailleurs, elle présente également une mauvaise résolution spatiale, due à l'utilisation de canules de large diamètre ($\approx 200-300$ μm) qui occasionnent également des dommages aux sites d'implantations, affectant localement la relâche et la recapture de la DA.

Les limitations des techniques de microdialyse/HPLC, en particulier sa mauvaise résolution temporelle, peuvent être en partie compensées par l'utilisation des techniques d'électrochimie comme la voltammétrie cyclique ou l'ampérométrie. Celles-ci reposent sur l'utilisation d'électrodes à fibre de carbone de faible diamètre (5-10 μm) sur lesquelles on applique un voltage (constant dans le cas de l'ampérométrie, en rampe et de manière cyclique dans le cas de la voltammétrie) de manière à provoquer l'oxydation/réduction de composés électroactifs (*F. Gonon et al., 1978; F. Gonon et al., 1978; Gonon et al., 1980*). Il en résulte des courants faradiques pouvant être détectés de manière à doser différents composés oxydoréductibles. Les monoamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline, sérotonine et histamine) étant des composés oxydables, les techniques électrochimiques se sont révélées de précieux outils à l'étude de l'exocytose de ces neurotransmetteurs (*Alvarez de Toledo et al., 1993; Bruns et Jahn, 1995; Chen et Ewing, 1995; Chen et al., 1994; Leszczyszyn et al., 1990; Pothos et al., 1998; Wightman et al., 1991; Zhou et al., 1996*). Elles présentent en effet d'excellentes résolutions temporelles (de l'ordre de la ms pour l'ampérométrie et de 100 ms pour la voltammétrie) rendant compatible avec l'étude des cinétiques rapides de libération/recapture de la DA (*Robinson et al., 2008*). La résolution spatiale est également bonne, le faible diamètre des électrodes permettant une implantation précise dans les structures, avec un minimum de perturbations locales. Elles sont en revanche moins sensibles et spécifiques que l'HPLC (moins bonne discrimination des composés oxydés), et ne permettent généralement pas de mesurer les niveaux de base de DA, servant plutôt à mesurer la libération évoquée, bien que des variations récentes de la technique de voltammétrie puissent pallier ce défaut (*Yee et al., 2019*) et que l'ampérométrie puisse également enregistrer des événements spontanés de fusion de vésicules (libération quantique).

La technique de voltammétrie cyclique a ainsi pu être utilisée pour détecter et étudier la libération somatodendritique évoquée dans la SNc et VTA (*Rice et al., 1994; Iravani et al., 1996; Cragg et al., 1997; Cragg et Greenfield, 1997; Chen et Rice, 2001; John et al., 2006; Patel et al., 2009; Ford et al., 2010; Chen et al., 2011*), et spontanée dans la SNc (*Yee et al., 2019*), tandis que l'ampérométrie a été utilisée pour étudier la libération quantique de DA au niveau des somas des neurones dopaminergiques (*Jaffe et al., 1998; Kim et al., 2008*).

L'essentiel des connaissances que nous avons sur la libération somatodendritique de DA provient de l'utilisation de ces techniques électrochimiques, qui se complètent dans leurs

avantages et limitations. Il est toutefois à noter que le développement récent de nouvelles méthodes de détection/mesure de la DA pourrait dans un futur proche aider à la compréhension du système dopaminergique au niveau physiologique et pathologique. Citons l'utilisation de mesures indirectes via l'activation des effecteurs des récepteurs dopaminergiques. Le groupe de Williams et ses collègues fut pionnier dans l'utilisation des courants issus de l'autorécepteur D2 comme « bio-senseur » pour la libération évoquée de DA dans la SNc et VTA (*Beckstead et al., 2007; Beckstead et Williams, 2007; Ford et al., 2010; Courtney et al., 2012; Ford, 2014*). La libération de DA et l'activation des récepteurs D2 conduit en effet à une activation de canaux potassiques à rectification entrante (*G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺, GIRK*) générant ainsi des courants inhibiteurs postsynaptiques (*D2-dependent inhibitory postsynaptic currents, D2-IPSCs*) mesurables par une approche de patch clamp. Il convient de noter que la nécessité d'utiliser un cocktail d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques pour pouvoir isoler les courants D2-IPSCs (*Beckstead et al., 2004*), empêche l'utilisation de cette méthode pour étudier les mécanismes de régulation de la libération STD par les projections synaptiques sur les neurones dopaminergiques. Notons également que cette approche est dépendante du neurone dopaminergique enregistré. Comme nous l'avons vu en introduction, il existe des différences importantes dans les niveaux d'expression des canaux GIRK (notamment entre les tiers dorsal et ventral du mésencéphale) qui pourraient influencer l'amplitude des courants D2-IPSCs détectés.

L'utilisation de rapporteurs cellulaires, comme les CNiFERs (*Cell-based neurotransmitter fluorescent engineered reporters*) est également possible et repose sur la transplantation de cellules HEK293 exprimant de façon constitutive les récepteurs dopaminergiques et un indicateur calcique, de manière à coupler les voies de signalisation intracellulaire de la DA avec des changements de fluorescences mesurables (*Muller et al., 2014*). Malgré une grande sensibilité, le fait que cette approche nécessite la transplantation de cellules fait qu'il n'est possible de mesurer que la transmission volumique de DA. La méthode TANGO permet quant-à-elle de mesurer la libération endogène de DA en couplant la voie de signalisation de la β -arrestine à l'expression de gènes rapporteurs (*Barnea et al., 2008; Inagaki et al., 2012; Lee et al., 2017*). Dans l'ensemble, bien que ces approches présentent d'excellentes sensibilité et spécificité, le temps long d'amplification du signal (de quelques secondes à quelques heures) ne permet pas de mesurer les changements rapides et physiologiquement pertinents de la signalisation dopaminergiques, ce qui limite leur utilisation.

Récemment, le développement de techniques d'imagerie utilisant des senseurs dopaminergiques génétiquement encodés pourrait pallier à ces problèmes. Les senseurs GRAB_{DA} (*G protein-coupled receptor [GPCR]-activation-based DA*) (Sun et al., 2018) et dLight (Patriarchi et al., 2018) ont été développés en couplant une protéine verte circulaire permutée (cpEGFP) à un récepteur dopaminergique humain de sorte que son activation et son changement de conformation puisse activer la fluorescence de la GFP, permettant ainsi une détection directe, rapide, sensible et spécifique de la DA extracellulaire. Ces senseurs permettent de mesurer en temps réel la DA endogène que ce soit dans des tranches de cerveaux ou *in vivo*. Enfin, ils pourraient permettre une plus grande démocratisation de la recherche sur le système dopaminergique, les techniques électrochimiques nécessitant souvent un équipement précis et des compétences spécialisées pour donner des résultats optimaux. Il est toutefois à noter qu'à l'heure actuelle, il est encore incertain si ces senseurs ont la même localisation que leurs récepteurs dopaminergiques natifs.

1.3.2. Caractéristiques de la libération somatodendritique de dopamine

1.3.2.1. Dépendance envers l'activité électrique

La tétradotoxine (TTX) est une neurotoxine de choix pour l'étude de la dépendance de la libération des neurotransmetteurs envers l'activité électrique, par sa capacité à bloquer de manière très sélective le pore des canaux sodiques voltage-dépendants impliqués dans la phase ascendante du potentiel d'action, empêchant ainsi la conduction de l'influx nerveux. Elle fut ainsi utilisée dès les années 70 dans les expériences de *push pull canula* sur chat anesthésié (Nieoullon et al., 1977). Surprenamment, tandis que la libération terminale était inhibée par la TTX, il fut constaté que celle-ci augmentait au sein de la SNc. Ce résultat fut donc interprété par le fait que les canaux sodiques ne sont pas impliqués dans la libération somatodendritique, d'autant que des pics électriques dendritiques résistants à la TTX ont par la suite été décrits (Wong et al., 1979; Fukuda and Kameyama, 1980; Cheramy et al., 1981).

Par la suite, différentes études de microdialyse intracérébrale ont démontré au contraire la sensibilité de la libération somatodendritique de DA à la TTX (Kalivas et al., 1989; Robertson et al., 1991; Santiago et al., 1992; Westerink et al., 1994; Heeringa et Abercrombie, 1995). Cette différence avec le résultat original est probablement due à la méthodologie employée. Nieoullon et al., ont mesuré la libération de ³H-dopamine nouvellement synthétisée à partir de ³H-tyrosine

contenue dans le milieu de perfusion et ont réalisé les mesures quelques heures après l'implantation des canules. Or il a été montré que la libération de DA en microdialyse n'est que partiellement sensible à la TTX dans les premières heures suivant l'implantation et que l'augmentation des niveaux de DA vu par *Nieoullon et col.*, pourrait n'être due qu'aux dommages occasionnés par l'implantation de la canule et par le mode de perfusion rapide de la technique de *push pull canula* (*Westerink et al.*, 1987; *Westerink et De Vries*, 1988; *Santiago et Westerink*, 1990).

Par ailleurs, la sensibilité de la libération somatodendritique de DA à la TTX fut également établie *in vitro*, en culture par HPLC (*Fortin et al.*, 2006) et par dosage radiologique de la ³H-DA (*Mendez et al.*, 2011), et *ex vivo* sur tranche par voltammétrie cyclique (*Cragg et Greenfield*, 1997), HPLC (*Elverfors et al.*, 1997) et par patch clamp et mesure des D2-IPSCs (*Beckstead et al.*, 2004). Ces observations suggèrent donc que la libération de DA au niveau STD peut survenir par un mécanisme d'exocytose dépendant de l'activité électrique des neurones dopaminergiques.

Il convient cependant d'établir une distinction entre la libération phasique (évoquée ou stimulée) et la libération tonique (spontanée ou basale) de DA. En effet, différentes études ont montré que la libération STD tonique de DA est moins dépendante des canaux sodiques voltage-dépendants que la libération phasique. Ainsi, certains courants D2-IPSCs spontanés ne sont pas affectés par le blocage des canaux sodiques (*Gantz et al.*, 2013), et la fréquence des événements quantiques mesurés par ampérométrie est seulement réduite de moitié (*Kim et al.*, 2008). Par ailleurs, la fréquence des événements ampérométriques et des D2-IPSCs déclenchés par la libération spontanée de DA (< 0,1 Hz) est significativement inférieure à la fréquence de décharges des neurones de la SNc (2-5 Hz), ce qui pourrait suggérer qu'une partie de la libération quantique de DA n'est pas directement associée aux potentiels d'action (*Jaffe et al.*, 1998; *Kim et al.*, 2008; *Gantz et al.*, 2013). De plus, les études en culture indiquent également que l'inhibition des canaux sodiques par la TTX n'abolit pas complètement la libération STD de DA (*Fortin et al.*, 2006; *Mendez et al.*, 2011) et l'infusion locale de TTX *in vivo* par microdialyse réduit les concentrations extracellulaires de DA de seulement 60% (*Sarre et al.*, 2004). Enfin, il a été montré récemment par une approche modifiée de voltammétrie cyclique par adsorption (*fast-scan controlled-adsorption voltammetry, FSCAV*), permettant de détecter la concentration extracellulaire basale (non stimulée) de DA dans la SNc de rat, que celle-ci n'est pas dépendante des potentiels d'action (n'est pas sensible à la TTX) et ne corrèle pas avec la fréquence de décharge spontanée des neurones de la

SNC (*Yee et al., 2019*). La libération évoquée ayant été montrée comme étant abolie par la TTX (*Cragg and Greenfield, 1997; Beckstead et al., 2004*), cela suggère que ces deux processus pourraient être régulés par des mécanismes différents.

1.3.2.2. Dépendance envers le calcium

L'examen de la dépendance envers l'activité électrique (potentiels d'action) de la libération STD de DA a permis de mettre en évidence que si la libération spontanée n'était que peu dépendante des courants sodiques, la libération évoquée, elle, l'est beaucoup plus. L'observation de ces deux modes de libération pose la question de leur nature exocytotique et donc amène à questionner le rôle joué par le calcium et par les conductances calciques dans ce processus, étant le signal déclencheur habituel de l'exocytose.

1.3.2.2.1. Conductances calciques

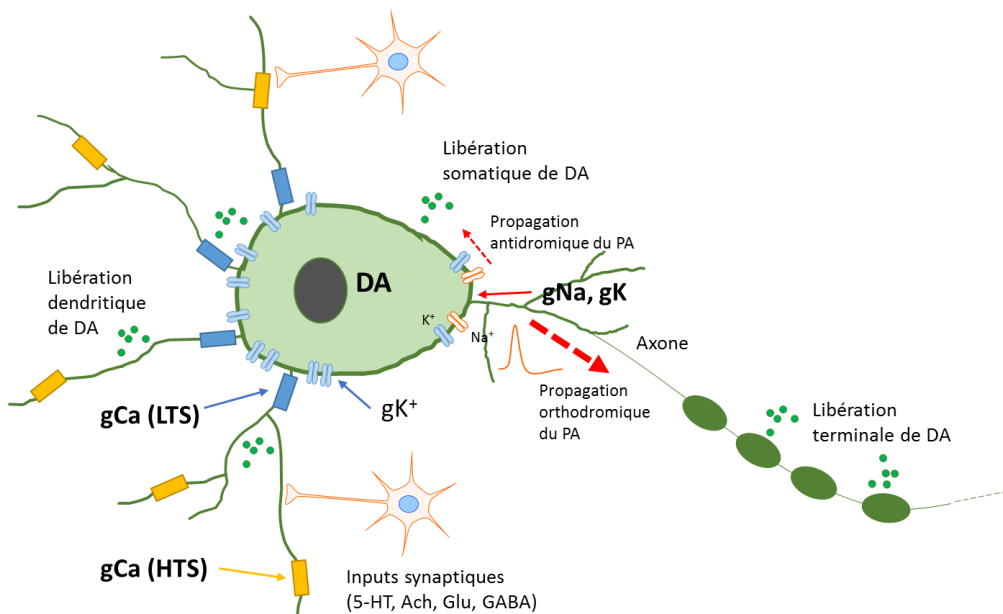
L'examen électrophysiologique des neurones dopaminergiques de la SNC a permis de révéler que ces derniers, en plus de leur conductance sodique responsable des potentiels d'action, présentent également deux conductances calciques, capables de générer des potentiels d'action calciques (résistantes à la TTX et sensibles au cobalt) (*Llinás et al., 1984*). Une première conductance, à bas seuil (*low threshold spike, LTS*) est inactivée au potentiel de repos et s'active par hyperpolarisation membranaire. La seconde, à haut seuil (*high threshold spike, HTS*) est responsable des pics électriques au niveau des dendrites, que l'on observe également dans d'autres types de neurones. De fait, la libération STD par les neurones dopaminergiques dépendrait non seulement de leur capacité de *pacemaker* (capacité à générer des potentiels d'action), mais également d'autres voies de régulation de l'excitabilité de la membrane, c'est-à-dire via les différentes projections afférentes que reçoivent les neurones dopaminergiques. Bien que les mécanismes exacts ne soient pas connus, on sait par exemple que la sérotonine et l'acétylcholine, libérés dans le mésencéphale ventral, peuvent augmenter ces conductances calciques et donc influencer sur la libération STD de DA (*Nedergaard et al., 1988, 1989*).

Un modèle peut ainsi se dégager de ces études portant sur les conductances voltage-dépendantes dans les neurones de la SNC (et à fortiori VTA) (**figure 13**). Les neurones dopaminergiques présentent une composante sodique située au niveau de l'axone et une composante calcique au niveau des dendrites (*également décrit par Grace, 1990; Grace et Bunney,*

1995). Des conductances Na^+ et K^+ sont détectables à la membrane somatique. La conductance calcique LTS, qui est inactivée au repos, est probablement localisée dans la partie proximale de l'arborisation dendritique, tandis que la conductance calcique HTS est plus probablement localisée dans sa portion la plus distale. Des canaux potassiques insérés entre ces deux types de conductances les isoleraient l'une de l'autre de sorte qu'on aurait deux compartiments fonctionnels relativement indépendants.

Les neurones dopaminergiques pourraient alors selon ce modèle fonctionner de deux façons. Tout d'abord, la dépolarisation au niveau des corps cellulaires génère des potentiels d'action rapides qui n'envahissent pas très efficacement les dendrites, mais servent à activer leurs axones. Ceci est d'ailleurs soutenu par les études ayant montré que la libération STD de DA était relativement insensible à la propagation antidromique des potentiels d'action (*Chiodo et al., 1984; Nissbrandt et al., 1985*). En revanche, lorsque le soma est hyperpolarisé, la conductance LTS peut s'activer, qui en retour active la conductance HTS le long de l'arborisation dendritique. Cette dernière peut également être activée en réponse à des inputs synaptiques (sérotonine, acétylcholine...), qui n'implique ni les conductances LTS ou somatique. Ainsi les conductances calciques dans les dendrites pourraient participer pour beaucoup à la libération STD de DA dépendante du calcium. Par ailleurs, la capacité de ces courants calciques à se produire en présence ou en absence de potentiels d'action dépendant du sodium expliquerait la difficulté de corrélérer les changements de libération STD de DA avec les changements de fréquence de décharge des neurones.

Figure 14. – Modèle de conductances ioniques dans la SNc et leur probable distribution dans l'espace.



Au niveau somatique : conductances générant le potentiel d'action (gNa et gK). Au niveau des dendrites proximales : la conductance générant des pics calciques à bas seuil (LTS), la conductance K^+ calcium dépendant et probablement la conductance K^+ des canaux à rectification entrante GIRK. Au niveau des dendrites distales : la conductance générant des pics calciques à haut seuil (HTS). Les conductances calciques LTS et HTS seraient toutes deux impliquées dans la libération STD de DA. Adapté de Llinás et al., 1984.

1.3.2.2.2. Dépendance envers le calcium extracellulaire

La dépendance de la libération STD de DA vis-à-vis du calcium extracellulaire fut établie dès sa mise en évidence par Geffen en 1976, puis confirmée à de nombreuses reprises par la suite, essentiellement par les études en voltammétrie cyclique, en modifiant les concentrations extracellulaires de calcium dans les milieux d'incubation (Geffen et al., 1976; Beart and McDonald, 1980; Kelly et al., 1985; Bull et al., 1990; Rice et al., 1994; Westerink et al., 1994; Elverfors et al., 1997; Rice et al., 1997; Bergquist et al., 1998; Chen and Rice, 2001; Beckstead et al., 2004; Fortin et al., 2006; Beckstead et al., 2007; Ford et al., 2010; Mendez et al., 2011).

Une propriété intéressante s'est cependant dégagée de certaines études : la libération somatodendritique évoquée de DA présente une sensibilité au calcium différente de la libération axonale (figure 14). En effet, chez le cobaye, elle persiste en condition où les niveaux

extracellulaires de calcium sont faibles, à des niveaux où la libération terminale est abolie (0 et 0.5 mM de calcium)(*Rice et al., 1994, 1997; Hoffman et Gerhardt, 1999; Chen et Rice, 2001; Chen et al., 2011*). La libération évoquée dans des tranches de SNc et VTA est apparue déjà à plus de la moitié de son niveau maximal en condition 0 calcium et maximal à 1.5 mM. En comparaison, la libération terminale a continué d'augmenter entre 1.5 et 3 mM de calcium. Une incubation prolongée dans du milieu sans calcium et contenant en plus un chélateur du calcium (EGTA)(*Rice et al., 1997, 1994*) ou via l'utilisation d'un bloqueur non sélectif des canaux calciques (100 μ M de cadmium)(*Patel et al., 2009*) sont nécessaires pour arriver à bloquer complètement la libération STD de DA.

Cette différence de sensibilité entre libérations STD et terminale pourrait être due à des différences de modulation de la libération de DA via des projections GABAergiques et glutamatergiques (voir section 1.3.5.2). Par exemple, les projections GABAergiques vers la SNc sont connues pour inhiber la libération évoquée de DA, tandis que la régulation GABAergique de la libération de DA dans le striatum est minimale, laissant une place plus prépondérante à la transmission cholinergique qui favorise la libération (*Chen et Rice, 2002; Threlfell et al., 2012*). Ainsi, des augmentations de la libération de GABA dans la SNc de manière dépendante du calcium pourraient s'opposer à des augmentations de la libération de DA, bloquant ainsi la libération évoquée. Cette hypothèse pouvait s'appliquer dans l'étude initiale du groupe de Rice (*Chen et Rice, 2001*) où les auteurs ont utilisé un protocole de stimulation en train dans la SNc, pouvant de fait déclencher la libération simultanée de glutamate et GABA modulant en retour la libération de DA (*Chen et Rice, 2002; Avshalumov et al., 2003; Patel et al., 2009*). Cependant, dans une étude plus récente du même groupe (*Chen et al., 2011*), les auteurs ont eu recours à un protocole de stimulation unitaire, qui imite des potentiels d'action unique pour évoquer la libération de DA, sans modulation simultanée via la libération de glutamate et GABA (*Chen et al., 2006*), et ils retrouvèrent les mêmes résultats de calcium-dépendance somatodendritique vs axonale (**figure 15**).

Les auteurs étendirent également leurs observations à la VTA qui présente une dépendance au calcium unique, avec une libération évoquée détectable en faible concentration de calcium, de manière analogue à la SNc, mais une dépendance au calcium exponentielle quand la concentration extracellulaire de calcium augmente (>1 mM), comme observé dans le striatum dorsal et le Nac. Cette différence indique que la VTA pourrait présenter une libération somatodendritique et

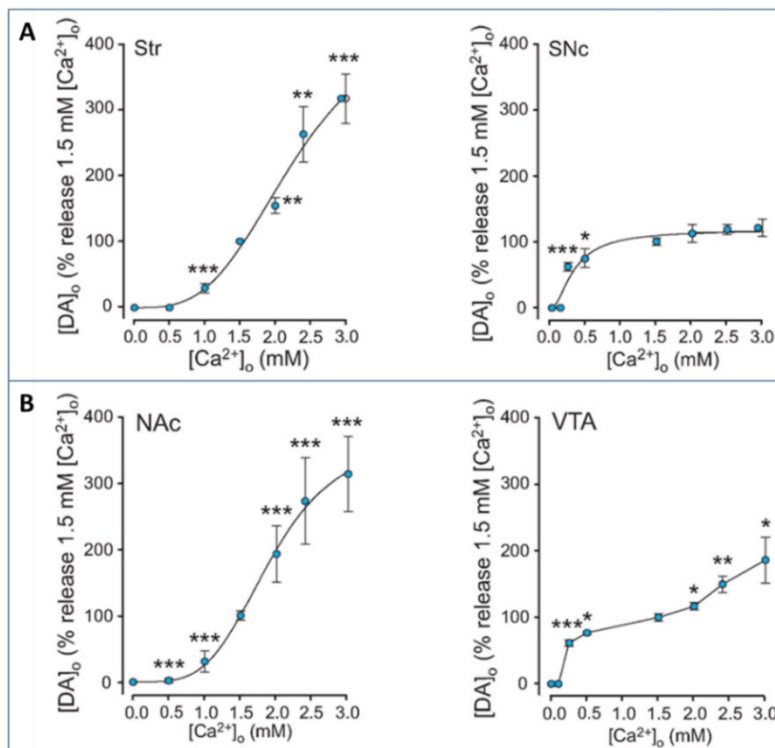
axonale, en accord avec la microanatomie de cette région qui inclut les corps cellulaires des neurones dopaminergiques, leurs dendrites, mais également un petit contingent d'axones dopaminergiques. En effet, on retrouverait dans la VTA certains sites de libération provenant de collatérales des neurones dopaminergiques, ainsi que des projections synaptiques mineures provenant de la SNc (*Deutch et al., 1988; Bayer and Pickel, 1990*). La SNc au contraire ne présenterait pas de sites axonaux de libération de dopamine en provenance de collatérales, et ainsi la libération de DA à ce niveau serait purement somatodendritique selon certains auteurs (*Juraska et al., 1977; Wassef et al., 1981; Matsuda et al., 2009*). À noter toutefois que Prensa et Parent (*2001*), après reconstruction de l'arborisation axonale de neurones de la SNc marqués individuellement, ont noté qu'un faible contingent (<10%) présente quelques collatérales axonales, qui couvrent néanmoins un territoire important de la SNc et SNr. Il convient aussi de noter que les études neuroanatomiques en ME sont limitées et peu quantitatives. Elles reposent de plus sur l'utilisation du marqueur TH qui présente l'inconvénient d'être aussi exprimé dans les terminaisons des neurones noradrénergiques, également connus pour innover le mésencéphale ventral, notamment la VTA (*Jones et Moore, 1977; Collingridge et al., 1979; Mejías-Aponte et al., 2009*).

À ces différences anatomiques s'ajoutent des différences biochimiques. Le tiers dorsal des neurones dopaminergiques de la SNc et la VTA sont enrichis en protéines tampons du calcium, la calbindine-D(28k) et la calrétinine, tandis que la majorité du tiers ventral de la SNc ne présente pas ces protéines (*Sanghera et al., 1994*). Or, cette différence a été impliquée dans la dépendance au calcium de la libération STD, car de hauts niveaux de calbindine dans les neurones de la VTA participent à la régulation de la probabilité de leur libération de DA, celle-ci se trouvant diminuée en comparaison des neurones de la SNc exprimant peu, ou pas, la calbindine (*Pan et Ryan, 2012*). Des niveaux élevés de protéines tampons du calcium ont d'ailleurs été associés à un avantage neuroprotecteur des neurones de la VTA comparé au tiers ventral des neurones de la SNc qui dégénère plus spécifiquement dans des modèles de maladie de Parkinson (*Liang et al., 1996*). Les études du groupe de Rice (*Chen et Rice, 2001; Chen et al., 2011*) ne précisant pas la localisation précise de leurs enregistrements en voltammétrie dans la SNc (tiers ventral ou dorsal), il est donc possible que ces différences biochimiques entre SNc et VTA puissent participer à leur sensibilité différente vis-à-vis du calcium.

Enfin, à la fois dans la SNc et la VTA, la libération STD de DA survenant à basse concentration de calcium pourrait refléter des sensibilités différentes dans les mécanismes de libération calcium-dépendant, ce qui inclut les protéines de fusion impliquées dans l'exocytose (voir section 1.3.6).

Il convient également de noter que des différences vis-à-vis de l'entrée de calcium chez les espèces de rongeurs ont été rapportées. Certains auteurs ont observé une dépendance identique des niveaux extracellulaires de calcium pour la libération de DA dans la SNc, VTA et striatum, chez le rat et la souris (Ford et al., 2010; Courtney et al., 2012).

Figure 15. – Dépendance au calcium des voies nigrostriée et mésolimbique chez le cobaye.



(A) Dépendance au calcium de la libération de DA dans la voie nigrostriée (B) Dépendance au calcium de la libération de DA dans la voie mésolimbique. Les pics de DA évoquée par stimulation unitaire (single pulse) à différentes $[Ca^{2+}]_e$, en voltammétrie sur tranches (striatum, substance noire pars compacta, noyau accumbens core et aire tegmentaire ventrale) de cobaye, ont été normalisés par rapport à la libération obtenue à 1.5 mM de calcium. Que ce soit dans la SNc ou la VTA, une moins grande sensibilité au calcium extracellulaire a été constatée pour la libération STD que pour la libération axonale. Issue de Chen et al., 2011.

1.3.2.2.3. *Rôle des canaux calciques voltage-dépendant (VGCCs)*

L'influence des niveaux de calcium extracellulaire sur la libération STD de DA soulève ainsi la question de la nature des canaux calciques voltage-dépendant (*voltage-gated Ca²⁺ channels, VGCCs*) qui pourraient être impliqués dans ce processus. La démonstration la plus évidente que l'entrée de calcium est nécessaire a été initialement fournie par l'utilisation de bloqueurs non spécifiques des VGCCs comme le cobalt (Co²⁺), le nickel (Ni²⁺) et le cadmium (Cd²⁺), qui inhibent la libération STD de DA (*Jaffe et al., 1998; Beckstead et al., 2004; Kim et al., 2008; Patel et al., 2009*). Pour le reste, il n'existe pas de consensus quant à l'implication de canaux calciques voltage-dépendant spécifiques à la libération STD. Dans les neurones, ces derniers se présentent avec différents sous-types : les types -L, N, P, Q, T et R, pouvant être distingués sur la base de leur seuil d'activation, leur conductance, leur vitesse d'inactivation et leur sensibilité pharmacologique à différentes drogues. Comme le montre le **tableau 3** suivant, la variété des modèles animaux, techniques de détection de la DA, protocoles de stimulation et doses des différentes drogues utilisées, pourraient être la cause des grandes différences observées quant à l'effet du blocage des VGCCs sur la libération STD de DA. Ainsi, ces données semblent effectivement indiquer une implication des VGCCs, mais la nature exacte des canaux impliqués est encore soumise à débat.

Une vue d'ensemble de cette littérature (**tableau 3**) permet néanmoins de constater que parmi les études ayant porté sur la libération évoquée (stimulée) STD de DA, le groupe de Rice en 2006 est le seul n'ayant vu absolument aucun effet des différents types de VGCCs, y compris en utilisant un cocktail d'inhibiteurs. C'est par ailleurs le seul groupe à avoir procédé à des mesures de la libération STD via des stimulations électriques unitaires et non des trains de stimulations, un protocole permettant de s'affranchir des modulations exercées par la libération de GABA et glutamate en provenance d'autres neurones (*Chen et al., 2006*). Ces possibles effets indirects pourraient également survenir dans les études portant sur la libération spontanée (non simulée) de DA, rendant ainsi l'interprétation des résultats difficile.

Tableau 3. – Évaluation de l'effet des VGCCs sur la libération STD de dopamine.

Modèle	Méthode de détection	Stimulation	Bloqueur (dose)	VCGG impliqué	Effet	Référence
Souris adulte, tranche de mésencéphale	Patch clamp (D2-IPSC)	Train (1-10 pulses, 40 Hz, 500 µs)	ω-AgaTx (100–200 nM)	Type P/Q	Sans effet	<i>Beckstead et al., 2004</i>
			ω-CgTx (1-6 µM)	Type-N	▼ IPSC	
			Nimodipine (3 µM)	Type-L	Sans effet	
			Cd ²⁺ (300 µM)	Tout type	IPSC abolie	
Neurones DA dissociés de tranches de SNc de rats (P9-P14)	Ampérométrie (+600 mV)	Fréquence d'évènements spontanés	Co ²⁺ ou Ni ²⁺ ou Cd ²⁺ (100 µM)	Tout type	▼ 50%	<i>Kim et al., 2008</i>
			Cocktail	Type-L, T, N et P/Q	▼ 66%	
		KCl (60 mM)	Nifedipine (10 µM)	Type-L	▼ 53%	
			Mibefradil (10 µM)	Type-T	▼ 33%	
			ω-CgTx (200 nM)	Type-N	Sans effet	
			ω-AgaTx (200 nM)	Type-P/Q	Sans effet	
			Cocktail	Tout type	▼ 65%	
Cobayes, jeunes adultes, tranches de SNc	Voltammétrie (-07V;+1.3V à 800 V/s)	Train 30 pulses 10 Hz (0.1ms, 0.6–0.8 mA)	Cd ²⁺ (100 µM)	Tout type	[DA]o abolie	<i>Patel et al., 2009</i>
Cobayes, jeunes adultes, tranches de SNc	Voltammétrie (-07V;+1.3V à 800 V/s)	Pulses uniques (1ms, 0.6–0.8mA)	ω-CgTx (100 nM)	Type-N	Sans effet	<i>Chen et al., 2006</i>
			ω-AgaTx (15 nM et 200 nM)	Type-P/Q	Sans effet	
			Ni ²⁺ (100 µM)	Type-T et R (non spécifique)	Sans effet	
			SNX-482 (100 nM)	Type-R	Sans effet	
			Nifedipine (20 µM)	Type-L	Sans effet	
			Cocktail (tous)	Tout type	Sans effet	
Rats adultes, SNr	Microdialyse in vivo dans SNr	Mesure directe des concentrations extracellulaires de dopamine	Nimodipine (1,10 et 100 µM)	Type-L	Sans effet	<i>Bergquist et al., 1998</i>
			ω-CgTx (0.1, 1 et 10 µM)	Type-N	Sans effet (1-10µM) ▲ [DA]o (10 µM)	
			ω-AgaTx (0.1, 1 et 10 µM)	Type-P/Q	Sans effet (1-10µM) ▲ [DA]o (10 µM)	
			ω-CgTx et ω-AgaTx (10 µM)	Type N et P/Q	▲ [DA]o	
			Néomycine* (0.005, 0.05 et 0.5 mM)	Type P/Q, N et L	▼ [DA]o	
			Isradipine (30 nM)	Type-L (Cav1.3)	▼ [DA]extra 20%	

Tableau 3. – (suite) Évaluation de l'effet des VGCCs sur la libération STD de dopamine.

Modèle	Méthode de détection	Stimulation	Bloqueur (dose)	VCGG impliqué	Effet	Référence
Rats adultes, SNr	Microdialyse in vivo dans SNr	Mesure directe des concentrations extracellulaires de dopamine	Mibefradil (1, 10 et 100 μM)	Type-T	\blacktriangle [DA] _o (1 μM) \blacktriangledown [DA] _o (100 μM)	<i>Bergquist et Nissbrandt, 2003</i>
			SNX-482 (0.1, 1 et 10 μM)	Type-R	\blacktriangledown [DA] _o	
			Ni^{2+} (40 ou 80 μM)	Type-T et R	\blacktriangle [DA] _o	
Cobayes adultes (femelles), Tranches de SNe	HPLC des milieux perfusés	KCl (30, 45 et 60 mM)	Nifedipine (20 μM)	Type-L	Sans effet	<i>(Elverfors et al., 1997)</i>
			ω -CgTx (0.1 et 0.5 μM)	Type- N	Sans effet	
			Penfluridol (5 μM)	Type-T (non spe.)	Sans effet	
			Ni^{2+} (20 μM)	Type-T et R	Sans effet	
			Amiloride (1 mM)	Type-T (non spe.)	\blacktriangledown [DA] _o 60%	
			Néomycine* (350 μM)	Type-P (non spe.)	DA] _o abolie	
			ω -AgaTx	Type-P/Q	DA] _o abolie	
Souris (P0), Neurones DA en culture (21 jours)	Dosage radiologique de la ^3H -DA (milieu 0.5 mM calcium)	Libération spontanée de dopamine	Nifedipine (100 nM)	Type-L	Sans effet	<i>Mendez et al., 2011</i>
			ω -CgTx (0.1 et 0.5 μM)	Type- N	\blacktriangledown [DA] _o	
			ω -AgaTx	Type-P/Q	\blacktriangledown [DA] _o	
Rats (P21-23), tranches de SNe	FSCAV	Libération spontanée de dopamine	Nifedipine (10 μM)	Type-L	\blacktriangledown [DA] _{extra} 16%	<i>Yee et al., 2019</i>

* la néomycine est non spécifique ; elle inhibe la formation d'IP3 et donc la mobilisation des stocks intracellulaire de calcium.

ω -CgTx : ω -conotoxine GVIA

ω -AgaTx : ω -agatoxine IVA

1.3.2.2.4. *Dépendance envers le calcium intracellulaire*

Comme vu en introduction, la libération de neurotransmetteurs est typiquement déclenchée par une élévation des niveaux intracellulaire de calcium $[Ca^{2+}]_i$, causée par un influx de calcium extracellulaire après ouverture des canaux calciques voltage-dépendant. Cependant, certaines études ont montré que la libération STD dans la SNc persiste à des niveaux submillimolaires de calcium extracellulaire (*Hoffman et Gerhardt, 1999; Chen et Rice, 2001; Fortin et al., 2006*) et est résistante au blocage des VGCCs (à des concentrations inhibant la libération axonale) (voir **tableau 3**). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que cette forme de libération pourrait requérir une entrée minimale de calcium dans les neurones, et/ou mobiliser les stocks intracellulaires, qui agirait comme un système d'amplification rendant possible l'exocytose (*Ludwig et al., 2002*).

Le réticulum endoplasmique (RE) apparaît comme un important site de stockage du calcium intracellulaire. Présent dans tous les types de neurones, il forme un système interconnecté et continu de tubules et saccules qui s'étendent de l'enveloppe nucléaire jusqu'aux axones et terminaisons axonales, ainsi que les dendrites et épines dendritiques (*Bayer et Pickel, 1990; Verkhratsky, 2005*). Il a été montré que dans les neurones dopaminergiques de la SNc, le calcium intracellulaire des stocks du RE somatique peut se propager jusqu'aux dendrites via une diffusion luminale rapide (*Choi et al., 2006*). Par ailleurs, des protéines impliquées dans la mobilisation des stocks de calcium du RE ont été identifiées en IHC dans les somas et dendrites proximales de neurones dopaminergiques de la SNc de cobaye (*Patel et al., 2009*). Cela inclut la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique-endoplasmique 2 (SERCA 2), qui séquestre le calcium cytoplasmique au sein du RE, et les récepteurs de l'inositol trisphosphate (IP₃Rs) et de la ryanodine (RyRs), qui intervenant dans le relargage du calcium hors du RE. Par ailleurs, l'utilisation de la voltammétrie sur tranche de SNc de cobaye (avec stimulation en train) et une approche pharmacologique visant à bloquer ces protéines a permis de montrer leur rôle dans la libération STD de DA (*Patel et al., 2009*).

Il est apparu dans cette étude que les RyRs se regroupent à la membrane plasmique des neurones DA, de manière à être prêt à s'activer par une entrée initiale de calcium, amplifiant de fait la libération STD de DA lorsque la concentration extracellulaire de calcium est physiologique (1.2 mM), bien que cette amplification soit perdue à de plus hautes concentrations extracellulaires de

calcium (2.4 mM). Cela pourrait suggérer un mécanisme de maintenance de la libération STD dans des conditions où l'influx de calcium dans les neurones est faible (libération spontanée de DA).

L'amplification de la libération STD pourrait quant à elle survenir en aval : le blocage par la 2-APB des IP₃Rs diminue ainsi la libération de DA, tandis que l'activation des RyRs par l'action directe de la caféine l'augmente. Par ailleurs, le système glutamatergique pourrait également jouer un rôle à ce niveau, les récepteurs métabotropes de type 1 (mGluR1) étant couplés à la production d'IP₃. L'utilisation d'un agoniste (DHPG) des mGluR1 a ainsi conduit à une augmentation de la libération STD de DA, tandis qu'un antagoniste (CPCCOEt) l'a inhibée.

Enfin, l'inhibition du SERCA (par l'acide cyclopizonique) a également diminué la libération STD de DA évoquée dans la SNc, indiquant un rôle fonctionnel des stocks de calcium du RE dans ce processus (*Patel et al., 2009*). Ce rôle a également été souligné pour la libération spontanée (non stimulée) dans des tranches de SNc de rats, au moyen de la technique de FSCAV (*Yee et al., 2019*). Il est cependant à noter une fois de plus des différences selon le modèle utilisé. Dans un modèle de culture primaire de neurones dopaminergiques, Mendez et ses collègues (*2011*) ont évalué la libération STD de DA spontanée par dosage radiologique de la ³H-DA en condition 0.5 mM de calcium, une dose permettant théoriquement d'abolir la libération terminale tout en préservant une majorité de la libération STD (*Chen et Rice, 2001; Fortin et al., 2006*). Dans ce modèle, le blocage du SERCA (par la thapsigargine) n'a pas engendré de changement dans la libération STD de DA.

Les données semblent néanmoins dans l'ensemble indiquer que la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium pourrait agir comme régulateur positif de la libération STD de DA. Des élévations globales de [Ca²⁺]_i pourraient, par exemple, conduire à un amorçage vésiculaire accru, comme démontré précédemment dans les cellules neurosécrétrices hypothalamiques (*Tobin et al., 2004*).

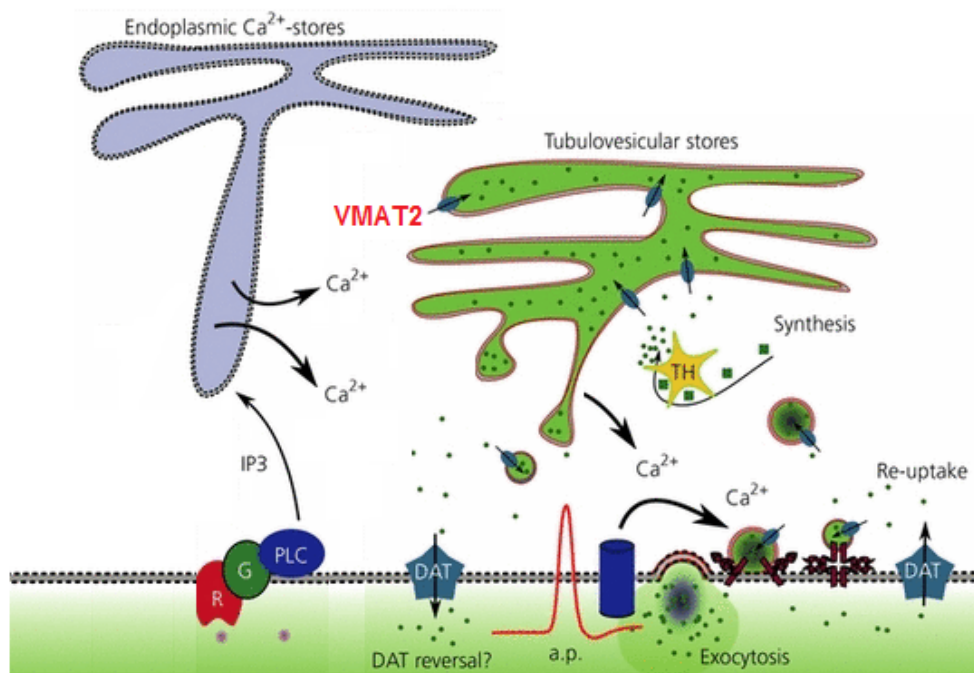
1.3.3. Stockage somatodendritique de dopamine

L'origine subcellulaire de la DA libérée dans la région STD fut questionnée aussi tôt que sa découverte dans les années 70. *Björklund et Lindvall, (1975)* qui démontrèrent la capacité des dendrites à capturer et stocker la DA suggérèrent l'existence de sites de stockages vésiculaires. Bien que la libération vésiculaire de catécholamines puisse survenir en l'absence de synapses, comme

c'est le cas dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale (*Wightman et al., 1991*), il fut constaté que les vésicules sont rares dans le compartiment STD. En effet, les données d'ultrastructure en microscopie électronique indiquent qu'au niveau des terminaisons axonales du striatum la densité vésiculaire est élevée (*Nirenberg et al., 1996a, 1997*), mais qu'elles sont en revanche peu nombreuses dans les somas et les dendrites (*Wilson et al., 1977; Groves and Linder, 1983; Bayer and Pickel, 1990; M. J. Nirenberg et al., 1996*). Certains groupes ont même échoué à détecter la présence de vésicules dans le compartiment STD (*Mercer et al., 1979; Reubi et Sandri, 1979*), remettant en question le fait que la libération STD de DA puisse survenir par exocytose. Cependant, la rareté des vésicules serait compatible avec le fait que, quantitativement, la libération STD de DA est au minimum 10 fois moins importante que la libération terminale (*Robertson et al., 1991; Heeringa et Abercrombie, 1995; Rice et al., 1997; Bergquist et al., 2002*). La quantité de DA libérée par stimulation évoquée semble par ailleurs suivre le patron de densité d'expression de la TH : VTA > SNc médiale > SNc latérale (<< striatum) (*Rice et al., 1997*).

Néanmoins, il fut également proposé que la DA puisse être stockée dans le réticulum endoplasmique et ses « tubulovésicules » associées (sacculles du RE lisse) (*Parizek et al., 1971; Cuello et Kelly, 1977; Mercer et al., 1979; Wassef et al., 1981*), en plus de quelques vésicules d'allure plus classique (*Wilson et al., 1977; Groves et Linder, 1983*) (**figure 16**). Le réticulum endoplasmique apparaît en effet comme pouvant contenir de la DA (*Groves et Linder, 1983; Hattori et al., 1979*). Par ailleurs, les tubulovésicules ont été démontrées comme porteuses du transporteur vésiculaire de la DA VMAT2, de même que certaines membranes limitantes de corps multivésiculaires, possiblement impliqués dans le recyclage des protéines des membranes vésiculaires (*Melissa J. Nirenberg et al., 1996; Witkovsky et al., 2009*). Il convient cependant de noter que ces observations ont été effectuées à l'aide d'un anticorps contre VMAT2 dont la spécificité n'a jamais été validée. De même, la pompe v-ATPase qui établit le gradient de proton nécessaire au transport de la DA par le VMAT2, a également été localisée par IHC au niveau du soma et des dendrites proximales des neurones dopaminergiques (*Witkovsky et al., 2009*).

Figure 16. – Stockage et libération de la dopamine au niveau somatodendritique.



Les dendrites des neurones dopaminergiques contiennent peu de vésicules et la DA est serait potentiellement stockée dans des structures « tubulovésiculaires » ressemblant au réticulum endoplasmique lisse. La relâche de DA peut survenir lorsqu'un potentiel d'action entraîne un influx de calcium extracellulaire et/ou une mobilisation des stocks intracellulaires de calcium contenus dans le RE. La DA est synthétisée par la tyrosine hydroxylase (TH) et peut être transportée dans des structures de stockage par le transporteur vésiculaire VMAT2. Adapté de Bergquist et Ludwig, 2008.

Cependant, le mécanisme par lequel la DA est libérée des tubulovésicules n'est à l'heure actuelle pas connu. Le blocage du VMAT2 conduisant à une diminution de la quantité de DA libérée (Rice et al., 1994; Heeringa and Abercrombie, 1995; Beckstead et al., 2004), peut confirmer son rôle dans le stockage de la DA, mais pas dans l'exocytose vésiculaire en elle-même, puisque VMAT2 se retrouve dans d'autres organelles. Toutefois, des observations intéressantes concernant le métabolisme de la DA ont pu être faites par l'usage de la réserpine qui bloque irréversiblement le VMAT2. Les études de microdialyse qui se sont attachées à évaluer les effets de l'injection systémique de réserpine sur les niveaux tissulaires de DA dans le compartiment STD ont constaté que, effectivement, celle-ci en affecte les niveaux, mais également que la sensibilité à la réserpine apparaît moins grande dans la SNc/VTA que dans le striatum dorsal/Nac (Beart et McDonald,

1980; Elverfors et Nissbrandt, 1991; Heeringa et Abercrombie, 1995). Par ailleurs, l'examen de l'effet de la réserpine dans le temps a révélé que les niveaux tissulaires de DA dans le compartiment STD récupèrent de près de 25% en 24 heures, tandis que ceux dans les régions terminales ne montrèrent aucune récupération après 24 heures (Elverfors et Nissbrandt, 1991; Heeringa et Abercrombie, 1995). Ces données, en addition d'autres études sur le renouvellement de la DA suite au blocage des enzymes de dégradation MAO et COMT (Hallman et Jonsson, 1984; Nissbrandt et Carlsson, 1987), indiquent donc un métabolisme différent au niveau STD comparé aux terminaisons. Celui-ci serait donc caractérisé par une capacité de récupération et un renouvellement (*turnover*) de la DA plus élevé.

1.3.4. Concept de transmission volumique de dopamine dans le compartiment somatodendritique

En raison des caractéristiques anatomiques des neurones dopaminergiques décrites précédemment (faibles voir pas de collatérales axonales dopaminergiques au niveau de la VTA et de la SNc), il semblerait donc que la libération STD de DA soit largement non synaptique. En effet, les études d'ultrastructures indiquent que le DAT et les récepteurs dopaminergiques sont largement extrasynaptiques dans le mésencéphale (Sesack et al., 1994; Yung et al., 1995; M. J. Nirenberg et al., 1996, 1997), y compris les récepteurs D1, localisés sur des terminaisons non dopaminergiques (Cameron et Williams, 1993; Yung et al., 1995). Ces caractéristiques font que la libération STD de DA a été proposée comme disposant d'un mode de neurotransmission par diffusion volumique (Agnati et al., 1992; Rice, 2000; Rice et Cragg, 2008). Selon ce modèle, l'efficacité de la transmission serait régulée par la diffusion de la DA et les caractéristiques de recapture du microenvironnement extracellulaire, avec une contribution négligeable du catabolisme enzymatique de la DA (Cragg et al., 2001; Rice et Cragg, 2008). Dans le mésencéphale ventral, on constate ainsi des variations selon la région considérée. Ainsi, les taux de recapture de la DA apparaissent plus élevés dans la SNr que dans la SNc et VTA, en accord avec le fait que celles-ci disposent d'un plus grand nombre de somas et dendrites (donc plus de DA libérée), et l'on a également constaté une plus grande efficacité de l'inhibition du DAT dans la SNc que dans la VTA (Cragg et al., 1997; Cragg et al., 2001). L'ensemble des données de voltammétrie ont permis au groupe de Rice de modéliser l'influence d'une source de DA produisant une libération qui a été montrée comme suffisante pour activer les récepteurs dopaminergiques (avec une sensibilité

supposée de 10 nM) à une distance allant jusqu'à 20 μm , avec une demi-vie à cette distance de plusieurs centaines de millisecondes (*Cragg et al., 2001*). Ce modèle a par ailleurs montré que la diffusion de la DA plutôt que la recapture est le paramètre le plus déterminant dans le mésencéphale (*revue dans Rice et Cragg, 2008*).

En contraste avec les données initiales du groupe de Rice, le groupe de Williams qui a étudié la libération STD par l'évaluation des courants D2-IPSCs, a montré que ceux-ci semblaient largement indépendants de la diffusion (*Beckstead et al., 2004, 2007; Ford et al., 2009, 2010; Courtney et al., 2012; Gantz et al., 2013*). En effet, chez ce groupe, la concentration de DA exogène requise pour activer des courants D2-IPSCs comparables à ceux observés avec la libération STD évoquée de DA endogène est de l'ordre du micromolaire (*Ford et al., 2009*), loin des niveaux du nanomolaire qui sont attendus pharmacologiquement pour activer les récepteurs dopaminergiques ($EC_{50} \sim 10$ nM; *Rice et Cragg 2008*). Compte tenu du fait que les niveaux extracellulaires de DA chutent rapidement avec la distance du site de libération (*Cragg et Rice, 2004*), ces données indiquent donc que l'activation des récepteurs dopaminergiques nécessiterait d'être synaptique ou au moins pérисynaptique. En accord avec cette idée, les courants D2-IPSCs peuvent être évoqués par stimulation unitaire plutôt que par train de stimulation (*Beckstead et al., 2004; Ford et al., 2009; Gantz et al., 2013*) suggérant que concentrer la DA dans l'espace extracellulaire n'est pas nécessaire à l'activation des récepteurs somatodendritiques. Le déroulement temporel des D2-IPSCs serait ainsi limité par les cinétiques d'activation des récepteurs D2/protéines G/courants GIRK, et non par la durée de la diffusion extracellulaire de DA (*Ford et al., 2009, 2010, 2014*). Très récemment, le groupe de Rice, en utilisant cette fois-ci la méthode de détection des D2-IPSCs, a démontré que la libération STD de neurones unitaires de la SNc est diminuée en appliquant des anticorps anti-canaux sodiques contenus dans la pipette de patch, abolie en appliquant la toxine botulinique A (qui clive SNAP-25) et conclu également que la libération STD de DA dans la SNc auto-inhibe le neurone qui la libère, selon un mode de communication qui serait alors de type autocrine (*Hikima et al., 2021*).

Ces données montrent une fois de plus que l'utilisation de méthodes différentes de détection de la DA peut engendrer des contradictions. L'utilisation de la voltammétrie permet de mesurer la DA qui diffuse à une certaine distance de son point de libération, permettant ainsi d'appréhender le concept de transmission volumique. La mesure des courants IPSCs (spontanés ou évoqués) peut

se faire via une activation des récepteurs D2 situés à des sites proches d'une source de DA et ainsi ils ne dépendraient pas d'une diffusion extensive de la DA (*Hikima et al., 2021*). Il apparaît envisageable que ces résultats ne s'excluent pas l'un l'autre et que les concepts de transmission volumique et transmission de type synaptique coexistent dans le mésencéphale ventral (de même que dans le striatum). Par exemple, la libération tonique (spontanée) de DA a récemment été mesurée dans la SNc de rat à des niveaux de 40-80 nM, qui sont théoriquement suffisants pour activer les récepteurs D2 (*Yee et al., 2019*). Une activation plus extensive des récepteurs dopaminergiques pourrait ensuite survenir lors de la décharge en bouffée des neurones dopaminergiques ou par libération évoquée rendant favorable une plus grande diffusion de la DA.

1.3.5. Régulation de la libération somatodendritique de dopamine

1.3.5.1. Régulation par les autorécepteurs D2

L'inhibition de la libération axonale de DA par les autorécepteurs D2 présynaptiques joue un rôle important dans la régulation des niveaux de DA au niveau du striatum (*Cragg et Greenfield, 1997; Benoit-Marand et al., 2001*). Au niveau du mésencéphale les récepteurs D2 sont également exprimés et localisés directement sur les somas, dendrites et segments initiaux des axones des neurones dopaminergiques de la SNc et VTA (*Sesack et al., 1994; Yung et al., 1995; Lebowitz et al., 2021*). L'inhibition de la libération STD de DA par le D2 a ainsi été documentée dans la SNc et la VTA (*Cragg et Greenfield, 1997*). Dans cette étude, la modulation de la libération STD par les récepteurs D2 était moins marquée dans la VTA, ce qui est en accord avec une expression plus importante des récepteurs D2 dans le tiers ventral de la SNc (*Hurd et al., 1994*). Il est cependant à noter que le degré de contrôle de la libération STD par l'autorécepteur D2 est beaucoup moins important que dans le striatum (*Cragg et al., 1997*). D'un point de vue mécanistique, la régulation de la libération STD de DA par le D2 semble se faire via une hyperpolarisation membranaire des neurones dopaminergiques par les canaux potassiques à rectification entrante de type GIRK-2 (*Beckstead et al., 2004*). Cette régulation a également été constatée dans le cas de la libération spontanée de DA (*Yee et al., 2019*). Dans cette étude, l'activation des récepteurs D2 par le quinpirole a conduit à une baisse des niveaux extracellulaires de DA de manière indépendante de l'activité électrique des neurones, car l'effet de cet agoniste subsistait en présence de TTX, suggérant ainsi que c'était l'hyperpolarisation de la membrane qui était responsable de l'inhibition de la libération de DA et non pas la baisse de fréquence de décharge de ceux-ci.

1.3.5.2. Régulation par le glutamate et GABA

Les principales voies de projections afférentes aux neurones dopaminergiques sont glutamatergiques et GABAergiques (*Chen et Rice, 2002; Zhou et Lee, 2011*), bien que la balance entre les afférences excitatrices et inhibitrices diffère entre la SNc et la VTA. Ainsi dans la SNc on observe une prédominance de l'innervation GABAergique (*Bolam et Smith, 1990*), tandis que dans la VTA c'est l'innervation glutamatergique qui prime (*Charara et al., 1996; Sesack et Grace, 2010*).

Dans des tranches de SNc, la stimulation unitaire peut évoquer une libération STD qui n'est pas affectée par un cocktail d'antagonistes des récepteurs GABAergiques ou glutamatergiques (*Chen et al., 2006*), indiquant une absence de régulation tonique par ces systèmes *ex vivo*. Cependant, quand des trains de stimulation sont employés pour évoquer la libération STD, une régulation par le glutamate et le GABA est observée dans la SNc et dans la VTA (*Chen et Rice, 2002*). Dans la SNc, l'antagonisme des récepteurs glutamatergiques (AMPA et NMDA) ou GABAergiques (GABA_A et GABA_B) augmentent la libération évoquée par des trains. Quand les récepteurs GABA sont bloqués, l'effet de l'antagonisme des récepteurs AMPA est perdu, ce qui suggère que l'inhibition de la libération STD de DA par le glutamate se fait via les récepteurs AMPA présents sur les cellules et terminaisons inhibitrices de la SNc, en accord avec les données anatomiques (*Yung, 1998*). Dans la VTA en revanche, les projections glutamatergiques ont un effet direct sur la libération de DA, car le blocage des récepteurs GABA_A, GABA_B et AMPA sont sans effet sur la libération en train, alors que le blocage des récepteurs NMDA provoque une diminution de la libération STD de DA (*Chen et Rice, 2002*).

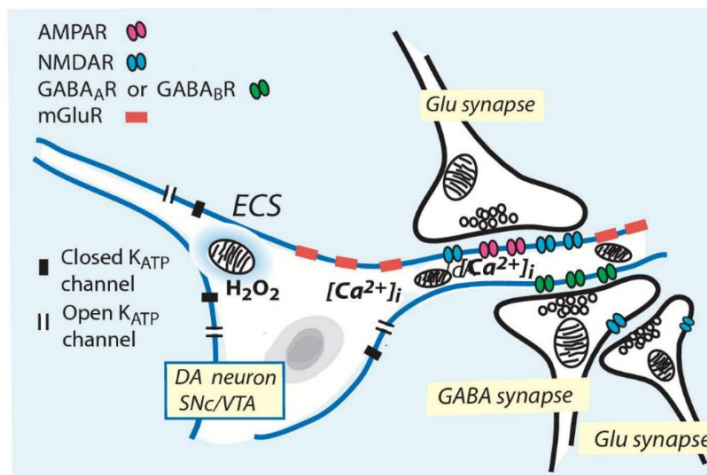
La libération STD de DA peut aussi être régulée par le glutamate agissant sur les récepteurs mGluR1, dont l'expression est abondante dans les neurones dopaminergiques de la SNc (*Patel et al., 2009*). L'étude de Patel a ainsi montré que l'utilisation de train de stimulation pour évoquer la libération STD de DA dans la SNc produit également une libération simultanée de glutamate activant les récepteurs mGluR1, qui facilitent la libération de DA, comme indiqué par la diminution de la libération en présence d'un antagoniste de mGluR1. Cet effet passe par la mobilisation des stocks de calcium du réticulum endoplasmique par les récepteurs de l'IP3. Cependant, un facteur compliquant l'étude de ce processus est l'activation concomitante de canaux calciques activés par

le calcium ayant un effet inhibiteur sur la libération (*Fiorillo et Williams, 1998; Morikawa et al., 2003*).

1.3.5.3. Régulation par le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) endogène qui est généré spontanément par l'activité des neurones dopaminergiques peut inhiber la libération STD dans la SNc (*Chen et al., 2002; Avshalumov et al., 2003*). Cette inhibition passe par une activation de canaux K_{ATP} par le H_2O_2 qui provoque une hyperpolarisation et une diminution de l'activité électrique des neurones dopaminergiques (*Avshalumov et al., 2005*). L'augmentation de l' H_2O_2 endogène par l'inhibition de la GSH peroxydase diminue la libération évoquée par train de stimulation dans la SNc, mais pas dans la VTA ce qui indique que des mécanismes de génération ou de régulations de l' H_2O_2 sont différents entre ces deux régions et pourrait participer à la plus grande vulnérabilité des neurones de la SNc dans le Parkinson.

Figure 17. – Régulation de la libération somatodendritique de dopamine par le glutamate, GABA et H_2O_2 .



Dans la SNc, les projections GABAergiques prédominent de sorte que les projections glutamatergiques augmentent l'inhibition de la libération via les récepteurs AMPA et NMDA présents sur les terminaisons GABAergiques. Dans la VTA, les projections glutamatergiques prédominent et augmentent la libération de DA. Celle-ci est également facilitée par le glutamate agissant sur les récepteurs mGluRs, qui mobilisent les stocks intracellulaires de Ca^{2+} via les récepteurs de l'IP₃, et elle est inhibée par l' H_2O_2 via les canaux K_{ATP} . Issue de Rice et al., 2011.

1.3.6. Mécanismes de la libération somatodendritique

1.3.6.1. Libération par le DAT via un transport inversé

Le nombre limité de vésicules et la présence du DAT sur les dendrites des neurones dopaminergiques ont conduit plusieurs groupes à spéculer sur le fait que la libération somatodendritique pourrait être en réalité contrôlée par un mécanisme d'inversion du DAT, qui serait donc indépendant de la libération vésiculaire (*Leviel, 2001; Nirenberg et al., 1996a,b*). Comme vu précédemment, l'activité du DAT dépend initialement de l'état de polarisation de la membrane et des gradients électrochimiques des substrats transportés. Ainsi, en théorie, n'importe quel facteur pouvant faire inverser les gradients ioniques et/ou chimiques des substrats du DAT devrait permettre d'inverser le transport membranaire. Le transport inverse de DA a ainsi été constaté comme étant le principal mode de libération à la suite de certains traitements pharmacologiques ou modifications des gradients électrochimiques.

1.3.6.1.1. Cas de l'inversion induite par le sodium et le chlore

En accord avec la stœchiométrie du DAT et de son mode de fonctionnement, une action directe sur les gradients des ions Na^+ et Cl^- qui sont transportés en même temps que la DA peut influencer la direction du transport (*Sitges et al., 1994; Leviel, 2001*). Il a été rapporté qu'une diminution des concentrations extracellulaires de sodium ou bien de chlore engendre une augmentation de la DA extracellulaire, de manière indépendante du calcium, de la TTX, mais pouvant être inhibée par les bloqueurs du DAT (*Diliberto et al., 1989; Hurd et Ungerstedt, 1989*). La perturbation du gradient sodique transmembranaire par des approches pharmacologiques peut également induire le transport inverse. C'est le cas par exemple de la ouabaïne qui bloque la pompe Na^+/K^+ -ATPase (*Archibald et White, 1974*) ou de la dépolarisation induite par la vétratridine qui bloque les canaux sodiques dépendants du voltage en configuration ouverte (*Elverfors et al., 1997*).

1.3.6.1.2. Cas de l'inversion induite par l'amphétamine

L'utilisation de l'amphétamine a beaucoup apporté au concept de transport inverse par sa propriété à vider les stocks intracellulaires de DA et la libérer hors de la cellule (*Sulzer et al., 1995; Jones et al., 1998; Torres et al., 2003*). Son action passe par plusieurs étapes (*revu par Leviel, 2001*). Tout d'abord, son entrée dans les neurones dopaminergiques, soit par diffusion, soit par transport en tant que substrat du DAT, permet son accumulation à l'intérieur des neurones. Une

fois entrée, l'amphétamine peut bloquer directement le transporteur vésiculaire VMAT2 et son accumulation dans les vésicules détruit le gradient de proton. Ainsi la DA contenue en forte concentration dans les vésicules migre selon son gradient chimique vers le cytoplasme et ne peut plus être re-empaquetée dans les vésicules. Enfin, l'amphétamine a également la capacité d'influer sur le métabolisme de la DA par ses propriétés inhibitrices sur les MAO responsables de la dégradation de la DA et est à faible dose stimulatrice de la synthèse de DA. Au total, il en résulte une augmentation importante de la concentration cytoplasmique de DA qui pourra ensuite être libérée par l'action de l'amphétamine sur le DAT et un gradient chimique de la DA favorable à sa sortie des neurones dopaminergiques.

Il a par ailleurs été constaté que l'augmentation de la DA extracellulaire induite par l'amphétamine est proportionnellement moins grande dans la SNc/VTA que dans le striatum/Nac (*Kalivas et al., 1989; Robertson et al., 1991*), ce qui suggère une fois encore que les régions STD présentent des stocks intracellulaires de DA moins importants. Une capacité de stockage plus faible, associée à un renouvellement de la DA plus élevé, comme suggéré par les études utilisant la réserpine, contribueraient ainsi à augmenter le ratio DA cytosolique/DA stockée dans ces régions. Même si l'effet de la réserpine en lui-même supporte l'hypothèse d'un mécanisme exocytotique pour la libération STD, un ratio plus élevé de DA cytosolique favoriserait quant à lui l'hypothèse d'un mécanisme par transport inverse.

1.3.6.1.3. Cas de l'inversion induite par transmission synaptique

L'action d'autres systèmes de neurotransmission sur le système dopaminergique a également été étudiée. La sérotonine (5-HT) est connue par sa capacité à augmenter les niveaux extracellulaires de DA dans le striatum ou dans le mésencéphale (*Yadid et al., 1994; Deurwaerdère et al., 1995; Campbell et al., 1996; Sills et al., 1999; Liu et al., 2006*). Notamment, l'utilisation de phénylbiguanide, un agoniste des récepteurs 5-HT de type 3, a permis d'évoquer une libération de DA dans le striatum et la VTA, un effet inhibé par la nomifensine (bloqueur du DAT), mais insensible à la réserpine et non dépendant du calcium ; des propriétés caractéristiques d'un mécanisme par transport inverse (*Benuck et Reith, 1992; Campbell et al., 1996; Liu et al., 2006*). Il a été démontré en effet que la 5-HT pouvait libérer la DA via un mécanisme passant par le DAT plutôt que par l'activation des récepteurs sérotoninergiques (*Su-Jin et al., 1991; Jacocks et Cox, 1992*).

Il en va de même pour le système glutamatergique. L'application de L-glutamate ou de NMDA dans le striatum a permis d'élever les niveaux extracellulaires de DA de manière résistante à la TTX, insensible à la réserpine, indépendante du calcium et bloquée par des inhibiteurs du DAT (*Giorguieff et al., 1977; Lonart et Zigmond, 1991; Keefe et al., 1993*). Son rôle a ainsi été proposé dans le transport inverse de DA. Le glutamate pourrait être co-transporté avec le Na⁺ et perturberait ainsi le gradient sodique, favorisant le transport inverse. Falkenburger et ses collaborateurs (*2001*) ont rapporté, par des approches d'ampérométrie et de patch clamp, que la stimulation des projections glutamatergiques du noyau sous-thalamique par le carbachol peut également induire une libération dendritique de DA dans la SNc par un mécanisme qui est aboli avec de faibles concentrations de GBR-12909, un bloqueur du DAT. L'application locale de 1 mM de glutamate dans la SNc a par ailleurs également induit une libération de DA, perdurant partiellement même en l'absence de calcium. Cette étude suggère donc que dans certaines situations physiologiques la libération STD de DA peut être assurée par un transport inversé.

Il n'est cependant pas clair de savoir comment ces données peuvent être réconciliées avec les études ayant mesuré la libération STD de DA *in vitro* et *in vivo* en présence de bloqueurs du DAT. En effet, celles-ci montrent sans équivoque que le blocage du DAT conduit à une augmentation des concentrations extracellulaires de DA, que ce soit en libération évoquée (*Beckstead et al., 2004; Chen and Rice, 2001; S. Cragg et al., 1997; Cragg et al., 2001; Elverfors et al., 1997*) ou spontanée (*Santiago et Westerink, 1991; Elverfors et Nissbrandt, 1992; Hoffman et al., 1998; Fortin et al., 2006; Mendez et al., 2011; Yee et al., 2019*). Ces différences pourraient provenir des différents modes de stimulation utilisés, qui pourraient recruter différents mécanismes de libération. Une stimulation des neurones par le glutamate ou la vératridine pourrait ainsi induire le transport inverse alors que de fortes concentrations de potassium ou la stimulation électrique induiraient plutôt l'exocytose vésiculaire dépendante du calcium. Le fait que le transport inverse ne soit pas montré comme impliqué dans la libération spontanée de DA, comme cela a été récemment démontré par la technique de voltammétrie par adsorption (FSCAV) souligne par ailleurs que le transport inverse ne doit pas être physiologiquement le mécanisme principal (*Yee et al., 2019*).

Au total, les études présentées ici sont des indices indiquant que le transport inverse de DA pourrait exister dans le compartiment STD, mais son rôle physiologique reste incertain. En effet,

la majorité des données allant dans le sens de cette hypothèse ont été obtenues par des manipulations pharmacologiques qui impactent les gradients électrochimiques des substrats du DAT. Dans le cas de l'amphétamine par exemple, il a été rapporté qu'en absence de traitements pharmacologiques, la DA endogène cytoplasmique (du striatum tout du moins) n'atteint pas des concentrations suffisantes pour un transport inversé (*Jones et al., 1998*).

1.3.6.2. Mécanismes exocytotiques de la libération somatodendritique de dopamine

À l'exception de *Falkenburger et al. (2001)*, il y a peu d'autres arguments allant à l'encontre de la proposition initiale de Geffen dans les années 70 que la libération STD de DA soit vésiculaire. Malgré certaines contradictions dans la littérature soulignées précédemment, il apparaît que la libération STD de DA est dépendante de l'activité électrique (sensible en partie à la TTX), du sodium et du calcium (*Geffen et al., 1976; Rice et al., 1994; Cheramy et al., 1981; Cragg et Greenfield, 1997; Rice et al., 1997; Chen et Rice, 2001; Fortin et al., 2006*), sensible à la réserpine (*Rice et al., 1994; Heeringa and Abercrombie, 1995; Beckstead et al., 2004*) et favorisée par le blocage du DAT (*Santiago and Westerink, 1991; Elverfors and Nissbrandt, 1992; Elverfors et al., 1997; Rice et al., 1997; Hoffman et al., 1998; Chen and Rice, 2001; Cragg et al., 2001; Fortin et al., 2006; Mendez et al., 2011; Yee et al., 2019*).

Comme vu en introduction, la libération de neurotransmetteur par exocytose est un processus faisant intervenir de multiples étapes et un réseau interconnecté de protéines distribuées dans différents sites, incluant les vésicules et les zones actives de la membrane plasmique où se déroule la fusion. En plus des arguments évoqués plus haut en faveur d'un mécanisme exocytotique, il a été également démontré que l'utilisation de toxines botuliniques inhibe la libération somatodendritique suggérant un mécanisme dépendant des SNAREs (*Bergquist et al., 2002; Fortin et al., 2006; Ovsepian et Dolly, 2011*). Ces observations ont soulevé de nombreuses questions, et notamment sur la machinerie moléculaire impliquée dans la libération STD et sa similitude avec celle retrouvée au niveau des terminaisons.

1.3.6.2.1. Machinerie moléculaire impliquée dans la libération somatodendritique

À l'heure actuelle, peu d'études se sont attachées à caractériser la machinerie moléculaire impliquée dans la libération STD de DA. Il a été montré que la toxine botulinique A (BoNT/A), qui clive SNAP-25, diminue la libération STD *in vivo* (par microdialyse chez le rat), *ex vivo*

(mesure des D2-IPSC en tranche) ou *in vitro* (dans des cultures primaires de neurones DA de rat) (Bergquist et al., 2002; Fortin et al., 2006; Hikima et al., 2021). La toxine botulinique B (BoNT/B), qui clive la synaptobrevine 2 (VAMP2), mais pas VAMP-1 chez le rat (Humeau et al., 2000), diminue également la libération de DA (Fortin et al., 2006). Cette observation est en accord avec l'analyse en immunohistochimie de Witkovsky et al., (2009) qui montrèrent sur tranche de mésencéphale de cobaye une abondance de l'immunomarquage de VAMP-2 au niveau du soma, et dans une moindre mesure dans les dendrites, mais aucun marquage pour VAMP-1. Bergquist eu également recourt à la toxine tétanique et la toxine botulinique B, clivant toute deux VAMP-2, mais à la différence de Fortin ne constata aucun effet sur la libération de DA. Il faut toutefois noter que Bergquist implanta ses canules de microdialyse dans la SNr, une région ayant montré une densité faible de VAMP-2 dans l'étude de Witkovsky. Dans l'ensemble, ces travaux démontrent donc un rôle fonctionnel de SNAP-25 et VAMP-2 et supporte ainsi l'idée que la libération STD de DA puisse survenir par exocytose.

Par ailleurs, en accord avec la rareté des vésicules synaptiques dans le compartiment STD des neurones dopaminergiques, l'étude immunohistochimique de Witkovsky montra également l'absence de certaines protéines associées aux vésicules synaptiques, qu'on retrouve normalement abondamment dans les terminaisons. Cela inclut les protéines SV2 a et b (*synaptic vesicle protein 2*), la synaptophysine et les synaptotagmines (Syts) 1 et 2 (Witkovsky et al., 2009). La protéine SV2c a en revanche été rapportée dans le compartiment STD ainsi que dans les terminaisons au niveau du striatum (Dunn et al., 2017). L'étude a montré que le KO de SV2c chez la souris conduit à une diminution d'environ 30% de la libération axonale de DA ainsi qu'à des déficits moteurs modérés. Elle n'a en revanche pas évalué l'impact du KO sur la libération STD. L'absence de la Syt1 dans le soma et les dendrites des neurones dopaminergiques en culture fut quant à elle démontrée dans l'étude de Mendez en 2011 (si ce n'est en tant que contacts synaptiques d'autres neurones sur les neurones dopaminergiques). L'étude a par ailleurs démontré la présence au niveau somatodendritique des isoformes 4 et 7 de la Syt et suggérée leur implication dans la libération STD de dopamine (voir sections suivantes).

Certaines protéines SNARE impliquées dans l'amarrage des vésicules ont aussi été rapportées comme absentes, incluant la syntaxine 1a et VAMP1, tandis que la syntaxine-3, VAMP-2 et SNAP-25 se retrouvent dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones dopaminergiques

(Witkovsky et al., 2009). Ces données pharmacologiques et immunohistochimiques indiquent donc que l'organisation moléculaire de la machinerie exocytotique dans la SNc apparaît comme non conventionnelle. Au niveau des synapses rapides, on retrouve couramment un groupe de protéines comprenant les syntaxines 1a ou 1b, SNAP-25 et VAMP-1 ou 2 (Söllner et al., 1993; Südhof, 2004). Dans les cellules dont la libération de neurotransmetteurs apparaît plus lente, d'autres associations ont été découvertes. Par exemple dans les synapses « à ruban » des photorécepteurs, Curtis et al., (2008) ont identifié la syntaxine 3b, VAMP-2 et SNAP25, la même triade non conventionnelle que celle identifiée par IHC dans les neurones de la SNc de l'étude de Witkovsky. À l'instar de SNAP-25 et VAMP-2, l'absence de toxine spécifique pour la syntaxine-3 (la BoNT/C clive toutes les isoformes de la syntaxine et dans une moindre mesure SNAP-25 ; Humeau et al., 2000), rend plus compliquée la démonstration de son rôle fonctionnel dans la libération STD.

1.3.6.2.2. Rôle de la famille des synaptotagmines

La dépendance au calcium particulière de la libération STD de DA (Chen et Rice, 2001; Chen et al., 2011) a conduit à l'hypothèse que certaines isoformes de la famille des synaptotagmines (Syts) pourraient être impliquées en tant que senseur du calcium dans cette région. De façon générale, la Syt consiste en une protéine à 5 différents domaines : un court domaine extracellulaire (de 0 à moins de 70 acides aminés), un domaine transmembranaire unique, un « spacer domain » de taille variable et un domaine C2 en tandem (C2A et C2B) liant le calcium et les phospholipides (Südhof, 2002; Fukuda, 2013). Cette famille comprend actuellement 17 isoformes, et certaines Syts, par épissage alternatif, n'incluent pas un ou plusieurs domaines. Ainsi, parmi les 17 Syts connues, 8 ont l'habileté de lier le calcium (Syt1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, et 10) via leur domaine C2, jouant ainsi un rôle démontré ou supposé dans l'exocytose régulée par le calcium (Chen et Jonas, 2017). Les fonctions de toutes les Syts sont encore méconnues, allant de rôles aussi divers que la régulation de l'exocytose et la libération asynchrone de neurotransmetteurs, au trafic intracellulaire ou bien encore la régulation de des processus d'endocytose. Le **tableau 4** décrit certaines connaissances concernant les localisations et fonctions des différentes Syts dans le SNC et les sections suivantes s'attacheront à décrire le lien, avéré ou supposé, de certaines isoformes avec le système dopaminergique et la libération de DA.

Tableau 4. – Localisation et fonctions des synaptotagmines dans le SNC.

Syts	Localisation anatomique	Localisation cellulaire	Liaison au calcium	Fonction	Référence
Syt1	Larges variétés de synapses excitatrices. Toutes les régions <u>rostrales</u> du cerveau, la plupart des neurones du tronc cérébral et de la moelle épinière. Varicosités des neurones dopaminergiques	<i>Neurones, astrocytes (?)</i> , Vésicules synaptiques	Oui (faible affinité)	Senseur calcique pour la libération rapide de neurotransmetteurs dont la libération axonale de DA	<i>Xu et al., 2007; Kerr et al., 2008; Mendez et al., 2011; Banerjee et al., 2020</i>
Syt2	Régions <u>caudales</u> du cerveau, cellules de Purkinje et cellules en panier du cervelet, certains neurones du striatum et cortex,	<i>Neurones, astrocytes (?)</i> , Vésicules synaptiques	Oui (faible affinité)	Senseur calcique pour la libération rapide de neurotransmetteurs	<i>Pang et al., 2006; Kerr et al., 2008</i>
Syt3	Diffuse dans le SNC, Enrichie dans l'hippocampe et le cervelet, modérée dans moelle épinière et cerveau postérieur	<i>Neurones, astrocytes (?)</i> , Membrane plasmique	Oui (forte affinité)	• Fonctions inconnues	<i>Berton et al., 1997; Butz et al., 1999</i>
Syt4	Diffuse dans le SNC, enrichie dans le cervelet, neurones dopaminergiques ,	<i>Neurones, astrocytes</i> , soma, région périnucléaire, réseau trans golgi, dendrites proximales,	Non	<ul style="list-style-type: none"> • Gène précoce immédiat • Régulation de l'exocytose : neuropeptide (hypothalamus) et glutamate (astrocyte) • Plasticité à court terme et mémoire associative (hippocampe) • Locus associé avec le Parkinson. Substrat de Parkin • Libération STD dans neurones DA en culture 	<i>Ibata et al., 2000, 2002; Ferguson et al., 2004; Zhang et al., 2004; Mendez et al., 2011; Do et al., 2011; Zhang et al., 2011; Fukuda, 2013; Kabayama et al., 2017</i>
Syt5/9*	Système limbique, ganglion de la base et bulbe olfactif (dont SNr, striatum et Nac). Synapses striatales	<i>Neurones (astrocytes ?)</i> Vésicules synaptiques	Oui	Senseur calcique pour la libération rapide (dans le striatum)	<i>Xu et al., 2007</i>
Syt6	Diffuse dans le SNC (à faibles niveaux) Forte expression dans le bulbe olfactif	<i>Neurones (astrocytes ?)</i> Cytosol, membre plasmique, membranes intracellulaires (RE, Golgi)	Oui (forte affinité)	• fonctions inconnues	<i>Butz et al., 1999; Fukuda et Mikoshiba, 1999</i>
Syt7	Régions rostrales du cerveau et cervelet. Enrichie dans l'hippocampe Présent dans les neurones dopaminergiques (culture)	<i>Neurones (astrocytes?)</i> Controversée : <ul style="list-style-type: none"> • membrane plasmique présynaptique • vésicules à cœur dense (cellules endocrines) • lysosomes (fibroblastes) • Neurones DA en culture (somas-dendrites-axones) 	Oui (forte affinité)	<ul style="list-style-type: none"> • Libération asynchrone • Facilitation de la transmission synaptique et libération de neurotransmetteurs • Senseur calcique (à haute affinité) pour le remplissage vésiculaire et dans les cellules chromaffines • Exocytose lysosomale (réparation des membranes) • Libération STD de DA 	<i>Sugita et al., 2001; Fukuda et al., 2002, 2004; Maximov et al., 2008; Mendez et al., 2011; Bacaj et al., 2013; Liu et al., 2014; Jackman et al., 2016; Luo and Südhof, 2017; MacDougall et al., 2018; Tawfik et al., 2021)</i>

* deux séquences différentes de Syt5 ont été rapportées en même temps par deux groupes en 1995, et chacune d'entre elles est souvent appelée Syt9 (voir Fukuda et Eisenberg, 2008). Syt5 est par exemple appelé Syt9 dans le laboratoire de Thomas Südhof et vice-versa.

En jaune, les isoformes ayant été étudiées dans le système dopaminergique.

Tableau 4. – (suite) Localisation et fonctions des synaptotagmines dans le SNC.

Syts	Localisation anatomique	Localisation cellulaire	Liaison au calcium	Fonction	Référence
Syt8	Hippocampe et sinon non connue	Soma de neurones de l'hippocampe (culture), cytosol et membranes	Non	• Fonctions inconnues	<i>Monterrat et al., 2006</i>
Syt10	Faible expression dans le cerveau, forte expression dans le bulbe olfactif (BO), Girus dentelé de l'hippocampe	<i>Neurones (astrocytes ?)</i> Vésicules somatodendritiques de neurones du BO	Oui	• Gène précoce immédiat • Senseur calcique pour la libération d'IGF-1 (BO) • Neuroprotection des neurones hippocampique à l'excitotoxicité (épilepsie)	<i>Babity et al., 1997; Cao et al., 2011; Woitecki et al., 2016</i>
Syt11	Diffuse dans le SNC, Expression majoritaire dans les astrocytes, Enrichie dans l'hippocampe Neurones dopaminergiques	<i>Astrocytes, Neurones, microglie,</i> Vésicules non synaptiques dans soma-axones-dendrites (hippocampe), Réseau Trans-golgi, Endosomes de recyclage Rab11+	Non	• Trafic intracellulaire • Inhibe l'endocytose médiée par la clathrine (hippocampe, ganglions spinaux, neurones DA) • Inhibe la libération de cytokines et la phagocytose par les microglies • Exocytose lysosomale (réparation des membranes des astrocytes) • Plasticité neuronale (PLT) et mémoire (hippocampe) • Locus associé avec le Parkinson. Substrat de Parkin, inhibe la phagocytose d'asynucléine (fibrilles) • Son accumulation engendre une baisse de libération de DA et une neurotoxicité	(Mittelsteadt et al., 2009; International Parkinson Disease Genomics Consortium et al., 2011; Wang et al., 2016; Sreetama et al., 2016; Du et al., 2017; Wang et al., 2018; Shimojo et al., 2019)
Syt12	Abondamment exprimée dans le cerveau, la plus forte expression est dans le cervelet	Vésicules synaptiques, (colocalise avec Syt1)	Non	• Libération spontanée de neurotransmetteurs (indépendamment de Syt1)	<i>Maximov et al., 2007</i>
Syt13	Expression diffuse dans le cerveau Système limbique	Inconnue	Non	• Transport constitutif vésiculaire ? • Son expression change durant un conditionnement par la peur (fear conditioning)	<i>Poser von et Südhof, 2001</i>
Syt14	Quasiment pas exprimée dans le SNC	Inconnue	Non	• Fonctions inconnues, association avec anomalies neurodéveloppementales (humain)	<i>Fukuda, 2003; Quintero-Rivera et al., 2007</i>
Syt15	Pas exprimé dans le SNC	Inconnue	Non	• Fonctions Inconnues	<i>Fukuda, 2003</i>
Syt16 (Strep14)	Quasiment pas exprimée dans le SNC	Inconnue	Non	• Associée à Syt14 • Ne possède pas le domaine transmembranaire des Syts • Fonctions inconnues	<i>Fukuda, 2003</i>
Syt17 (B/K)	Exprimée dans bulbe olfactif, cortex, hippocampe et hypothalamus	Neurones de l'hippocampe : Soma, Golgi, endosomes Rab5+	Non	• Ne possède pas le domaine transmembranaire des Syts • Croissance des neurites et axones • Trafic intracellulaire (cargos golgi > RE) • Plasticité synaptique	<i>Kwon et al., 1996; Fukuda et Mikoshiba, 2001; Ruhl et al., 2019</i>

En jaune, les isoformes ayant été étudiées dans le système dopaminergique. Les fonctions et localisations des Syts en dehors du système nerveux central ne sont pas discutées ici.

1.3.6.2.2.1. *Synaptotagmines 1, 2 et 9*

Aux synapses rapides, les Syts 1, 2 et 9 déclenchent l'exocytose rapide (« fast release ») des neurotransmetteurs (Pang et Südhof, 2010). Dans le striatum, ces isoformes ont été montrées comme importantes pour la neurotransmission des MSNs. Le KO de Syt9 dans les neurones du striatum a engendré une diminution de 67% de la libération rapide (Xu et al., 2007). La mesure des IPSCs évoqués par stimulation unitaire ou en train dans les neurones striataux de souris Syt1 KO (Xu et al., 2007) ou Syt2 KO (Pang et al., 2006) n'a engendré qu'une faible altération de la libération rapide, suggérant que Syt1 et 2 pourraient contrôler la libération restante des souris Syt9 KO. Le rôle de Syt1 dans la libération axonale de DA a par la suite été démontré *in vitro* dans l'étude de Mendez (2011) par une approche utilisant des siRNA pour diminuer son expression. Cette étude a par ailleurs montré que Syt2 et Syt9 ne sont pas détectés par RT-PCR (tissus de souris à P14, neurones DA FACSés et single cell à P0 et P45), contrairement à Syt1, ce qui indique un rôle prépondérant de cette isoforme dans la libération axonale de DA. Récemment, le KO conditionnel de Syt1 a par ailleurs démontré son rôle de senseur calcique principal pour la libération phasique de DA au niveau des terminaisons axonales *in vivo* (Banerjee et al., 2020). Les auteurs ont ainsi constaté chez les KO une abolition de la libération évoquée de DA mesurée par ampérométrie dans des tranches de striatum.

1.3.6.2.2.2. *Synaptotagmine 7*

La Syt7 est une isoforme intéressante à bien des égards. Quand la souris knock-out fut générée en 2003 par le groupe de Norma Andrews, le phénotype était complètement non neuronal, avec une souris présentant une inflammation et une fibrose de la peau et du muscle squelettique (Chakrabarti et al., 2003). Il est par la suite apparu que la cause était due à une anomalie de l'exocytose lysosomale des fibroblastes (Martinez et al., 2000; Chakrabarti et al., 2003; Jaiswal et al., 2004) et macrophages (Czibener et al., 2006), des vésicules à cœur dense (Fukuda et al., 2004), et de la sécrétion du glucagon par les cellules pancréatiques (Gustavsson et al., 2009).

Les premières analyses du groupe de Thomas Südhof n'ont révélé aucun effet du KO sur les synapses GABAergiques de neurones en culture (Maximov et al., 2008). Un résultat quelque peu étonnant compte tenu du fait que Syt7 a été montrée comme hautement exprimée dans les neurones et enrichie dans les synapses, où elle a été localisée non pas dans les vésicules synaptiques, mais à la membrane plasmique (Sugita et al., 2001; Virmani et al., 2003). Dans les

cellules neuroendocrines cependant, Syt7 a été montré comme colocalisant avec Syt1 sur les granules sécrétoires et comme participant à l'exocytose régulée (*Sugita et al., 2001; Shin et al., 2002; Tsuboi et Fukuda, 2007; Gustavsson et al., 2008; Schonn et al., 2008; Li et al., 2009; Gustavsson et al., 2009; Segovia et al., 2010*). La question de l'absence d'effet du KO de Syt7 au niveau synaptique, malgré son abondance dans le SNC, s'est alors posée. Il a été proposé que Syt7 puisse coexister avec d'autres isoformes de la famille Syt qui possèdent des cinétiques de liaisons rapides au calcium (groupe rapide comprenant les Syt1, 2 et 3 et intermédiaire comprenant les Syt5, 6, 9 et 10) qui pourrait masquer l'effet de Syt7, qui elle présente une cinétique lente de désassemblage du calcium (*Hui et al., 2005*). Le groupe de Südhof testa cette hypothèse en examinant l'effet du KO de Syt7 après l'élimination de Syt1 qui est le principal senseur calcique rapide. Il découvrit alors l'existence d'une composante lente et asynchrone qui est éliminée par le KO de Syt7 (*Bacaj et al., 2013*). Il fut alors conclu que Syt7 contrôle une forme lente de libération, qui ne devient visible qu'après que la forme rapide soit abolie (**figure 18**).

La question de la fonction physiologique de Syt7 s'est alors posée (**figure 18**). Syt7 a ainsi été par la suite démontré comme senseur calcique pour le remplissage du pool vésiculaire des synapses glutamatergiques dans des cultures primaires de neurones hippocampiques (*Liu et al., 2014*), ainsi que contribuant à la facilitation de la libération de neurotransmetteurs durant la stimulation répétée de synapses de tranches hippocampiques et corticothalamiques (*Jackman et al., 2016*). Par ailleurs, dans une étude récente, Luo et Südhof (*2017*) ont examiné l'effet du KO de Syt7 au niveau des synapses du calice de Held dans le système auditif de souris et ont rapporté que la libération asynchrone de neurotransmetteurs contrôlée par Syt7 avait pour propriété d'améliorer l'efficacité et la précision temporelle de la transmission rapide durant une activité répétée (train de stimulation). Cette étude a ainsi démontré qu'un senseur calcique lent pouvait physiologiquement contribuer aux propriétés de la libération rapide de neurotransmetteurs. Il est cependant à noter que la synapse du calice de Held est un cas particulier, car elle présente des fréquences de décharges présynaptiques très élevées (>100 Hz). Les neurones dopaminergiques pouvant présenter des bouffées de potentiels d'action d'une fréquence >15 Hz, la question du rôle physiologique de Syt7 dans ce système est encore inexplorée.

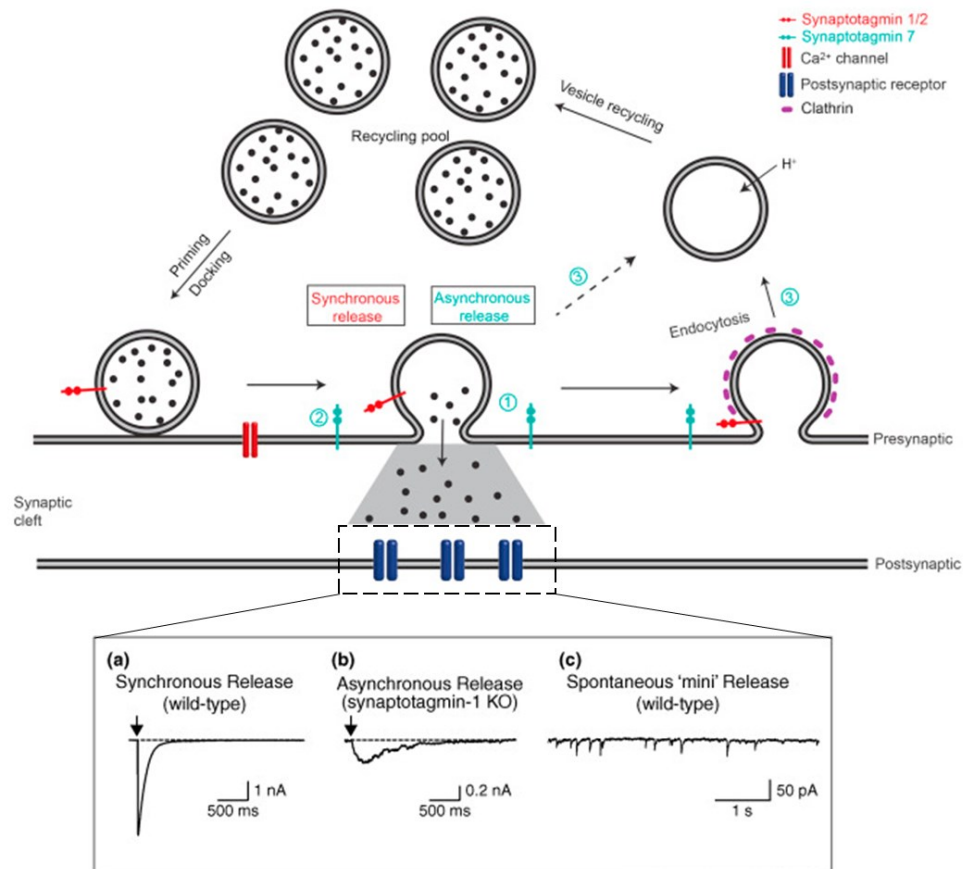
Par ailleurs, une étude récente a également démontré un rôle synergique entre Syt1 et Syt7 (*Tawfik et al., 2021*). Lorsque ces deux isoformes sont exprimées seules dans des cellules

chromaffines de souris, elles jouent le rôle de senseurs calciques autonomes respectivement rapide et lent. En revanche, lorsqu'elles sont exprimées ensemble, elles se retrouvent alors dans des amas distincts de vésicules synaptiques à cœur dense. Syt7 stimule alors l'amorçage des vésicules qui dépend du calcium (à faibles concentrations), de Munc13-2 et des phospholipides de la membrane et inhibe le désamorçage des vésicules. Cette facilitation de l'amorçage augmente ainsi le nombre de vésicules fusionnant à la membrane par l'action de Syt1, tout en affectant négativement leur vitesse de fusion, ce qui indique à la fois des interactions synergiques et compétitives entre ces deux Syts. Ainsi, Syt7 place les vésicules en apposition étroite (< 6 nm) avec la membrane et sans elle, les vésicules s'accumulent hors de portée du complexe de fusion (environ 20 – 40 nm). Ceci indique qu'un mouvement de Syt7 vers la membrane plasmique pour y jouer un rôle dans l'amorçage serait en fait un prélude au déclenchement de l'exocytose. En plus de ce rôle facilitateur, une autre étude récente dans des neurones hippocampiques de souris a montré que Syt7 est un senseur calcique redondant avec Syt1 et Doc2 pour la libération spontanée du glutamate servant à l'activation des récepteurs postsynaptiques GluN2B-NMDA, qui jouent un rôle dans les troubles bipolaires (*Wang et al., 2021*).

En addition de ces propriétés de senseur calcique lent, il a également été rapporté que Syt7 a une affinité 10 fois plus élevée que Syt1 dans la liaison aux phospholipides de la membrane et à la syntaxine (*Li et al., 1995*). Elle peut en outre déclencher la libération de neurotransmetteurs à des concentrations extracellulaires de calcium aussi faibles que 300 nM, contre 3 μ M pour Syt1 (*Sugita et al., 2001; Fernández-Chacón et al., 2001; Sugita et al., 2002*). Ces observations, en addition de celles du groupe de Rice ayant montré que la libération STD pouvait survenir à de faibles concentrations de calcium (0.5 mM), où la libération terminale est abolie (*Chen et Rice, 2001; Chen et al., 2011*), ont conduit Mendez et ses collaborateurs à l'hypothèse que Syt7 pouvait être impliquée dans la libération STD de DA. L'utilisation de siRNA pour diminuer l'expression de Syt7 dans des cultures primaires de neurones DA a conduit à une diminution $\approx 60\%$ de la libération STD de DA mesurée par dosage radiologique du milieu de culture, où la concentration extracellulaire de calcium était portée à 0.5 mM (une concentration censée abolir la libération terminale). L'utilisation de siRNA contre Syt1 n'a en revanche eu d'effet que si la concentration du milieu extracellulaire en calcium était montée à 2 mM, une concentration où la libération terminale redevient possible, ce qui a conduit à une baisse de la libération de DA $\approx 60\%$, confirmant, de fait, un rôle de Syt1 dans la libération axonale de DA *in vitro*.

Syt7 ayant été montrée comme exprimée à la fois dans le compartiment STD et dans les axones des neurones dopaminergiques, l'étude ne permet pas de conclure quant à la contribution que pourrait avoir Syt7 au niveau des terminaisons, la libération de DA totale (STD et axonale) à 2 mM de calcium étant réduite de 25% par la diminution d'expression de Syt7. Cette diminution peut refléter un effet strictement somatodendritique ou une combinaison des deux formes de libération.

Figure 18. – Fonctions de Syt7 dans l'exocytose et l'endocytose au niveau synaptique.



(1) Libération asynchrone durant des stimulations à haute fréquence (Luo et Südhof, 2017). (2) Facilitation de la transmission synaptique (Jackman et al., 2016). (3) remplissage rapide du pool de vésicules (Liu et al., 2014). Syt 1 et 2 sont en rouge et localisées sur les vésicules synaptiques, Syt7 est en cyan et localisée à la membrane plasmique (Li et al., 2017). Panneau du bas : traces représentatives des courants postsynaptiques détectés par patch clamp (cellule entière) après trois différents types d'exocytoses vésiculaires : (a) libération évoquée synchrone de synapse de souris sauvages (wild-type). (b) libération évoquée asynchrone de synapses KO pour Syt1. À noter que cette forme de libération disparaît avec le double KO Syt1/Syt7 (Bacaj et al., 2013) (c) libération spontanée miniature. À noter que la libération asynchrone peut aussi être enregistrée chez certains types de neurones de souris sauvages après stimulation à haute fréquence. Adapté de Pang et Südhof, 2010 et Chen et Jonas, 2017.

1.3.6.2.2.3. *Synaptotagmine 4*

Syt4 est une isoforme particulière en raison d'une mutation naturelle conservée sur son domaine C₂A empêchant de fait la liaison du calcium (*Fukuda et al., 1996; von Poser et al., 1997; Dai et al., 2004*). Les études de Syt4 semblent lui prêter un rôle multifonctionnel et des caractéristiques uniques. Elle a été initialement identifiée dans les cellules PC12 et dans le cerveau de rat/souris en tant que gène d'expression immédiate-précoce induit par la dépolarisation (*Vician et al., 1995*). Génétiquement, le gène humain *SYT4* se retrouve sur une région du chromosome 18 qui a été associé à des troubles psychiatriques, la schizophrénie, les troubles bipolaires et la maladie de Parkinson (*Ferguson et al., 2000; Do et al., 2011*). Le KO constitutif de Syt4 chez la souris altère la mémoire dépendante de l'hippocampe et la coordination motrice (*Ferguson et al., 2000*), ce qui semble en accord avec ses niveaux d'expression d'ARNm, retrouvés dans tout le cerveau, mais particulièrement au niveau de l'hippocampe, du cortex et cervelet (*Berton et al., 1997*). Par ailleurs, en contraste avec l'augmentation des niveaux de protéines Syt1/2 de la naissance à l'âge adulte, l'expression de la protéine Syt4 dans le cerveau est maximale durant la première semaine postnatale et décline avec l'âge (*Berton et al., 1997; Ibata et al., 2000*).

La question de la fonction de Syt4 s'est posée en connaissance du fait qu'elle ne peut pas lier le calcium, à l'exception notable de la Syt4 de drosophile (*Wang et Chapman, 2010*) ou d'une isoforme de Syt4 mutée sur le domaine C₂A ce qui restaure sa fonction de liaison au calcium (*Fukuda et al., 1996*). Syt4 s'est ainsi vu attribuer un rôle de régulateur tantôt négatif, tantôt positif de l'exocytose dépendante du calcium. Des approches de surexpression de Syt4 ont ainsi montré une diminution de la libération évoquée à la jonction neuromusculaire de drosophile (*Littleton et al., 1999*). À l'opposé, un autre groupe a découvert que la Syt4 de drosophile peut se substituer à Syt1 et sauver le phénotype engendré par le KO de Syt1, indiquant une capacité de Syt4 à lier le calcium et contrôler l'exocytose rapide (*Robinson et al., 2002*). La surexpression de Syt4 dans des cellules PC12 a quant à elle provoquée une inhibition de la libération évoquée d'hormones contenues dans des vésicules à cœur dense, notamment en interagissant avec les pores de fusion et en augmentant la fréquence et la durée du mode de libération par « *kiss and run* » au détriment de la libération complète (*Wang et al., 2001; Machado et al., 2004; Zhang et al., 2010*). Syt4 a enfin montré un rôle inhibiteur dans l'exocytose du BDNF par les axones et dendrites des neurones hippocampiques de souris (*Dean et al., 2009*), ainsi que dans l'exocytose de l'ocytocine par les neurones de l'hypothalamus (*Zhang et al., 2011*).

Des effets opposés ont été découverts dans d'autres systèmes, où Syt4 a été au contraire capable de promouvoir l'exocytose du glutamate par les astrocytes (*Zhang et al., 2004*), la fusion de vésicules synaptiques au niveau des synapses à ruban auditive (*Johnson et al., 2010*), la maturation et l'exocytose de vésicules à cœur dense par des cellules PC12 et LβT2 (*Fukuda et al., 2003; Ahras et al., 2006; Mori et al., 2008; Hu et al., 2008*). Par ailleurs, le KO de Syt4 n'a montré aucun effet sur la neurotransmission (libération, cinétiques, plasticité) de neurones de l'hippocampe en culture (*Ting et al., 2006*). Les fonctions de senseur calcique de Syt4 pourraient être attribuées à son domaine C₂B intact qui peut lier le calcium, même s'il a été rapporté que, dans le cas de Syt4, il ne le fixe pas *in vitro* (*Dai et al., 2004*). Pourtant, l'étude de Zhang a montré que tandis que l'expression de la Syt4 sauvage permet de restaurer la libération de glutamate par des astrocytes rendus déficients pour Syt4 par une approche de siRNA (stratégie de « *rescue* »), l'expression d'une Syt4 mutée au niveau du domaine C₂B ne le permet pas (*Zhang et al., 2004*).

En dehors de ses fonctions dans l'exocytose, Syt4 a également démontré des capacités à moduler le transport vésiculaire au niveau du réseau trans-Golgi (*Arthur et al., 2010*), en accord avec sa localisation subcellulaire au niveau du Golgi et des dendrites de neurones hippocampiques (*Ibata et al., 2000, 2002*). Ces observations ont amené Mendez et ses collaborateurs à explorer le rôle de Syt4 dans la libération STD de DA (*Mendez et al., 2011*). Ces auteurs ont découvert que Syt4 était exprimée dans les neurones dopaminergiques (RT-PCR), localisée strictement au niveau du soma et dendrites proximales (ICC) et que la diminution de son expression en culture (par siRNA) a conduit à une baisse de la libération somatodendritique (dosage radiologique du milieu de culture à 0.5 mM de calcium), démontrant de fait, son implication, ainsi que celle de Syt7, dans ce processus.

Au total, les effets de Syt4 apparaissent variés et dépendants de sa localisation, niveaux d'expression et d'autres facteurs physiologiques non encore déterminés. De façon intéressante, les effets négatifs et positifs de Syt4 sur l'exocytose dépendante du calcium se sont tous deux retrouvés dans les terminaisons de la glande pituitaire postérieure de souris (*Zhang et al., 2009*). À ce niveau, Syt4 inhibe l'exocytose quand les concentrations extracellulaires de calcium sont faibles, mais la déclenche quand les niveaux augmentent, suggérant que la fonction de Syt4 peut être modulée selon les conditions physiologiques. Ces observations sont moins facilement réconciliables avec la participation de Syt4 dans la libération STD survenant à faible concentration de calcium (*Chen et*

al., 2011; Mendez et al., 2011). Il se pourrait que les effets de Syt4 dépendent de ses interactions avec Syt1, comme les travaux sur la drosophile le laissent suggérer, et comme cela a été démontré avec Syt1/Syt7 (*Tawfik et al., 2021*). Néanmoins, dans les neurones dopaminergiques *in vitro*, Syt1 semble absent du compartiment STD, ainsi les interactions Syt1-Syt4 apparaissent moins probables que dans le cas de Syt7.

1.3.6.2.2.4. *Synaptotagmine 11*

La Syt11 est également une isoforme intéressante du fait de ses liens avec Syt4. Tout comme elle, Syt11 présente une mutation de son domaine C₂A l'empêchant de lier le calcium (*von Poser et al., 1997*), est un gène candidat à la susceptibilité à la schizophrénie (*Inoue et al., 2007*), et un locus à risque dans la maladie de Parkinson (*Huynh et al., 2003; International Parkinson Disease Genomics Consortium et al., 2011*).

Dans le cerveau de rongeurs, on trouve les ARNm de Syt11 en abondance et c'est l'isoforme la plus exprimée dans les cellules gliales (*Mittelsteadt et al., 2009*). En lien avec son expression, Syt11 déclenche l'exocytose des lysosomes à la membrane des astrocytes et permet ainsi la réparation des membranes (*Sreetama et al., 2016*). Au niveau des microglies, on retrouve Syt11 dans le réseau trans-Golgi et dans les endosomes de recyclage où elle joue un rôle inhibiteur de la sécrétion de cytokines et de la phagocytose, notamment des fibrilles d' α -synucléine, supportant une association avec la maladie de Parkinson (*Du et al., 2017*).

Syt11 fut également retrouvé au niveau des vésicules de recyclage des neurones où son rôle dans la régulation de l'endocytose fut démontré. Une première étude montra que Syt11 avait la capacité d'inhiber l'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine dans les neurones de l'hippocampe (*Wang et al., 2016*). Sa présence sur des vésicules de recyclage au niveau du soma, dendrites et axones fut également rapportée dans les neurones corticaux, qui se recyclent à la membrane de manière dépendante de l'activité électrique, mais avec une exocytose lente et désynchronisée (*Shimojo et al., 2019*). Ce processus semble requis à la survie, car les souris Syt11 KO de l'étude meurent peu après la naissance, alors même que le KO a été rapporté sans incidence sur la libération rapide de neurotransmetteurs. L'étude montre par ailleurs que l'ablation sélective de Syt11 dans les neurones de l'hippocampe est sans effet sur l'espérance de vie des souris, mais altère la plasticité synaptique (potentialisation à long terme) et la mémoire.

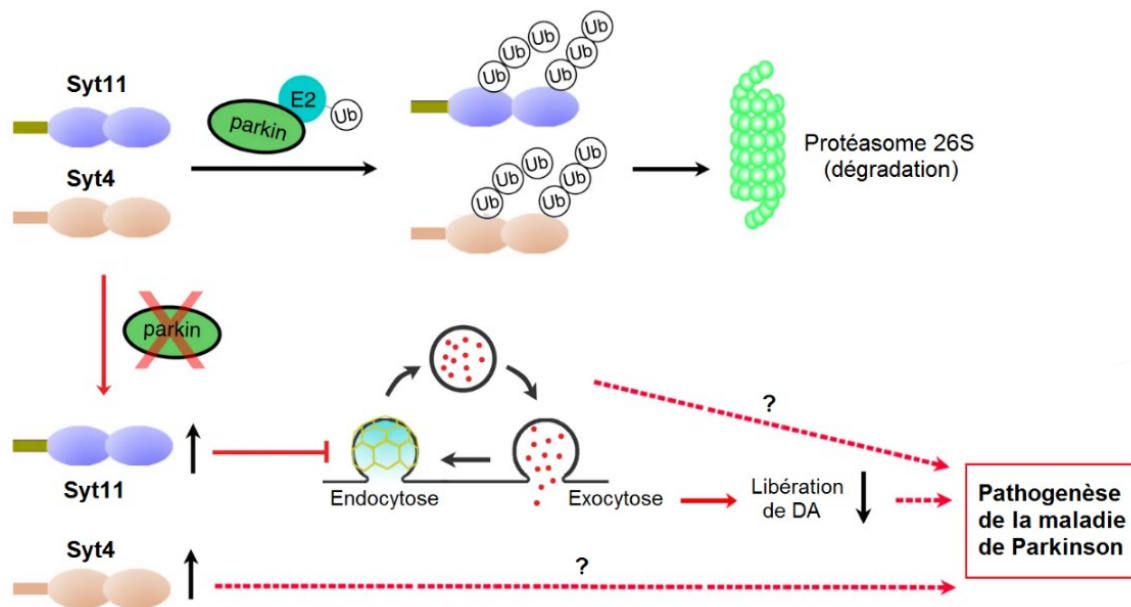
Malgré un haut degré d'homologie entre Syt4 et Syt11 et une incapacité commune à lier le calcium (*Von Poser et al., 1997; Pang et Südhof, 2010*), il semble tout de même que ces deux isoformes présentent des fonctions différentes. Notamment dans l'étude de Wang en 2016, l'expression de Syt4 a échoué à renverser le défaut d'endocytose provoqué par la baisse d'expression de Syt11. Les souris Syt4 KO constitutives présentent par ailleurs une espérance de vie normale contrairement au souris Syt11 KO qui meurent après la naissance, et le KO de Syt4 a été rapporté comme augmentant la LTP (*Dean et al., 2009*) alors que le KO de Syt11 a provoqué l'effet inverse (*Shimojo et al., 2019*). Enfin contrairement à Syt11, la transcription de Syt4 apparaît comme régulée par l'activité neuronale (*Vician et al., 1995; Tocco et al., 1996; Shimojo et al., 2019*).

La fonction de Syt11 dans le système dopaminergique a été quant à elle peu adressée, en particulier en ce qui concerne la libération somatodendritique de DA. L'étude de Mendez en 2011 a en effet échoué à détecter l'ARNm de Syt11 (ainsi que Syt2 et 9) dans les neurones dopaminergiques. Un résultat quelque peu surprenant compte tenu du lien qu'on a pu établir entre cette isoforme et le Parkinson. Le gène *SYT11* est en effet un gène à risque dans la maladie (*Huynh et al., 2003*). Par ailleurs, une étude récente a montré que Syt11 est un substrat de la protéine parkin et joue un rôle clé dans la neurotoxicité des neurones dopaminergiques en lien avec parkin (*Wang et al., 2018*). Cette dernière est une ubiquitine ligase E3, qui régule la dégradation de protéines par le protéasome et l'autophagie mitochondriale (*Shimura et al., 2000; Pickrell et Youle, 2015*). Des mutations de parkin peuvent affecter sa fonction de ligase responsable de formes familiales récessives de la maladie de Parkinson. Dans l'étude de Wang, la surexpression unilatérale de Syt11 dans la SNc de souris a engendré une diminution de la libération de DA dans le striatum ipsilatéral, ainsi qu'une neurodégénérescence tardive des neurones dopaminergiques, associés à des anomalies motrices progressives, controlatérales à la lésion. Cet effet ne fut pas observé par la surexpression de Syt11 dont le domaine C₂B fut excisé.

Par ailleurs, Wang démontra mécaniquement que Syt11 par son activité inhibitrice sur l'endocytose, altère le pool vésiculaire dans le striatum, ce qui diminue la libération de DA (**figure 19**). Chez les souris KO pour parkin, on observe une altération de l'ubiquitylation et du recyclage de Syt11, conduisant à son accumulation dans les neurones. Il en résulte une neurotoxicité analogue à celle retrouvée dans la maladie de Parkinson, un effet qui est renversé chez les souris

Syt11 KO dans la SNc (par approche virale) ou par le KO conditionnel de Syt11 dans les neurones dopaminergiques. Cependant, l'étude de Wang ne renseigne pas sur la localisation subcellulaire précise de Syt11 dans les neurones dopaminergiques. Par ailleurs, l'absence d'ARNm de Syt11 dans l'étude de Mendez invite donc à réévaluer la part que pourrait jouer cette isoforme dans la physiologie des neurones dopaminergiques. Il est à noter de manière intéressante que Syt4 a également été démontrée comme étant un substrat de parkin (Kabayama *et al.*, 2017) et son gène comme Syt11 est un locus à risque dans la maladie de Parkinson (Do *et al.*, 2011).

Figure 19. – Rôle de Syt4 et Syt11 dans un modèle de maladie de Parkinson associé à parkin.



L'activité de ligase E3 de parkin contrôle l'ubiquitinylation de Syt4 et Syt11 et leur dégradation par le protéasome. Une dysfonction de l'activité de parkin par des mutations génétiques ou des facteurs environnementaux conduit à une accumulation de Syt4 et Syt11 dans les neurones dopaminergiques. Syt11 inhibe l'endocytose et le remplissage du pool de vésicules conduisant à une diminution de la libération (axonale) de DA et probablement l'initiation de la pathogenèse de la maladie de Parkinson par des mécanismes encore inconnus. À noter que l'impact de l'accumulation de Syt11 sur la libération de DA au niveau somatodendritique n'a pas été évalué. L'effet de l'accumulation de Syt4, dont le lien avec la libération STD a été démontré, n'a quant à lui pas encore été exploré dans le contexte de la maladie de Parkinson. Adapté de Wang *et al.*, 2018.

1.3.7. Fonctions de la libération somatodendritique

Les fonctions de la libération somatodendritique de DA dans le mésencéphale sont peu connues, mais il a été proposé qu'une de celles-ci est l'activation des autorécepteurs D2. Il est en effet aujourd'hui bien accepté que l'activation du récepteur D2 permet la régulation de la fréquence et du mode de décharge des neurones dopaminergiques (*Lacey et al., 1988; Chiodo, 1992; Pucak and Grace, 1994; Yung et al., 1995; Falkenburger et al., 2001; Beckstead et al., 2004; Gentet and Williams, 2007; Zhou et al., 2009; Gantz et al., 2013*) et ainsi à la régulation de la libération axonale dans le striatum (*Kalivas et Duffy, 1991; Santiago et Westerink, 1991*). L'auto-inhibition locale via l'activation du D2 constitue également une boucle de rétroaction négative qui limite la libération somatodendritique de DA en elle-même (*Cragg et Greenfield, 1997*).

De plus, la DA libérée dans la SNc et la VTA peut également agir sur les récepteurs présynaptiques de type D1 que l'on retrouve sur les terminaisons GABAergiques et glutamatergiques, ce qui permet de moduler la libération de ces neurotransmetteurs (*Miyazaki et Lacey, 1998; Radnikow et Misgeld, 1998; Koga et Momiyama, 2000*). Par exemple, la libération STD de DA peut agir au niveau des récepteurs D1 des terminaisons striato-nigrales GABAergiques arrivant dans la SNr (voie dopaminergique dite directe), ce qui a pour conséquence d'améliorer la libération de GABA à partir de ces axones. Il en résulte une inhibition locale des neurones de la SNr qui sont eux-mêmes majoritairement des neurones GABAergique de projection en direction du thalamus, ce qui renforcerait ainsi l'activation motrice par la voie nigrostriée (*Radnikow et Misgeld, 1998; Trevitt et al., 2001*). De fait, la libération somatodendritique, au même titre que la libération axonale, peut réguler les comportements moteurs (*Robertson et Robertson, 1989; Timmerman et Abercrombie, 1996; Crocker, 1997; Bergquist et al., 2003; Andersson et al., 2006; Schoffelmeyer et al., 2011; Mebel et al., 2012*).

Le rôle critique de la voie striato-nigrée dans le mouvement est démontré par les déficits moteurs observés dans la maladie de Parkinson qui est caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques de cette voie (*Wichmann et DeLong, 1996*). Cependant, on ignore toujours dans quelle mesure la libération STD de DA peut influencer le tableau clinique de la maladie de Parkinson. Depuis des décennies, l'attention de la recherche s'est portée sur la perte de la libération de DA dans les terminaisons du striatum, et sur les tentatives de restaurer les niveaux de DA dans cette région, que ce soit par traitement à la L-DOPA (*Fahn, 2015*) ou par greffe de tissu mésencéphalique

(Parmar et al., 2019). De façon surprenante, la contribution de la libération de STD de DA à la fonction des ganglions de la base dans le contexte de la maladie de Parkinson n'a guère retenu l'attention jusqu'à présent. Cela peut être en partie dû au fait que nous en savons encore peu sur le mécanisme qui déclenche la libération STD DA. Les travaux de Mendez en 2011 suggèrent un mécanisme exocytotique distinct de la libération axonale, avec la participation des isoformes 4 et 7 de la Syt. Notre premier objectif dans cette thèse a donc été de valider ces rôles de Syt4 et Syt7 dans le cerveau intact, une découverte pouvant ouvrir la porte à la possibilité de perturber ou bloquer la libération de STD DA *in vivo* et de déterminer ainsi les rôles fonctionnels de la libération de STD DA dans le cerveau, au niveau physiologique et pathologique.

À titre d'exemple, il a été rapporté que la diminution des performances motrices chez des singes âgés était due à une baisse de la libération somatodendritique plutôt que terminale, démontrant une implication fonctionnelle directe de la libération STD dans le contrôle de la fonction motrice (Gerhardt et al., 2002). Au niveau pathologique, des études ont montré que la libération STD de DA était préservée plus longtemps que la libération axonale à la suite de lésions à la 6-OHDA (Hoffman et al., 1997; Sarre et al., 2004). Par ailleurs, une autre étude a montré que l'expression de Syt4 et Syt7 était augmentée à la suite de telles lésions (Glavan et Zivin, 2005). En accord avec ces études, un nouveau modèle murin de maladie de Parkinson avec une perturbation partielle de la fonction du complexe I mitochondrial a présenté un parkinsonisme progressif, avec une atteinte neuronale débutant au niveau axonal, sensible à la lévodopa, mais qui n'a émergé qu'après la perte ultérieure de la libération de DA dans la SNc (González-Rodríguez et al., 2021). Ainsi, il se pourrait que la libération somatodendritique de DA contribue de manière positive à la maintenance des fonctions motrices, dans les stades précoces de la maladie de Parkinson.

1.3.8. Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse a porté sur les mécanismes moléculaires de la libération de DA au niveau somatodendritique et au niveau axonal, avec une emphase sur le rôle des senseurs calciques de la famille des Syts dans ce processus. Je me suis concentré notamment sur l'implication des Syts 1, 4 et 7, en faisant l'hypothèse que Syt4 et 7 sont impliquées dans la libération somatodendritique de DA *in vivo*, tandis que Syt1 serait responsable de la libération axonale. Ce travail est en continuité de travaux de recherche effectués antérieurement dans le laboratoire du Dr Trudeau, qui a mis en évidence cette libération somatodendritique de DA et le rôle des Syt 1, 4, 7 *in vitro*. Le

but était de caractériser cette libération *ex vivo* et *in vivo* et de créer des modèles animaux pouvant possiblement servir à de futures études en lien avec la maladie de Parkinson.

Chapitre 2 – Rôle de Syt4 et Syt7 dans la libération de dopamine (article I)

L'article qui suit présente les travaux basés sur les découvertes précédentes du laboratoire Trudeau, ayant montré la participation des isoformes 4 et 7 des Syts, comme senseurs calciques pour la libération somatodendritique de DA *in vitro*. Nous avons tout d'abord optimisé la détection de la libération STD en combinant la voltammétrie cyclique en tranche avec le blocage pharmacologique des autorécepteurs et des mécanismes de recapture. Nous avons également testé une stratégie de stimulation optogénétique pour déclencher sélectivement la libération STD. En utilisant ces approches, nous avons montré que la libération STD dans la VTA présente de faibles capacités, une dépendance au calcium identique à la libération axonale et n'est pas affectée dans les souris KO constitutives pour Syt4 et Syt7. Nous avons cependant constaté que la perte d'expression de Syt4 et Syt7 chez des souris double KO réduit la libération STD de DA d'environ 50%, tout en laissant la libération axonale intacte ce qui suggère un rôle fonctionnel redondant de ces isoformes *in vivo*.

Contribution des auteurs :

- **Benoît Delignat-Lavaud** : conception et exécution de toutes les expériences, à l'exception de la qRT PCR, analyse et interprétation des données, écriture du manuscrit.
- **Charles Ducrot** : expérience de qRT PCR
- **Willemieke Kouwenhoven** : aide à la génération des souris double KO/génotypage
- **Nina Feller** : immunohistochimie en tranche
- **Louis-Éric Trudeau** : conception, ressources, supervision du projet et écriture du manuscrit

Article soumis et disponible en libre accès sur <https://www.biorxiv.org/>

doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.427983>

Implication of synaptotagmins 4 and 7 in activity-dependent somatodendritic dopamine release in the ventral midbrain

Benoît Delignat-Lavaud^{1,2,3}, Charles Ducrot^{1,2,3}, Willemieke Kouwenhoven^{1,2,3}, Nina Feller^{1,2,3}, 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

Corresponding author:

Dr. Louis-Éric Trudeau

Department of pharmacology and physiology

Faculty of Medicine

Université de Montréal

louis-eric.trudeau@umontreal.ca

514-343-5692

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr. Wade G Regehr (Harvard Medical School) for providing the Syt7 constitutive KO mice, Dr. Gary Miller (Columbia University) for providing the VMAT2 antibody and Marie-Josée Bourque for managing the mouse colonies and performing mouse genotyping. This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant RGPIN-2020-05279) to LET. LET also received support from the Krembil Foundation, the Brain Canada Foundation and the Henry and Berenice Kaufmann Foundation. BDL received a graduate student award from Parkinson Canada. CD received a studentship from the Fonds de la Recherche du Québec en Santé (FRQS).

Author contributions

All authors participated in the design of experiments, data analysis, and interpretation. CD performed qRT PCR experiments. NF performed double immunostaining experiments. WK designed genotyping primers. BDL and LET wrote the manuscript.

2.1. Abstract

Dopamine (DA) neurons can release DA not just from axon terminals, but also from their somatodendritic (STD) compartment through a mechanism that is still incompletely understood. Using voltammetry in mouse mesencephalic brain slices, we find that STD DA release has low capacity, is stable in response to electrical but not optogenetic train pulses and shows a calcium sensitivity that is comparable to that of axonal release. We find that the molecular mechanism of STD DA release differs from axonal release with regards to the implication of synaptotagmin (Syt) calcium sensors. While individual constitutive knock-out Syt4 and Syt7 is not sufficient to reduce STD DA release, removal of both isoforms reduces this release by ~50%, leaving axonal release unimpaired. Our work unveils clear differences in the mechanisms of STD and axonal DA release.

Significance statement

Dopamine (DA) neurons in the mesencephalon can release DA from their somatodendritic (STD) compartment, although the precise mechanism of release is still poorly understood. Here, by using voltammetry on mouse brain slices, we explore several characteristics of the STD DA release and uncover a role of synaptotagmin family calcium sensors Syt4 and Syt7 in STD DA release. Constitutive deletion of both genes reduces STD DA release without affecting axonal release, suggesting the implication of a distinct molecular machinery.

2.2. Introduction

Dopamine (DA) neurons of the mesencephalon play a key role in motor control, motivated behaviors and cognition (*Schultz, 2007; Surmeier et al., 2014*). DA neurons can release DA not only from axon terminals by a classical exocytosis mechanism (*Mendez et al., 2011; Liu and Kaeser, 2019*), but also through their somatodendritic (STD) compartment, as demonstrated by multiple approaches including *in vivo* microdialysis, fast scan cyclic voltammetry (FSCV) and patch-clamp recordings of D2 receptor mediated currents in the ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra pars compacta (SNc) (*Beckstead et al., 2004; Cragg et al., 1997; Elverfors et al., 1997; Rice et al., 1997*). Although there is limited direct evidence, STD DA release is believed to be implicated in regulating the excitability of DA neurons through activation of STD D2 autoreceptors (*Beckstead et al., 2004*). It has also been suggested to regulate motor behaviors (*Andersson et al., 2006; Bergquist et al., 2003*), mainly by local activation of D1 receptors.

The molecular mechanism of STD DA release is still unclear. A vesicular exocytotic-like mechanism has been proposed, in agreement with the fact that STD DA release is activity-dependent (*Beckstead et al., 2004; Fortin et al., 2006; Robertson et al., 1991*), reserpine-sensitive (*Beckstead et al., 2004; Rice et al., 1994; Heeringa and Abercrombie, 1995*), calcium-dependent (*Beckstead et al., 2004; Chen and Rice, 2001; Fortin et al., 2006; Yee et al., 2019; Rice et al., 1994; Ford et al., 2010*), and blocked by botulinum neurotoxins, which disrupt SNARE-*proteins* (*Bergquist et al., 2002; Fortin et al., 2006; Ovsepian and Dolly, 2011*). Although large pools of DA-containing small clear synaptic vesicles are not found in the dendrites of DA neurons, this cellular compartment contains pleiomorphic vesicles that bear the vesicular monoamine transporter (VMAT2), suggesting that they could be sites of DA storage in dendrites (*Melissa J. Nirenberg et al., 1996*). Together, these findings suggest that, although there may be some fundamental differences between the mechanisms of terminal and STD DA release, both implicate a form of exocytosis.

Although STD DA release is calcium-dependent, conflicting results exist regarding the calcium-sensitivity of STD DA release in comparison with axonal release. Previous studies performed in guinea pig reported that STD DA release persists at extracellular calcium concentrations as low as 0.5 mM, a concentration at which axonal release is typically abrogated

from most axon terminals (*Chen and Rice, 2001; Fortin et al., 2006*). In contrast, previous work performed with mouse tissue and indirectly detecting STD DA release using the patch-clamp technique and STD D2 receptor activation, reported that axonal and STD DA release display a similar calcium-dependency (*Beckstead et al., 2007, 2004; Courtney et al., 2012; Ford et al., 2010, 2009; Gantz et al., 2013*). Here, we reexamined this question in mouse brain slices after optimizing direct detection of STD DA using FSCV.

Finally, an important outstanding question is the identification of the molecular mechanisms of STD DA release. Building on previous *in vitro* work suggesting possible roles of Syt4 and Syt7 (*Mendez et al., 2011*), in the present study we tested the hypothesis that Syt4 and Syt7 play a key role in STD DA release in the intact brain by quantifying STD DA release in Syt4, Syt7 and Syt4/7 double constitutive knockout (KO) mice.

2.3. Materials and methods

Animals

Male and female mice of 11-12 weeks were used in this study. For optogenetic experiments, B6;129S-Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze/J} (Ai32, The Jackson Laboratory, stock 012569, USA) homozygote mice expressing a floxed H134R variant of the light-activated channelrhodopsin-2 were bred with homozygote B6.SJL-Slc6a3^{tm1.1(cre)Bkmm/J} (DAT^{IREScree}, The Jackson Laboratory, stock 006660, USA) expressing the cre recombinase under control of the DAT promoter, allowing channelrhodopsin-2 to be expressed selectively in DA neurons. Heterozygote DAT^{IREScree} mice were also used for experiments in which Chr2 was virally expressed. Constitutive knock-out mice for Syt4 (129S6.129X1(B6)-Syt4^{tm1Hahe/J}, The Jackson Laboratory, stock #012400, USA) (Ferguson *et al.*, 2000), Syt7 (Chakrabarti *et al.*, 2003) and WT littermates were bred from heterozygous crosses or crossed with each other to obtain double KO mice. Genotyping for Syt4 KO mice was determined using specific primers to target the wild type Syt4 sequence (primers Syt4WT-fwd and Syt4WT-rev) and the neomycin cassette within the mutated allele (primers neo-fwd and Syt4WT-rev) – Syt4WT-fwd: CACTTCCCTCACGTCAGAGGAG, - Syt4WT-rev: GCAAGGAGAGCTCTTGGATGTG, - neo-fwd: AACCCACTGCTCGACATTGGG. Genotyping for Syt7 KO mice was performed using specific primers to target the wild type Syt7 sequence (Syt7WT-fwd: CATCCTCCACTGGCCATGAATG; - Syt7WT-rev: GCTTCACCTTGGTCTCCAG) and the neomycin cassette within the mutated allele (neo-fwd: CTTGGGTGGAGAGGCTATTC; neo-rev: AGGTGAGATGACAGGAGATC), as provided by Jackson. Genotyping for Syt7 mutation in combined Syt4/7 KO mice was determined using another set of specific primers due to overlapping sequences within the neomycin cassette used in both the Syt4 and Syt7 mouse lines: - neo-fwd: CTTGGGTGGAGAGGCTATTC and Syt7WT exon4: AGTGTCCAGGCTCCC. Experiments were performed blind with regards to animal genotype, with the exception of Syt4 KO mice, because these KO mice could be easily identified due to a neurodevelopmental alteration of the anterior commissure and corpus callosum (**Fig. S1C**). All procedures involving animals and their care were conducted in accordance with the Guide to care and use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care. The experimental protocols were approved by the animal ethics committees of the Université de Montréal. Housing

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

Stereotaxic injections

6-7 week-old DAT^{IRESc^{re}} mice were anesthetized with isoflurane (Aerrane; Baxter, Deerfield, IL, USA) and fixed on a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). A small hole was drilled in the exposed skull and a Hamilton syringe was used for the injections. For optogenetic experiments, an adeno-associated virus (AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP, 4,2x10¹² vg/mL, UNC GTC Vector Core, USA) was injected bilaterally at the following injection coordinates [AP (anterior–posterior; ML (medial–lateral); DV (dorsal-ventral), from bregma], to infect neurons in the entire ventral mesencephalon: AP -3.0 mm; ML +/- 1.0 mm; DV -4.5 mm. Animals recovered in their home cage and were closely monitored for 3 days. The animals were used one month after injection, allowing maximal expression of ChR2 in DA neurons. Success of the injection was visually validated each time during the slicing of the brains by visualizing the presence of the eYFP reporter.

Brain slice preparation and solutions

Acute brain slices from 11-12-week-old male or female mice were used for the FSCV recordings. When possible, matched pairs of WT and KO mice were used on each experimental day. 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 VTA and/or striatal brain slices of 300 μm thickness were prepared with a 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 placed 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 (Warner Instruments, USA). 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 to each experiment.

Fast scan cyclic voltammetry recordings

Optically or electrically evoked DA release was measured by FSCV using a 7 μm diameter carbon-fiber electrode placed into the tissue ~ 100 μm below the surface. A bipolar electrode (Plastics One, Roanoke, VA, USA) or an optical fiber connected to a 470 nm wavelength LED was placed ~ 200 μm away. Carbon-fiber electrodes were fabricated as previously described (Martel et al., 2011). Briefly, carbon fibers (Goodfellow Cambridge Limited, UK) of 7 μm in diameter were aspirated into ethanol-cleaned glass capillaries (1.2 mm O.D., 0.68 mm I.D., 4 inches long; World Precision Instruments, FL, USA). The glass capillaries were then pulled using a P-2000 micropipette puller (Sutter Instruments, Novato, USA), dipped into 90°C epoxy for 30s (Epo-Tek 301, Epoxy Technology, MASS, USA) and cleaned in hot acetone for 3s. The electrodes were heated at 100°C for 12h and 150°C for 5 days. Electrodes were polished and filed with potassium acetate at 4M and potassium chloride at 150 mM. The protruding carbon fibers were cut using a scalpel blade under direct visualization to a length allowing to obtain maximal basal currents of 100 to 180 nA.

The electrodes were calibrated with 1 μM 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, Canada). The potential of the carbon fiber electrode was scanned at a rate of 300 V/s according to a 10 ms triangular voltage wave (-400 to 1000 mV vs Ag/AgCl) with a 100 ms sampling interval, using a CV 203BU headstage preamplifier (Molecular Devices) and a Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, USA). Data were acquired using a Digidata 1440a analog to digital converter board (Molecular Devices, USA) connected to a computer using Clampex (Molecular Devices, USA). Slices were left to stabilize for 20 min before any electrochemical recordings. After positioning of the bipolar stimulation electrode or the optical probe and carbon fiber electrodes in the tissue, single pulses (400 μA or 30 mW, 1ms,) or pulses-train (30 pulses at 10 Hz) were applied to the tissue to trigger DA release. For evaluating the calcium dependency of axonal and STD release, variations of calcium concentrations in the aCSF (0, 0.5 and 2.4 mM) were compensated by changing the concentration of MgSO_4 to keep divalent cation levels equivalent.

Immunohistochemistry

For Syt immunolabelling experiments, 40 μm brain slices from animals perfused with 4% paraformaldehyde (in PBS, pH-7.4) were cut with a cryostat (Leica CM 1800; Leica Canada) and

used for immunohistochemistry (IHC). Because selective and specific Syt4, Syt7 and VMAT2 antibodies were all from the same host species (rabbit), a double labeling protocol adapted from Jackson ImmunoResearch (<https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/protocols/double-labeling-same-species-primary>) with monovalent Fab fragments was used. After a PBS wash, the tissue was permeabilized, nonspecific binding sites blocked (goat serum 5%) and incubated overnight at room temperature with the first primary antibody rabbit anti-Syt1 (1/1000; #105002, Synaptic Systems, Germany), rabbit anti-Syt7 (1/1000; #105173, Synaptic Systems, Germany) or anti-Syt4 (1/1000; kind gift for Dr. Mitsunori Fukuda, Japan), followed by 2h with a first secondary antibody (rabbit Alexa Fluor-488–conjugated, 1:500, Invitrogen, Canada). A blocking step of antigenic sites from the first primary and secondary antibody combination was performed thereafter by a 3h incubation with normal serum from the same species as the primary antibody, followed by a blocking solution (goat block: PBS, Triton X100 0.3%, bovine serum albumin 5%) with 50 µg/mL of unconjugated monovalent Fab fragments against the host of the primary antibody, overnight, at room temperature and under agitation. Slices were then washed, and a second labeling was performed with a second primary antibody (rabbit anti-VMAT2, 1:1000, gift of Dr. Gary Miller, Columbia University), and a second secondary antibody (rabbit Alexa Fluor-546–conjugated, 1:500, Invitrogen). For each IHC staining, a control group was included, with the full protocol except for omission of the second primary antibody. A classical immunostaining protocol was used for the knockout validation of Syt4 and Syt7 antibodies (**Fig. S1**), using mouse anti-tyrosine hydroxylase (Millipore Sigma; 1:1000) and rabbit anti-Syt4 or anti-Syt7 primary antibodies (Synaptic Systems; 1:1000) subsequently detected using Alexa Fluor-488-conjugated and Alexa Fluor-546-conjugated secondary antibodies (Invitrogen; 1:500).

Confocal Imaging

Images were acquired using an Olympus Fluoview FV1000 point-scanning confocal microscope (Olympus, Canada) with a 60x oil-immersion objective (NA 1.35). Images acquired using 488nm and 546 nm laser excitation were scanned sequentially to prevent non-specific bleed-through signal. All image analysis was performed using ImageJ (National Institutes of Health) software.

Reverse Transcriptase-quantitative PCR

We used RT-qPCR to quantify the amount of mRNA encoding Syt1, 4, 5, 7 and 11 in brain tissue from P70 Syt4^{+/+} and Syt4^{-/-} mice and P70 Syt7^{+/+} and Syt7^{-/-} mice. Adult whole brains were harvested and homogenized in Trizol solution, then RNA extraction was performed using RNAeasy Mini Kit (Quiagen, Canada) according to the manufacturer's instructions. Total purified RNA (40 ng) was reverse-transcribed in a total of 20 μ l including 1 μ l of dNTP, 1 μ l of random hexamer, 4 μ l of 5X buffer 5X, 2 μ l of dithiothreitol (DTT), 1 μ l of RNase-Out and 1 μ l of the Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase enzyme (MML-V, Invitrogen). Quantitative PCR was carried out in a total of 15 μ l consisting of 3 μ l cDNA, 7.5 μ l SYBER green PCR master mix (Quanta Biosciences, USA), 10 μ M of each primer, completed up to 15 μ l with RNA-free water. qPCR was performed on a Light Cycler 96 machine (Roche, Canada) using the following procedure: 10 min at 95°C; 40 cycles of 30s at 95°C, 40s at 57°C and 40s at 72°C; 1 cycle of 15s at 95°C, 15s at 55°C and 15s at 95°C. Results were analyzed with Light Cycler 96 software and Excel. Primers used for qPCR were as follows: Syt1: 5' GTGGCAAGACACTGGTGAT 3' and 5' CTCAGGACTCTGGAGATCG 3' ; Syt4: 5' CACTTCCCTCACGTCAGAGGAG 3' and 5' GCAAGGAGAGCTCTTGGATGTG 3'; Syt5: 5' GTCCCATACGTGCAACTAGG 3' and 5' AACGGAGAGAGAAGCAGATG 3'; Syt7: 5' CCAGACGCCACACGA 3' and 5' CCTTCCAGAAGGTCT 3'; Syt11: 5' CTTGTATGGCGGGGTCTTGT 3' and 5' ATACGCCCCAGCTTTGATGA 3' and GAPDH: 5' GGAGGAAACCTGCCAAGTATGA 3' and 5' TGAAGTCGCAGGAGACAACC 3'.

Statistics

Data are presented as mean +/- SEM. The level of statistical significance was established at $p < 0.05$ in one-way ANOVAs with appropriate post-hoc tests and two-tailed t tests, performed with Prism 8 software (GraphPad, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.0001$).

2.4. Results

2.4.1. D2 autoreceptors and DAT limit the extent of somatodendritic dopamine overflow in mouse VTA slices

Although detectable in other rodent models such as the guinea pig (*Cragg et al., 1997; Rice et al., 1997; Courtney et al., 2012*), STD DA release in mouse mesencephalic slices has previously been found to be challenging to reliably detect. As mouse models are convenient for genetic manipulations, the difficulty to use this model has greatly slowed progress in better understanding the mechanisms and roles of this form of DA release. We therefore first aimed to optimize detection of STD DA release in mouse VTA slices by comparing different modes of stimulation and physiological parameters that may limit its extent.

We first compared optogenetic and electrical stimulation of DA neurons and examined whether blocking DA D2 autoreceptors and the DA transporter (DAT) might increase extracellular DA levels and make STD DA easier to detect (**Fig. 1**). Previous studies performed in brain slices or *in vivo* typically triggered STD DA release using extracellular electrical stimulation (*Robinson et al., 2003; Yang and Michael, 2007; John and Jones, 2007*). In recent years, optical stimulation using channelrhodopsin-2 (ChR2) or other opsin variants has increasingly been used to obtain more selective activation of DA neuron axons (*O'Neill et al., 2017*). However, to this date, this approach has not been used to selectively trigger STD DA release in FSCV experiments.

We compared single pulse optical (1 ms, 470 nm) and electrical (1 ms, 400 μ A) stimulation. Recordings were performed in the VTA of DAT^{IRESc^{re}}/Ai32 mice, in which ChR2 is conditionally expressed in all DA neurons, and in DAT^{IRESc^{re}} heterozygote mice injected in the VTA with a floxed hChR2-EYFP AAV construct. Neither stimulation conditions, either in normal aCSF (**Fig. 1C and 1E**) or in the presence of DAT (nomifensine, 5 μ M) and D2 receptor blockade (sulpiride, 5 μ M) (**Fig. 1D and 1F**) yielded detectable evoked elevations of extracellular DA (**Fig. 1C, 1D**). Previous works in guinea pig demonstrated that STD DA release is frequency dependent up to 10 Hz (*Rice et al., 1997*). The use of pulse trains (30 pulses at 10 Hz) in the presence of nomifensine and sulpiride allowed reliable detection of STD DA release in VTA slices, both for electrical stimulation (average peak DA levels of 340 nM +/- 28 nM in DAT^{IRESc^{re}}/Ai32 mice [n = 15] and

333 nM +/- 32 nM in DAT^{IREScree} mice infected with Chr2 AAV [n = 10]) and for optical stimulation (average peak DA levels at 187 nM +/- 17 nM in DAT^{IREScree}/Ai32 mice [n = 15] and 220 nM +/- 37 nM in DAT^{IREScree} mice infected with Chr2 AAV [n = 10]) (**Fig. 1D, 1F**). Although peak levels of activity-dependent STD DA release in the two strains of mice tended to be higher with electrical compared to optical stimulation (compare bar graphs in panels D and F), the difference between the two modes of stimulation was significant only in the Ai32 mouse strain.

Reuptake through the DAT and the D2 autoreceptor are two well-known regulators of extracellular DA levels and DA release (*Congar et al., 2002; Kristensen et al., 2011; Lebowitz and Khoshbouei, 2020*). We next examined the effect of DAT and D2 receptor blockade individually to determine whether a combined block of reuptake and autoreceptor function was required to reliably detect STD DA release in response to electrical train stimulation (**Fig. 1H and 1I**). Each recording was performed after 15 min of nomifensine or sulpiride or a combination of the two. Baseline levels of evoked DA in the absence of antagonist were small, but still reliably detected (49 nM +/- 6 nM). Blockade of DAT or D2 receptors individually, caused a significant increase in the maximal amplitude of evoked STD DA release in the VTA (+296% +/- 42% for nomifensine alone [n = 6], +210% +/- 28% for sulpiride alone [n = 6]), while a combination of the two drugs caused a cumulative increase of 500% +/- 51% [n = 12], thus demonstrating that the two manipulations were mostly additive and that a combined blockade of both membrane proteins allowed to maximally increase the detected signal.

2.4.2. Optogenetic stimulation reveals strong use-dependent attenuation of evoked STD DA release in the VTA

In previous work evaluating STD DA release using FSCV in guinea pig brain slices, repeated electrical stimuli were found to cause stimulation-dependent attenuation (*Rice et al., 1997*). This represents a limiting factor to further examine the mechanisms of this form of release. Using optical or electrical train stimulation in the presence of nomifensine and sulpiride, we therefore evaluated the stability of STD DA release in response to a series of 7 consecutive stimuli with an interstimulus interval of 5 min. STD DA overflow evoked by optical stimulation showed a robust and progressive decrease in peak amplitude in response to repeated stimuli (**Fig. 2A**). By the end of the stimulation protocol, evoked STD DA release decreased by approximately 50% in DAT^{IREScree}/Ai32 mice and by approximately 40% in virally transduced DAT^{IREScree} mice.

Compatible with the possibility that this decrement was due to rundown of releasable pools of DA, a 20 min delay before a final stimulation revealed a clear partial recovery. Strikingly, electrical stimulation failed to cause a similarly extensive rundown of STD DA, with only a modest, non-significant decrease of less than 20% detected by the last of 7 stimuli (**Fig. 2B**). Although speculative, this lack of rundown in response to electrical stimulation could be due to the recruitment of afferent fibers that secrete neuromodulators able to maintain vesicular DA stores for longer periods of time. Due to this favorable characteristic of electrical stimulation on the stability of STD DA release, all further experiments were performed with this mode of stimulation.

2.4.3. DA release in the VTA and striatum exhibit similar calcium dependency

As we aimed to examine the role of Syt calcium sensors in STD DA release and in the face of conflicting previous results regarding the extent to which STD DA release depends upon extracellular calcium levels in comparison with axonal release (*Ford et al., 2010; Chen et al., 2011*), we next evaluated the release of DA at 0, 0.5 and 2.4 mM of extracellular calcium in the VTA (**Fig. 3A**). In comparison, we also examined axonal DA release in the dorsal striatum, a region that has been most closely examined in this respect. As expected, based on previous results (*Chen and Rice, 2001*), no release was detected in the striatum at 0 mM and 0.5 mM calcium, neither in response to single pulses or to trains (n = 13 slices/7 mice) (**Fig. 3B**).

In the VTA, STD DA release, here again triggered in the presence of nomifensine/sulpiride (5 μ M), was also undetectable at 0 mM extracellular calcium (n = 13 slices/7 animals), but readily detectable at 0.5 mM (n = 16 slices/10 mice) (**Fig. 3C**), as previously described in the guinea pig (*Chen et al., 2011*). Evoked STD DA release at this concentration of calcium was however only 19% of the signal detected at 2.4 mM calcium (76 nM +/- 10 nM, compared to 388 nM +/- 39 nM) (**Fig. 3C, 3D**). Recordings performed in striatal slices in the presence of nomifensine and sulpiride similarly revealed detectable DA release at 0.5 mM calcium (**Fig. 3B**) (1.1 μ M +/- 0.17 μ M, n = 13 slices/7 mice). This represents 16 % of the DA signal detected at 2.4 mM calcium (7 μ M +/- 0.87 μ M) (**Fig. 3B, 3D**). Therefore, under the same experimental conditions, with no influence of DA uptake and D2 autoreceptor activation, evoked STD and axonal DA release show a similar calcium dependency (t-test, p= 0.2744). All further experiments were performed at 2.4 mM calcium.

2.4.4. Dopamine neurons *in vivo* express the calcium-sensors synaptotagmin 1, 4 and 7

Because Syt1 is the main calcium sensor of axonal DA release (*Banerjee et al., 2020; Mendez et al., 2011*), and Syt4 and Syt7 were previously suggested to be critical for STD DA release based on *in vitro* experiments (*Mendez et al., 2011*), we next evaluated the presence and subcellular localization of these Syt isoforms in DA neurons *in vivo* in the mouse brain.

Immunohistochemistry was used to test the hypothesis that Syt4 and Syt7 are present within the cell body and dendrites of DA neurons in close association with compartments containing the vesicular monoamine transporter VMAT2. Due to the impossibility to obtain suitable VMAT2 and Syt antibodies produced in different species, we took advantage of a double labelling protocol allowing the use of two primary antibodies from the same species (rabbit) (**Fig. 4A**). The approach was validated by the observation that in control experiments in which the second primary antibody was omitted, no signal was detected for the second antigen, demonstrating that the second secondary antibody was unable to bind to the first primary antibody after the blocking step. Immunoreactivity for Syt4 showed a clear somatic localization in DA neurons, with a notable overlap with VMAT2 (**Fig. 4B**), with little if any signal in terminals in the striatum. Confirming the specificity of the antibody, signal was absent from Syt4 KO DA neurons (**Fig. S1A**). Syt7 immunoreactivity was found in both the STD region of DA neurons as well as in their terminal region in the striatum (**Fig. 4C**). Syt7 immunoreactivity was strongly reduced in Syt7 KO tissue, although some background signal was still detectable (**Fig. S1B**), suggesting sub-optimal specificity. Finally, Syt1 was undetectable in the soma and dendrites of DA neurons, but highly expressed in the terminals in the striatum, as expected (**Fig. 4D**).

2.4.5. Double knockout of Syt4 and Syt7 strongly reduces STD DA release

Considering the expression of Syt4 and Syt7 in DA neurons and their apparent localization in the STD compartment of these neurons, we hypothesized that evoked STD DA release should be reduced in constitutive Syt4 or Syt7 KO mice. We took advantage of existing mouse models in which the synaptotagmin 4 and 7 genes were interrupted by the insertion of a neomycin cassette in the coding sequences of the calcium binding domains (*Ferguson et al., 2000; Chakrabarti et al., 2003*). These experiments were performed using electrical train stimulation, in the presence of nomifensine and sulpiride. To obtain a thorough understanding of the individual roles of Syt4 and

Syt7, wild-type, heterozygous and KO littermates were compared, and recordings were performed for each mouse in the dorsal striatum, the ventral striatum (nucleus accumbens core and shell) and the VTA. These experiments revealed that axonal and STD DA release in the VTA were not significantly reduced in Syt4 or Syt7 KO mice (**Fig. 5A, 5B**).

Because both isoforms are expressed in the STD domain of DA neurons, we aimed to determine if compensatory upregulation of the Syt isoforms occurred in individual knock-out mouse lines during development. Using qPCR and mRNA obtained from whole brain, we found that total levels of Syt4 mRNA were unchanged in Syt7 KO mice (**Fig. S1D**). Similarly, the levels of Syt7 mRNA were unchanged in Syt4 KO mice (**Fig. S1E**). To examine if functional compensation can explain the lack of change in STD DA release in the single KO mice, we next crossed these two mouse lines to generate a double Syt4 and Syt7 KO. As controls, Syt4^{-/-}; Syt7^{+/-} and Syt7^{-/-}; Syt4^{+/-} animals were also used for the FSCV recordings. Once again, no significant differences were found in the dorsal and ventral striatum (**Fig. 5C**). The evoked increase in extracellular DA concentration in the VTA of Syt4^{-/-}; Syt7^{+/-} (0.334 μM \pm 0.04 μM ; n = 6 mice) was similar to controls from the Syt4 and Syt7 individual KO mouse lines (respectively 0.341 μM \pm 0.044 μM ; n = 8 mice and 0.32 μM \pm 0.046 μM ; n = 5 mice). However, in Syt4^{-/-}; Syt7^{-/-} animals, we found a robust and significant \approx 50% decrease of STD DA release (0.162 μM \pm 0.014 μM ; n = 9 mice). Interestingly, the Syt7^{-/-}; Syt4^{+/-} animals also showed a systematic decrease of STD DA release of about \sim 50% (0.175 μM \pm 0.016 μM ; n = 8 mice). Together these results argue that both Syt4 and Syt7 isoforms contribute to STD DA release, with functional compensation of one isoform by the other. These data also suggest a more critical role of Syt7 compared to Syt4 because the presence of only one Syt7 allele is sufficient to support STD DA release in the absence of Syt4.

2.5. Discussion

Characteristics of STD DA release

In the present study, we performed the first characterization of optically evoked STD DA release in the mouse mesencephalon using a combination of optogenetics and FSCV and compared its characteristics to release evoked by electrical stimulation. As previously reported by others, we found that the absolute levels of evoked DA overflow detected in this region were low compared to levels detected in the terminal region in the striatum. Furthermore, we found that a robust STD DA release signal could only be detected using pulse-train stimulation (**Fig. 1**). Blocking DA reuptake and D2 autoreceptor function using nomifensine and sulpiride caused a 5-fold increase in peak signal amplitude, thus making detection of this signal straightforward and reproducible.

Using a repeated stimulation protocol, we found that repeated optical stimulation with a 5 min interval produces a strong rundown of STD DA release, whereas no such attenuation was seen with electrical stimulation (**Fig. 2**). This finding is compatible with previous results reporting a similar rundown of optically-evoked axonal DA release in the striatum (*O'Neill et al., 2017*). It is conceivable that the decrease observed with optical stimulation results from a low reserve capacity of STD DA release due to limited vesicular reserve pools in the soma and dendrites of DA neurons. It is equally possible that in response to electrical stimulation, a similar decrement is not observed because this form of stimulation recruits neuromodulatory mechanisms that result from activation of afferent terminals releasing 5-HT, NE, acetylcholine, glutamate, GABA or neuropeptides onto DA neurons (*O'Neill et al., 2017; Nair-Roberts et al., 2008*). Further experiments will be required to test this hypothesis.

Our experiments comparing the impact of changes in extracellular calcium levels of STD and axonal DA release argue for the existence of a similar calcium dependency for both forms of release (**Fig. 3**). These findings are compatible with previous results obtained in mice, which were performed using patch-clamp recordings and the measurement of STD D2 receptor (*Ford et al., 2010*). It is possible that a different conclusion was reached in guinea pig brain slices because some aspect of the STD DA release mechanism is different in that species (*Chen and Rice, 2001*). Another possibility is that a component of axonal DA release is also included in the signal detected in the VTA. This possibility has been raised previously (*Chen et al., 2011*), but the available anatomical data actually suggests that DA-containing axonal varicosities are scarce in the VTA

(Deutch *et al.*, 1988; Bayer and Pickel, 1990), except in the context of compensatory axonal sprouting associated with partial lesions (Fernandes Xavier *et al.*, 1994). It would nonetheless be useful to revisit this question with additional anatomical and physiological work in the future to provide more quantitative data.

Contribution of Syt4 and Syt7 to STD DA release

Finally, we examined the contribution of the synaptotagmin isoforms Syt4 and Syt7 to STD DA release. Acute downregulation of either isoform has previously been shown *in vitro* to severely reduce STD DA release, with no similar effect of Syt1 downregulation (Mendez *et al.*, 2011). Although our present immunostaining results provide further support for the presence of these proteins in the STD compartment of DA neurons (Fig. 4), we failed to detect any significant decrease in evoked STD DA release in VTA slices prepared from individual constitutive Syt4 or Syt7 KO mice (Fig. 5). It is possible that contrarily to acute downregulation with siRNAs, constitutive gene deletion may lead to homeostatic compensation leading to elevated levels of Syt4 in Syt7 KO mice and vice versa. It is also possible that *in vitro* models lack homeostatic compensatory mechanisms that are recruited *in vivo*. Another possibility is that Syt4 and Syt7 play similar roles in supporting STD DA release and that one can compensate for absence of the other in the context of constitutive gene deletion. The robust decrease in activity-dependent STD DA release in Syt4/Syt7 double KO mice supports this interpretation. In Syt4^{-/-} ; Syt7^{-/-} mice or Syt7^{-/-} ; Syt4^{+/-} mice, we observed a two-fold decrease of STD DA release. This decrease was surprisingly not found in Syt4^{-/-} ; Syt7^{+/-} mice, strongly suggesting that Syt7 plays a particularly important role and that a single allele of Syt7 is sufficient to sustain STD DA release in the absence of Syt4.

Considering that in the absence of both Syt4 and Syt7, approximately half of total evoked STD DA release remain, we hypothesise that other calcium sensors or other forms of release are also involved. The main synaptotagmin isoform Syt1 might be of interest, as it was recently demonstrated as the main calcium sensor for fast striatal DA release *in vivo* (Banerjee *et al.*, 2020), validating previous work showing an important role of Syt1 in axonal DA release *in vitro* (Mendez *et al.*, 2011). Interestingly, evoked STD DA release measured as D2-IPSCs was recently reported to be abolished in mice with conditional deletion of the active zone protein RIM, while spontaneous release remained intact (Robinson *et al.*, 2019). However, the subcellular localization of RIM in the STD compartment of DA neurons is currently undetermined. Here, we have not found strong

evidence for localization of Syt1 in the STD domain of DA neurons, but further examination of this possibility with higher resolution techniques would be relevant.

Our results bring to light an important role of Syt7 in both the dendritic and axonal compartment of DA neurons. Together with our observation that the two forms of DA secretion exhibit the same calcium dependency, our findings raise the interest of further evaluating a possible contribution of an axonal compartment to DA release within the mesencephalon, in line with previous speculations in the guinea pig model (*Rice and Patel, 2015*). Further studies of STD and axonal DA release in mouse models defective for combinations of Syt1, Syt4 and Syt7 would seem warranted. Together our work provides a new perspective on the mechanisms of STD DA release and raises new opportunities to disentangle the respective roles of axonal and STD DA release in DA-dependent physiological mechanisms and behaviors.

2.6. References

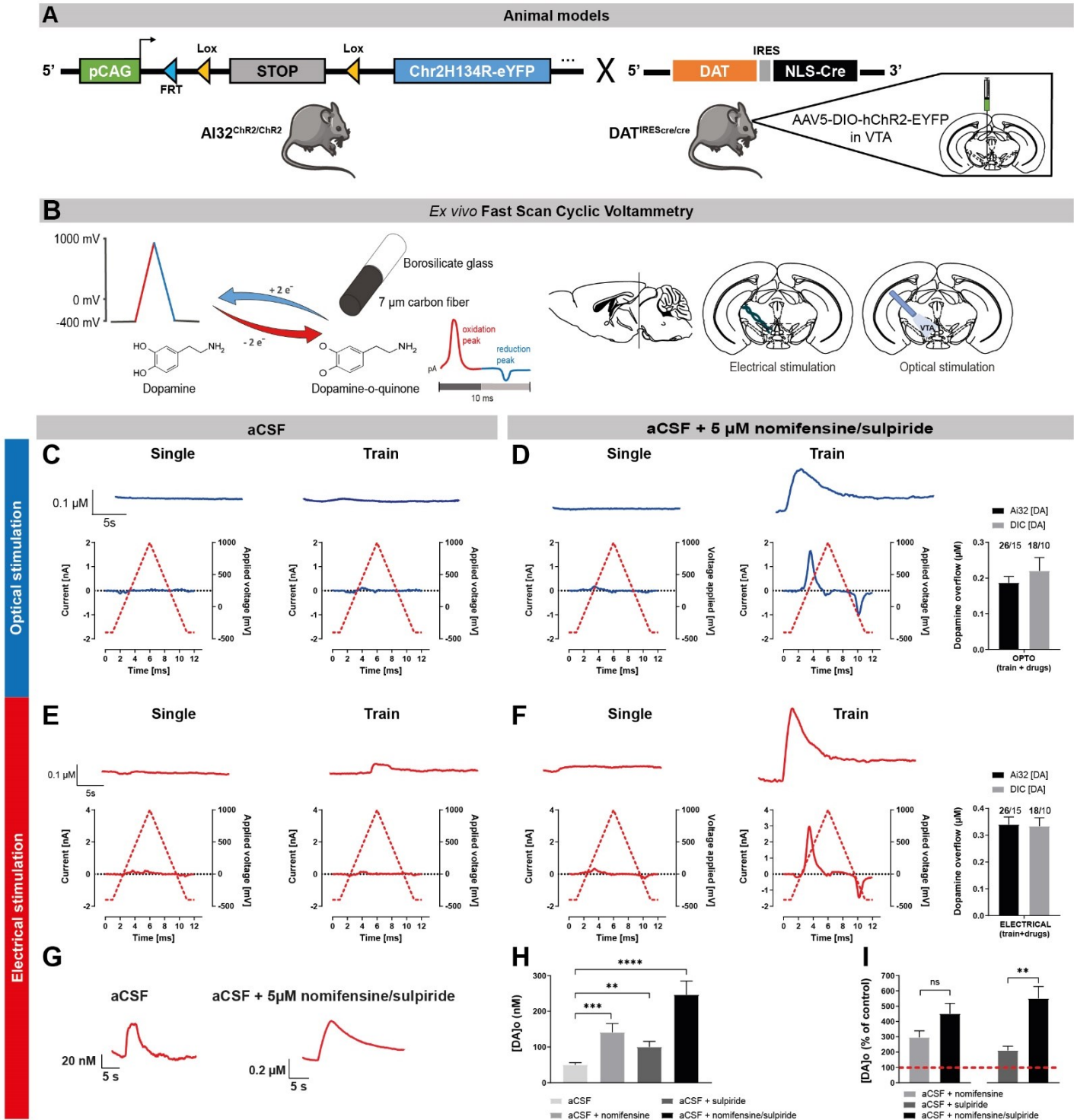
- Andersson, D.R., Nissbrandt, H., Bergquist, F., 2006. Partial depletion of dopamine in substantia nigra impairs motor performance without altering striatal dopamine neurotransmission. *Eur. J. Neurosci.* 24, 617–624. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04953.x>
- Banerjee, A., Lee, J., Nemcova, P., Liu, C., Kaeser, P.S., 2020. Synaptotagmin-1 is the Ca²⁺ sensor for fast striatal dopamine release. *eLife* 9, e58359. <https://doi.org/10.7554/eLife.58359>
- Bayer, V.E., Pickel, V.M., 1990. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 10, 2996–3013.
- Beckstead, M.J., Ford, C.P., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2007. Presynaptic regulation of dendrodendritic dopamine transmission. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1479–1488. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05775.x>
- Beckstead, M.J., Grandy, D.K., Wickman, K., Williams, J.T., 2004. Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron* 42, 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.019>
- Bergquist, F., Niazi, H.S., Nissbrandt, H., 2002. Evidence for different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. *Brain Res.* 950, 245–253. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03047-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03047-0)
- Bergquist, F., Shahabi, H.N., Nissbrandt, H., 2003. Somatodendritic dopamine release in rat substantia nigra influences motor performance on the accelerating rod. *Brain Res.* 973, 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02555-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02555-1)
- Chakrabarti, S., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., Marks, C.B., Miyake, K., Liston, D.R., Fowler, K.T., Gorelick, F.S., Andrews, N.W., 2003a. Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *J. Cell Biol.* 162, 543–549. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305131>
- Chen, B.T., Patel, J.C., Moran, K.A., Rice, M.E., 2011. Differential calcium dependence of axonal versus somatodendritic dopamine release, with characteristics of both in the ventral tegmental area. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 39. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00039>
- Chen, B.T., Rice, M.E., 2001. Novel Ca²⁺ Dependence and Time Course of Somatodendritic Dopamine Release: Substantia Nigra versus Striatum. *J. Neurosci.* 21, 7841–7847. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07841.2001>
- Congar, P., Bergevin, A., Trudeau, L.-E., 2002. D2 Receptors Inhibit the Secretory Process Downstream From Calcium Influx in Dopaminergic Neurons: Implication of K⁺ Channels. *J. Neurophysiol.* 87, 1046–1056. <https://doi.org/10.1152/jn.00459.2001>
- Courtney, N.A., Mamaligas, A.A., Ford, C.P., 2012. Species Differences in Somatodendritic Dopamine Transmission Determine D2-Autoreceptor-Mediated Inhibition of Ventral Tegmental Area Neuron Firing. *J. Neurosci.* 32, 13520–13528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2745-12.2012>
- Cragg, S., Rice, M.E., Greenfield, S.A., 1997. Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J. Neurophysiol.* 77, 863–873. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.863>
- Cragg, S.J., Hawkey, C.R., Greenfield, S.A., 1997. Comparison of serotonin and dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area: region and species differences. *J. Neurochem.* 69, 2378–2386. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062378.x>

- Deutch, A.Y., Goldstein, M., Baldino, F., Roth, R.H., 1988. Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 537, 27–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb42095.x>
- Elverfors, A., Jonason, J., Jonason, G., Nissbrandt, H., 1997. Effects of drugs interfering with sodium channels and calcium channels on the release of endogenous dopamine from superfused substantia nigra slices. *Synap. N. Y. N* 26, 359–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199708\)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199708)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5)
- Ferguson, G.D., Anagnostaras, S.G., Silva, A.J., Herschman, H.R., 2000. Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5598–5603. <https://doi.org/10.1073/pnas.100104597>
- Fernandes Xavier, F.G., Doucet, G., Geffard, M., Descarries, L., 1994. Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 59, 77–87. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90100-7)
- Ford, C.P., Gantz, S.C., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2010. Control of extracellular dopamine at dendrite and axon terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 6975–6983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1020-10.2010>
- Ford, C.P., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2009. The Time Course of Dopamine Transmission in the Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 29, 13344–13352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3546-09.2009>
- Fortin, G.D., Desrosiers, C.C., Yamaguchi, N., Trudeau, L.E., 2006. Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *J. Neurochem.* 96, 1740–1749. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03699.x>
- Gantz, S.C., Bunzow, J.R., Williams, J.T., 2013. Spontaneous inhibitory synaptic currents mediated by a G protein-coupled receptor. *Neuron* 78, 807–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.013>
- Heeringa, M.J., Abercrombie, E.D., 1995. Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *J. Neurochem.* 65, 192–200. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65010192.x>
- John, C.E., Jones, S.R., 2007. Fast Scan Cyclic Voltammetry of Dopamine and Serotonin in Mouse Brain Slices, in: Michael, A.C., Borland, L.M. (Eds.), *Electrochemical Methods for Neuroscience, Frontiers in Neuroengineering*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Kristensen, A.S., Andersen, J., Jørgensen, T.N., Sørensen, L., Eriksen, J., Loland, C.J., Strømgaard, K., Gether, U., 2011. SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacol. Rev.* 63, 585–640. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000869>
- Lebowitz, J.J., Khoshbouei, H., 2020. Heterogeneity of dopamine release sites in health and degeneration. *Neurobiol. Dis.* 134, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104633>
- Liu, C., Kaeser, P.S., 2019. Mechanisms and regulation of dopamine release. *Curr. Opin. Neurobiol.* 57, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.01.001>
- Martel, P., Leo, D., Fulton, S., Bérard, M., Trudeau, L.-E., 2011. Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PloS One* 6, e20402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020402>
- Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Fasano, C., Kortleven, C., Trudeau, L.-E., 2011. Somatodendritic Dopamine Release Requires Synaptotagmin 4 and 7 and the Participation of Voltage-gated Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* 286, 23928–23937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.218032>

- Nair-Roberts, R.G., Chatelain-Badie, S.D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J.P., Ungless, M.A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.046>
- Nirenberg, M.J., Chan, J., Liu, Y., Edwards, R.H., Pickel, V.M., 1996. Ultrastructural Localization of the Vesicular Monoamine Transporter-2 in Midbrain Dopaminergic Neurons: Potential Sites for Somatodendritic Storage and Release of Dopamine. *J. Neurosci.* 16, 4135–4145. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-13-04135.1996>
- O’Neill, B., Patel, J.C., Rice, M.E., 2017. Characterization of Optically and Electrically Evoked Dopamine Release in Striatal Slices from Digenic Knock-in Mice with DAT-Driven Expression of Channelrhodopsin. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 310–319. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.6b00300>
- Ovsepian, S.V., Dolly, J.O., 2011. Dendritic SNAREs add a new twist to the old neuron theory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19113–19120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017235108>
- Rice, M.E., Cragg, S.J., Greenfield, S.A., 1997. Characteristics of electrically evoked somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *J. Neurophysiol.* 77, 853–862. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.853>
- Rice, M.E., Patel, J.C., 2015. Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0185>
- Rice, M.E., Richards, C.D., Nedergaard, S., Hounsgaard, J., Nicholson, C., Greenfield, S.A., 1994. Direct monitoring of dopamine and 5-HT release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Exp. Brain Res.* 100, 395–406. <https://doi.org/10.1007/bf02738400>
- Robertson, G.S., Damsma, G., Fibiger, H.C., 1991. Characterization of dopamine release in the substantia nigra by in vivo microdialysis in freely moving rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 2209–2216.
- Robinson, B.G., Cai, X., Wang, J., Bunzow, J.R., Williams, J.T., Kaeser, P.S., 2019. RIM is essential for stimulated but not spontaneous somatodendritic dopamine release in the midbrain. *eLife* 8, e47972. <https://doi.org/10.7554/eLife.47972>
- Robinson, D.L., Venton, B.J., Heien, M.L.A.V., Wightman, R.M., 2003. Detecting Subsecond Dopamine Release with Fast-Scan Cyclic Voltammetry in Vivo. *Clin. Chem.* 49, 1763–1773. <https://doi.org/10.1373/49.10.1763>
- Schultz, W., 2007. Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722>
- Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernández-Chacón, R., Lao, Y., Südhof, T.C., 2001. Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis. *Neuron* 30, 459–473.
- Surmeier, D.J., Graves, S.M., Shen, W., 2014. Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson’s disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 29, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.07.008>
- Yang, H., Michael, A.C., 2007. In Vivo Fast-Scan Cyclic Voltammetry of Dopamine near Microdialysis Probes, in: Michael, A.C., Borland, L.M. (Eds.), *Electrochemical Methods for Neuroscience*, *Frontiers in Neuroengineering*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Yee, A.G., Forbes, B., Cheung, P.-Y., Martini, A., Burrell, M.H., Freestone, P.S., Lipski, J., 2019. Action potential and calcium dependence of tonic somatodendritic dopamine release in the Substantia Nigra pars compacta. *J. Neurochem.* 148, 462–479. <https://doi.org/10.1111/jnc.14587>

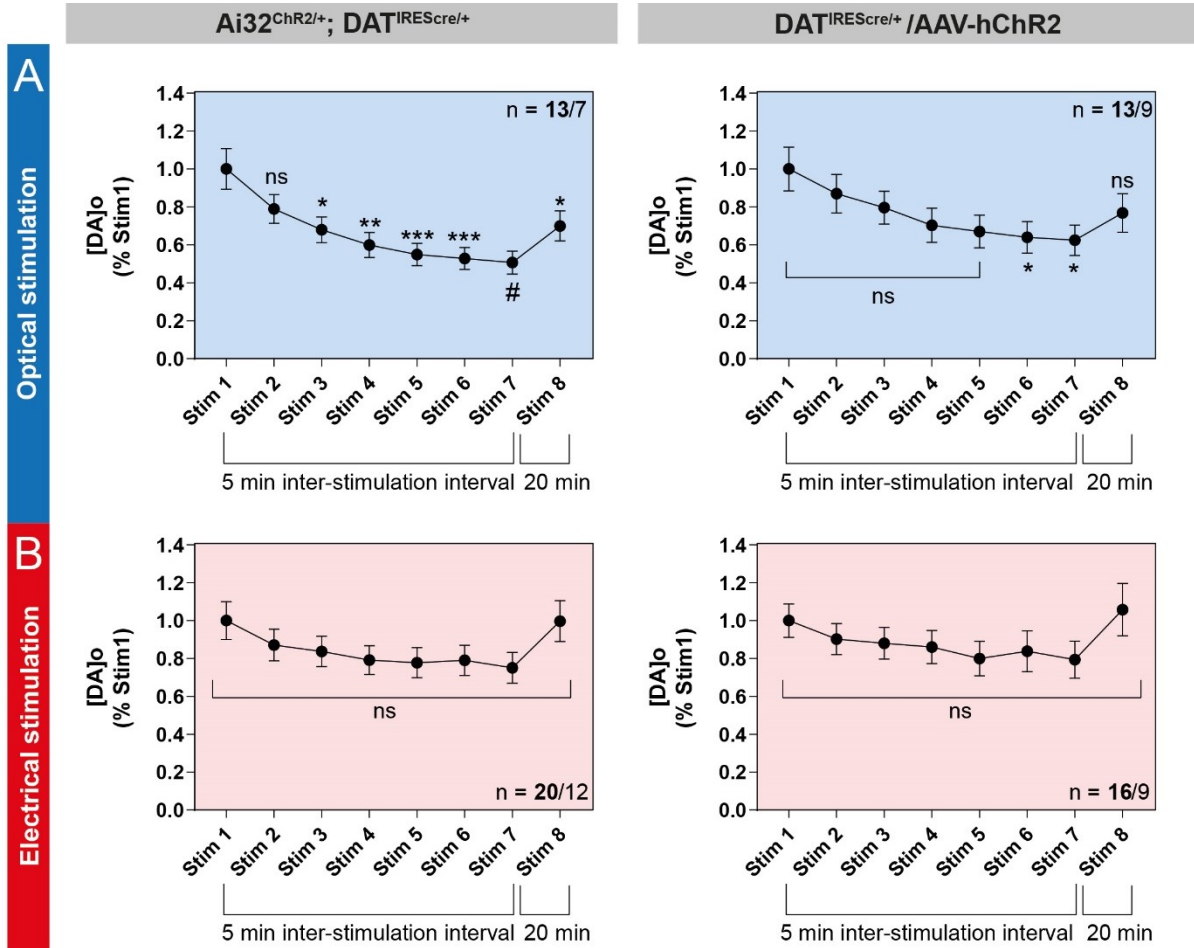
2.7. Figures

Figure 1. – Optogenetic and electrical stimulation trigger comparable levels of somatodendritic dopamine release in mouse VTA slices.



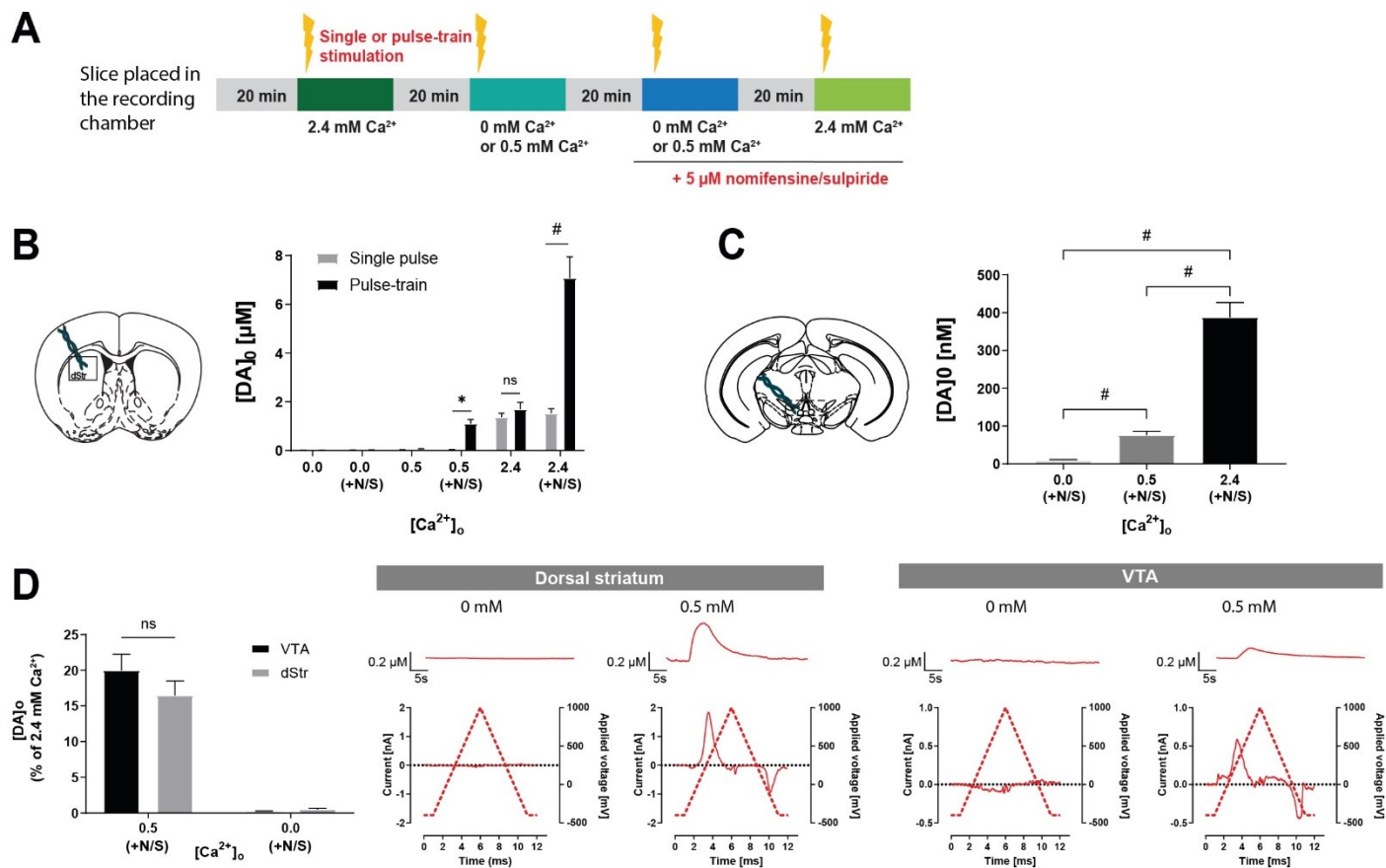
(A) Animal models used for optogenetic experiments. We either used a mouse line expressing a floxed version of light-activated channelrhodopsin (ChR2) crossed with a DA-specific Cre driver line ($DAT^{IREScre}$) or performed stereotaxic injections of AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP virus in the VTA of $DAT^{IREScre}$ mice to selectively express ChR2 in DA neurons. **(B)** Fast Scan Cyclic Voltammetry was used to monitor DA levels. A voltage ramp of -400 to 1000 mV vs Ag/AgCl at 300 V/s was used, with a 100 ms sampling interval. Recordings were made in coronal slices containing the VTA and DA release was triggered by either optical stimulation with a 470 nm blue light LED or with a bipolar stimulating electrode. **(C)** Representative traces (top) and voltammograms (bottom) of responses obtained in the VTA with 1 pulse (1ms) of blue light («single pulse»), in the presence of normal ACSF or a pulse-train of stimulation (30 pulses of 1 ms at 10 Hz), in the presence of normal ACSF. **(D)** Same as C, in the presence of ACSF + a DAT blocker (nomifensine, 5 μ M) and an antagonist of D2 autoreceptors (sulpiride, 5 μ M). **(E)** Representative traces (top) and voltammograms (bottom) of responses obtained in the VTA with 1 electrical pulse (1 ms, 400 μ A) or a pulse-train (30 electrical pulses of 1 ms at 10 Hz, 400 μ A), in the presence of aCSF. **(F)** Same as E, but in presence of aCSF + 5 μ M nomifensine/sulpiride. **(G-H-I)** Effect of nomifensine/sulpiride on STD DA release measured by pulse-train electrical stimulation.

Figure 2. – Optogenetic stimulation reveals strong use-dependent attenuation of evoked STD DA release in the VTA.



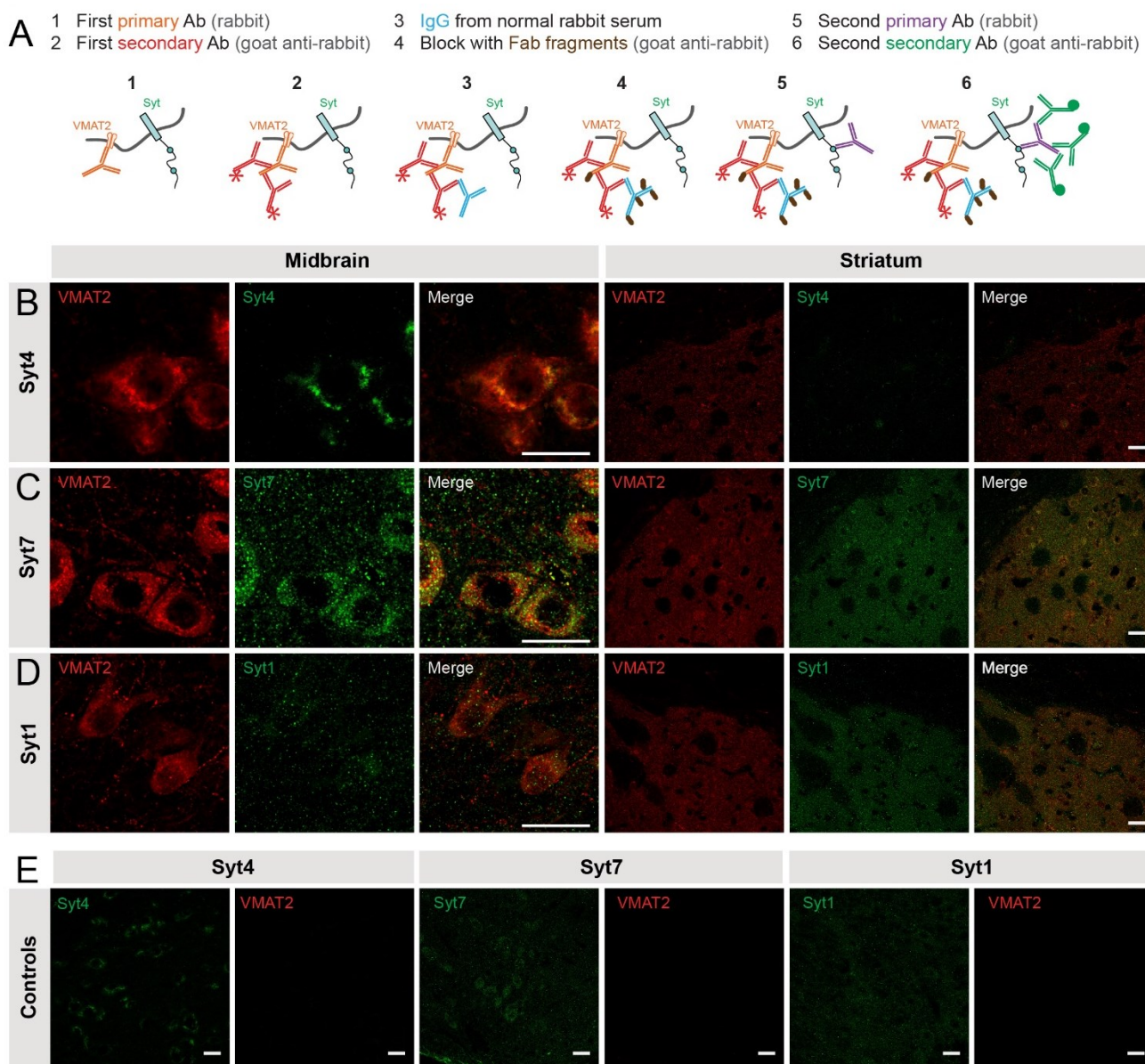
(A) Average [DA]_o peaks normalized to the first stimulation in the VTA of Ai32 and injected DAT^{IREScr} mice evoked by optical stimulation trains (30 pulses of 1 ms at 10 Hz, 470 nm blue light LED). (B) Same with pulse-train electrical stimulation (30 pulses of 1 ms at 10 Hz, 400 μ A). Each record was obtained in aCSF + 5 μ M nomifensine/sulpiride with 1 recording site per slice; inter-stimulus interval between stims 1-7 = 5 min, inter-stimulus interval between stim 7 and 8 = 20 min. Error bars represent +/- S.E.M. and the statistical analysis was carried out by a 1-way ANOVA followed by a Dunnett test (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). The bold number represents the number of slices recorded / number of animals used.

Figure 3. – Somatodendritic and axonal dopamine release exhibit a similar calcium dependency.



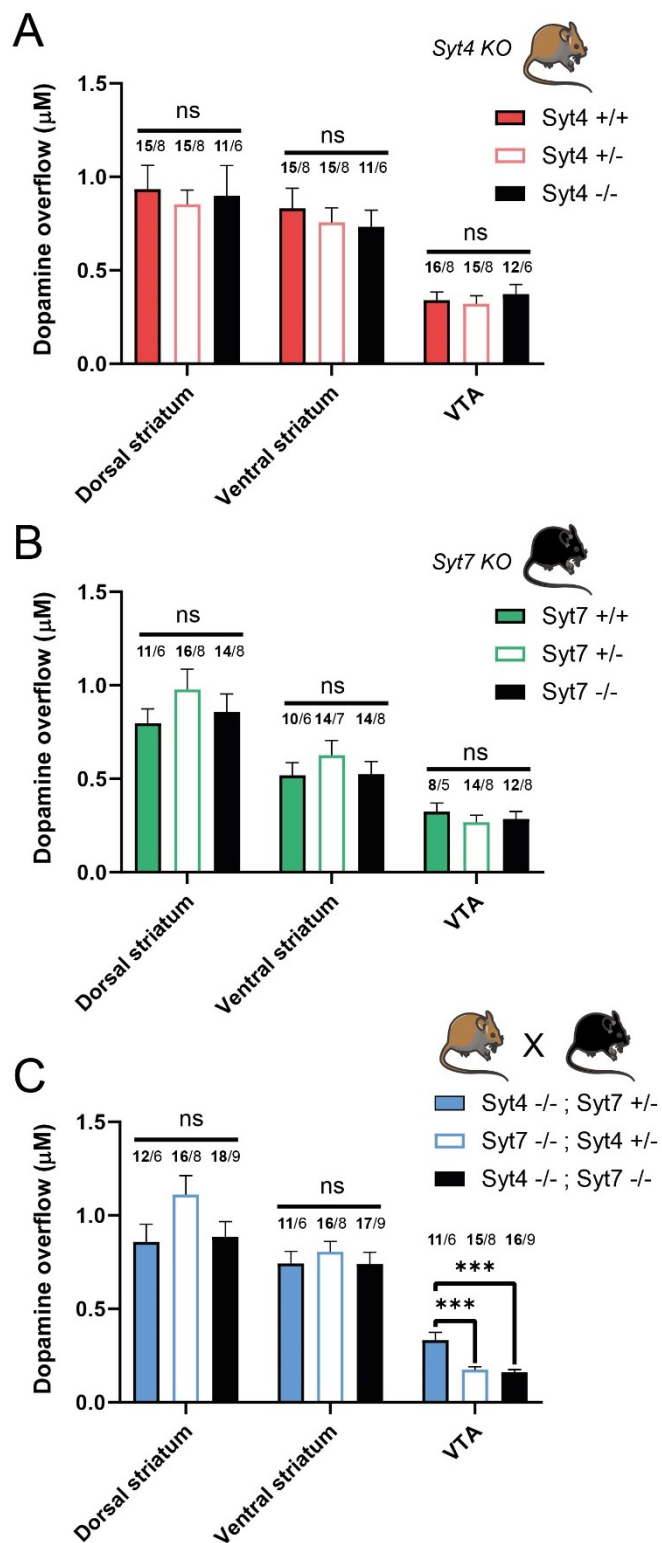
(A) Protocol used for FSCV recordings. (B) Schematic representation of a striatal slice and average of [DA]_o peaks obtained with single or pulse-train stimulations at 0, 0.5 and 2.4 mM of extracellular calcium in the aCSF, with or without addition of 5 μM of nomifensine/sulpiride. (C) Schematic representation of a VTA slice and average [DA]_o peaks obtained with pulse-train stimulations at 0, 0.5 and 2.4 mM of extracellular calcium in the aCSF containing 5 μM of nomifensine/sulpiride. (D) Average [DA]_o peaks normalized to 2.4 mM of calcium obtained in the VTA and dorsal striatum (dStr) with pulse-train stimulation and aCSF containing nomifensine/sulpiride. Representative traces and voltammograms are shown on the right. Error bars represent +/- S.E.M. The statistical analysis was carried out by a 1-way ANOVA followed by a Dunnett test (ns, non-significant; ***, $p < 0.001$; #, $p < 0.0001$).

Figure 4. – Dopamine neurons express the calcium-sensors synaptotagmin 1, 4 and 7.



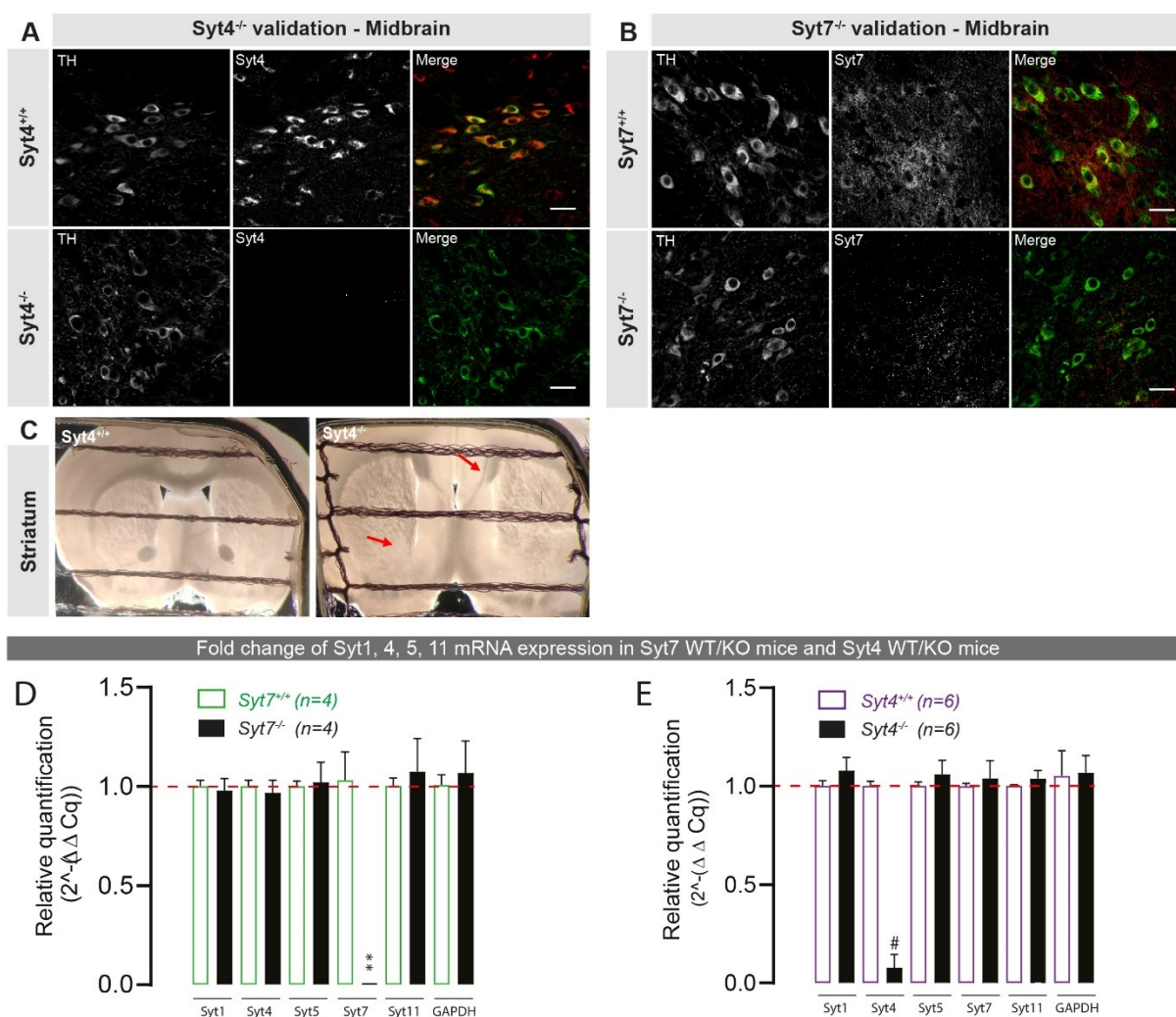
(A) Protocol used for double immunostaining for two primary antibodies from the same host (adapted from a Jackson ImmunoResearch protocol). Use of normal rabbit serum and unconjugated Fab fragments for blocking after the first secondary. **(B-D)** Immunohistochemistry of midbrain and striatal slices of adult $DA^{T^{REScre}}$ heterozygote mice showing colocalization of VMAT2 and either Syt1, Syt4 or Syt7 in DAergic neurons. Scale bar = 20 μ m. **(E)** Control images were obtained using the full protocol without the use of the second primary antibody (in the midbrain).

Figure 5. – Double KO of Syt4 and Syt7 strongly reduces STD DA release.



(A) Average [DA]o peaks (μM) obtained in the dorsal striatum, ventral striatum and VTA of *Syt4* constitutive knock-out mice bred from heterozygous crosses. (B) Same for the constitutive *Syt7* knock-out mice. (C) Same for double *Syt4/Syt7* KO mice (*Syt4*^{-/-}; *Syt7*^{-/-}) and heterozygotes control animals (*Syt4*^{-/-}; *Syt7*^{+/-} and *Syt7*^{-/-}; *Syt4*^{+/-}). Each recording from the VTA was obtained in aCSF + 5 μM nomifensine/sulpiride with 2 recording sites per slice and pulse-train stimulation (30 pulses, 10 Hz, 400 μA). Each recording from the striatum was obtained in normal aCSF with 6 recording sites per slice for the dorsal striatum and 4 for the ventral (nucleus accumbens core and shell), using single pulse stimulation (1ms, 400 μA). Error bars represent +/- S.E.M. The statistical analysis was carried out by 1-way ANOVA followed by a Tukey test (ns, non-significant; ***, $p < 0.001$; #, $p < 0.0001$). The bold number represents the number of slices recorded / number of animals used.

Figure 6. – Supplementary figure 1: Knockout validation of *Syt4* and *Syt7* antibodies



(A) TH and Syt4 immunostaining of adult Syt4 WT (+/+) and KO (-/-) mesencephalon showing the specificity of the Syt4 antibody. **(B)** TH and Syt7 immunostaining of adult Syt7 WT (+/+) and KO (-/-) mice showing a strong reduction in signal, with some remaining background signal in the KO animals. The anti-Syt7 antibody was generated against a recombinant peptide comprising amino acids 46–133 of the unique Syt7 spacer domain (Sugita et al., 2001b). The targeting vector generated a stop codon after the position coding for amino acid 83 in exon 4, thus making it possible that the remaining signal corresponds to a short, mutated protein comprising the luminal domain, the transmembrane region, and only a fraction of the spacer domain. **(C)** Representative striatal brain slices recorded during FSCV experiments in WT and Syt4 constitutive KO mice. Red arrow indicates obvious neurodevelopmental defects at the level of the anterior commissure and the corpus callosum in KO animals. **(D and E)** Relative changes of mRNA levels measured by qPCR in Syt7 (C) and Syt4 (D) KO mice. Ct values (mean of duplicate repeats) of Syt1, 4, 5, 7 and 11 mRNA levels were normalized to the Ct value of GAPDH in the same samples. Error bars represent +/- S.E.M. Statistical analysis was carried out using a t-test (WT vs KO samples) (**, $p < 0.01$; #, $p < 0.0001$)

Chapitre 3 – Rôle de Syt1 dans la libération de dopamine (article II)

L'article qui suit présente les résultats de notre deuxième étude visant à caractériser le rôle de la synaptotagmine 1 dans la libération axonale et somatodendritique de dopamine. Nous avons pour cela généré un KO conditionnel de cette isoforme dans le système dopaminergique (Syt1 cKO^{DA}). Lors de l'initiation de ce projet en 2019, le senseur calcique impliqué dans la libération rapide de DA n'avait pas encore été découvert. Cependant, le groupe de Pascal Kaeser généra de son côté le KO conditionnel de Syt1 dans le système DA et démontra en premier son rôle dans la libération phasique de DA au niveau des terminaisons axonales (*Banerjee et al., 2020*). En développant ce modèle en parallèle nous avons néanmoins :

(1) validé par voltammétrie cyclique que Syt1 est le senseur calcique principal impliqué dans l'exocytose de dopamine au niveau des terminaisons du striatum.

(2) démontré la contribution de Syt1 dans la libération phasique de DA au compartiment somatodendritique et suggéré l'existence d'une composante axonale dans le mésencéphale ventral.

(3) montré la résilience importante des fonctions motrices dépendantes de la dopamine dans un contexte de quasi-abolition de la libération phasique de DA, ainsi que les adaptations du système dopaminergique qui en découlent.

Ces données étendent ainsi grandement les données du groupe de Kaeser et apportent notamment un nouvel éclairage sur les raisons pour lesquelles une perte importante de l'innervation dopaminergique est nécessaire pour commencer à observer les dysfonctionnements moteurs typiques dans la maladie de Parkinson.

Contribution des auteurs

- **Benoît Delignat-Lavaud** : conception et exécution de toutes les expériences, à l'exception de la microdialyse/HPLC, Western blot et cultures/ICC ; analyse et interprétation des données, écriture du manuscrit.
- **Jana Kano** : acquisition et analyse de données (IHC)
- **Charles Ducrot** : acquisition et analyse de données (ICC)
- **Ian Massé** : acquisition et analyse de données (microdialyse intracérébrale)
- **Sriparna Mukherjee** : acquisition et analyse de données (Western blot)
- **Nicolas Giguère** : acquisition et analyse de données (stéréologie)
- **Luc Moquin** : acquisition de données (HPLC)
- **Catherine Lévesque** : acquisition de données (autoradiographie)
- **Samuel Burke Nanni** : analyse de données (ICC)
- **Marie-Josée Bourque** : acquisition de données (cultures)
- **Pedro Rosa-Neto** : révision
- **Daniel Lévesque** : révision et analyse de données (autoradiographie)
- **Louis De Beaumont** : révision
- **Louis-Éric Trudeau** : conception, ressources, supervision du projet et écriture du manuscrit

Article soumis et disponible en libre accès sur <https://www.biorxiv.org/>

doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.15.460511>

Article en révision chez Nature Communications (décembre 2021)

The calcium sensor synaptotagmin-1 is critical for phasic dopamine release, but is dispensable for motor behaviors in mice

Benoît Delignat-Lavaud^{1,2,3}, Jana Kano^{*1,2,3}, Charles Ducrot^{*1,2,3}, Ian Massé⁴, Sriparna Mukherjee^{1,2,3}, Nicolas Giguère^{1,2,3}, Luc Moquin⁵, Catherine Lévesque⁶, Samuel Burke Nanni^{1,2,3}, Marie-Josée Bourque^{1,2,3}, Pedro Rosa-Neto⁵, Daniel Lévesque⁶, Louis De Beaumont⁴, 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),

⁴Hôpital du Sacré-Cœur-de-Montréal, CIUSSS NIM, Université de Montréal,

⁵The Douglas Research Centre, McGill University,

⁶Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

Montréal, QC, Canada

*Equal contribution

Corresponding author:

Dr. Louis-Éric Trudeau

Department of pharmacology and physiology

Faculty of Medicine

Université de Montréal

louis-eric.trudeau@umontreal.ca

514-343-5692

3.1. Summary

Midbrain dopamine (DA) neurons, a population of cells that are critical for motor control, motivated behaviors and cognition, release DA via an exocytotic mechanism from both their axonal terminals and their somatodendritic (STD) compartment. Here we conditionally deleted the calcium sensor synaptotagmin-1 (Syt1) in DA neurons (cKO^{DA} mice) to determine the roles of activity-dependent DA release. While evoked axonal DA release was largely abrogated in the striatum and strongly reduced in the ventral mesencephalon, Syt1 cKO^{DA} mice showed intact performance in multiple DA-dependent motor tasks, suggesting that activity-dependent DA release is dispensable for basic motor functions. Strikingly, basal extracellular levels of DA in the striatum were unchanged, suggesting that a basal tone of extracellular DA is sufficient to sustain basic movement. We also found multiple adaptations in the DA system of cKO^{DA} mice, similar to those happening at early stages of Parkinson's disease. Overall, while validating Syt1 as the critical calcium sensor controlling evoked-DA release, our study reveals the striking resilience of DA-dependent motor functions in the context of a near-abolition of phasic DA release, shedding new light on why extensive loss of DA innervation is required to reveal motor dysfunctions in Parkinson's disease.

Keywords: dopamine, exocytosis, synaptotagmin, somatodendritic, movement

3.2. Introduction

The neuromodulator dopamine (DA) plays a key role in motor control, motivated behaviors and cognition (*Schultz, 2007; Surmeier et al., 2014*). Blockade of DA receptors severely impairs most motor behaviors (*Hauber, 1996*) and a severe loss of DA in the striatum and other brain regions leads to the characteristic motor dysfunctions of Parkinson's disease (PD). It is striking that in PD, motor dysfunctions only appear when the striatum is severely denervated and that DA replacement therapy with L-DOPA is able to restore motor functions by boosting DA production in the remaining, sparse DA axonal fibers (*Mercuri and Bernardi, 2005*). Such observations are puzzling and ill-understood and suggest the possibility that a minimal basal tone of DA, coupled with adaptations to the DA system to boost its sensitivity, are sufficient to maintain motor functions (*Golden et al., 2013*).

Compatible with such observations, DA is thought to act in the brain as a neuromodulator involved in a form of “volume transmission” and not as a point-to-point fast neurotransmitter (*Descarries et al., 1996; Antonopoulos et al., 2002; Descarries et al., 2008; Ducrot et al., 2020*). DA release occurs not only from axon terminals in the vast axonal arbors of DA neurons, but also from the neurons' somatodendritic (STD) compartment (*Rice and Patel, 2015*). The molecular machinery underlying exocytotic DA release from terminals (*Mendez et al., 2011; Liu et al., 2018; Banerjee et al., 2020a; Liu et al., 2021*) or dendrites (*Bergquist et al., 2002; Fortin et al., 2006; Hikima et al., 2021; Mendez et al., 2011; Ovsepian and Dolly, 2011; Rice and Patel, 2015*) is presently fragmentary. Discoveries on such mechanisms are likely to lead to a better understanding of the functions and connectivity of all classes of modulatory neurons.

Vesicular exocytosis requires the concerted action of SNARE proteins and calcium sensors from the synaptotagmin family (Syt) (*Sudhof, 2004*). Of the 17 Syt isoforms identified so far, only Syt1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, and 10 have been reported to bind calcium and drive vesicular fusion (*Andrews and Chakrabarti, 2005*). Syt1, 2, and 9 were confirmed as calcium sensors for fast synaptic neurotransmitter release from axon terminals (*Xu et al., 2007*). Syt1 was first shown to play a key role in axonal DA release in primary DA neurons (*Mendez et al., 2011*) in which it is present at both synaptic and non-synaptic terminals (*Ducrot et al., 2020*), but most likely absent from dendrites (*Mendez et al., 2011*). Recent work has confirmed and extended this finding in the intact brain by showing that Syt1 is essential for evoked DA release (*Banerjee et al., 2020b*). Syt4 and

Syt7 were recently shown to control STD DA release, suggesting a distinct molecular machinery compared to axonal DA release (*Mendez et al., 2011; Delignat-Lavaud et al., 2021*).

Here, we defined the consequence of loss of Syt1 in DA neurons by evaluating the impact of this deletion on DA-dependent behaviors and by characterizing the selective roles of Syt1 in axonal and STD DA release. We find that basic motor functions are intact in mice lacking Syt1 in DA neurons (Syt1 cKO^{DA}). Combined with our observations that loss of Syt1 leads to extensive loss of axonal DA release in the striatum, to partial loss of DA release in the mesencephalon and to unaltered extracellular DA levels in the striatum and mesencephalon, our findings suggest that basal motor functions in rodents only require the maintenance of a basal tone of extracellular DA largely independent of Syt1-dependent phasic release. We hypothesize that this situation is very similar to pre-symptomatic stages of PD and sheds light on the surprising resilience of motor functions after extensive loss of evoked DA.

3.3. Methods

Animal model

The Syt1-floxed mouse line (Syt1^{lox/lox}) was obtained from Dr. Schneggenburger who rederived the Syt1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} (EMMA, Monterotondo, Italy; EM06829; RRID:MGI_5450372) strain with a C57Bl6 background carrying a constitutively expressing FLP gene in order to remove the Frt-flanked lacZ/neo insert (Kochubey et al., 2016). We then crossed the Syt1^{lox/lox} mice with B6.SJL-Slc6a3^{tm1.1(cre)Bkmm/J}; DATIRES-Cre mice (The Jackson Laboratory, stock 006660, USA), driving expression of the cre recombinase under the control of the DAT promoter, resulting in the selective deletion of *Syt1* alleles in the DA neurons (Fig. 1A). Syt1-floxed/DAT^{IR^{ES}-cre} mice were bred from heterozygous crosses to generate Syt1 conditional knockout in DA neurons (cKO^{DA}), heterozygotes and wild-type animals, referred in the manuscript as Syt1^{-/-}, Syt1^{+/-} and Syt1^{+/+} respectively. Genotyping for Syt1 cKO^{DA} mice was determined using specific primers to target the *Syt1*-floxed alleles - Syt1^{lox} forward: GATTCATGATGTCACCTGAATCCTATGC and Syt1^{lox} reverse CTGGCAAGTAGCTTAGTGAGTC. Experiments were performed blind with regards to animal genotype. 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. For microdialysis experiment, the study was approved by the Animal Care committee of the research center of the Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal (CIUSSS NIM). 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.

Viral injection

6-7 week-old cKO^{DA} or Syt1^{lox/lox} mice were anesthetized with isoflurane (Aerrane; Baxter, Deerfield, IL, USA) and fixed on a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). A small hole was drilled in the exposed skull and a 10 µl Hamilton syringe connected to a borosilicate injection micropipette pulled using a P-2000 puller (Sutter Instrument) coupled with a Quintessential Stereotaxic Injector (Stoelting) were used for the injections. For virally induced Syt1 KO, a AAV9-TH-cre-myc-2A-fusion-red virus (2.1E+13vg/ml) and AAV9-TH-fusion-red-Sv40 (1.99E+13vg/ml) control virus (kindly provided by Dr. James Surmeier) were injected bilaterally

to Syt1^{lox/lox} mice at the following injection coordinates [AP (anterior–posterior; ML (medial–lateral); DV (dorsal-ventral), from bregma]: AP -2.8 mm; ML + and – 0.9 mm; DV -4.3 mm and AP -3.2 mm; ML + and – 1.5 mm; DV -4.2 mm (0.5 µL per sites at a rate of 0.25 µL/min, for a total of 2 µl per mice), in order to infect neurons in the entire ventral mesencephalon. For optogenetic experiments, a pAAV-syn-ChR2-eYFP-Kv plasmid was purchased (*Addgene plasmid # 89256, USA, originally from McLean Bolton*), modified to insert a double-floxed inverse open reading frame (DIO) and packaged into an AAV2/5 backbone. The AAV2/5-hsyn-DIO-ChR2-eYFP-Kv (6.2×10^{12} vg/mL, *Neurophotonic Québec, CANADA*) virus or a AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP (4.2×10^{12} vg/mL, *UNC GTC Vector core, USA*) control virus were injected with the same protocol as above to infect the entire mesencephalon of Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice. Each virus was diluted (1:3) with sterile saline solution and kept on ice prior injections. Animals recovered in their home cage and were closely monitored for 3 days. The brains were collected for FCSV and immunohistochemistry 3-4 weeks after injections. For FCSV experiment success of the injections was visually validated each time during the slicing of the brains by visualizing the presence of the eYFP reporter.

Brain slices preparation

Acute brain slices from 10-12-week-old male or female cKO^{DA} mice were used for all fast scan cyclic voltammetry (FSCV) recordings. When possible, matched pairs of Syt1^{+/+} and Syt1^{+/-}/Syt1^{-/-} mice were used on each experimental day. The animals were anesthetized with halothane, decapitated and the brain quickly 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 and/or midbrain brain slices of 300 µm thickness 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 placed 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 (*Warner Instruments, USA*). 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 to each experiment.

Fast Scan Cyclic Voltammetry

Electrically or optically evoked DA release was measured by FSCV using a 7 μm diameter carbon-fiber electrode placed into the tissue ~ 100 μm below the surface. A bipolar electrode (*Plastics One, Roanoke, VA, USA*) or an optical fiber connected to a 470 nm wavelength LED was placed ~ 200 μm away from the recording site. Carbon-fiber electrodes (*Goodfellow Cambridge Limited, UK*) of 7 μm in diameter were aspirated into ethanol-cleaned glass capillaries (1.2 mm O.D., 0.68 mm I.D., 4 inches long; *World Precision Instruments, FL, USA*). The glass capillaries were then pulled using a P-2000 micropipette puller (*Sutter Instruments, Novato, USA*), dipped into 90°C epoxy for 30 s (*Epo-Tek 301, Epoxy Technology, MASS, USA*) and cleaned in hot acetone for 3s. The electrodes were heated at 100°C for 12 h and 150°C for 5 days. Electrodes were then polished and filled with potassium acetate at 4M and potassium chloride at 150 mM. The protruding carbon fibers were cut using a scalpel blade under direct visualization to a length allowing to obtain maximal basal currents of 100 to 180 nA. The electrodes were calibrated with 1 μM DA in aCSF before and after each recorded slice and the mean of the current values obtained were used to determine the concentration of released DA. After use, electrodes were cleaned with isopropyl alcohol (*Bioshop, France*). The potential of the carbon fiber electrode was scanned at a rate of 300 V/s according to a 10 ms triangular voltage wave (-400 to 1000 mV vs Ag/AgCl) with a 100 ms sampling interval, using a CV 203BU headstage preamplifier (*Molecular Devices*) and a Axopatch 200B amplifier (*Molecular Devices, USA*). Data were acquired using a Digidata 1440a analog to digital converter board (*Molecular Devices, USA*) connected to a computer using Clampex (*Molecular Devices, USA*). Slices were left to stabilize for 20 min before any electrochemical recordings. After positioning of the bipolar stimulation electrode or the optical probe and carbon fiber electrodes in the tissue, single pulses (400 μA or 30 mW, 1 ms,) or pulses-train (30 pulses at 10 Hz) were applied to the tissue to trigger DA release.

Behavioral analyses

Grip strength test. A grip strength apparatus (*BioSeb instruments, BIO-GS3, France*) was used to evaluate the paw force developed by Syt1 cKO^{DA} mice. 10-12-week-old male or female mice were held firmly by the tail and slowly lowered until their forepaws grasped the middle of the grid. Subjects were then lowered to a horizontal position and pulled following the axis of the sensor until they released their grasp on the grid. The maximum force exhibited by the subject was

recorded. The test was repeated 3 times with 30 min resting period between each trial. The results are presented as the means of the 3 trials divided by the body weight of each recorded mouse.

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. 10-12-week-old male or female Syt1 cKO^{DA} were positioned head-up at the top of the pole and the time required to turn (t-turn) and climb down completely was recorded. The results are presented as the mean of 2 sessions, with 3 trial per sessions for each mouse.

Rotarod. Motor coordination was evaluated with a rotarod apparatus (*Harvard Apparatus, LE8205, USA*). 10-12-week-old male or female Syt1 cKO^{DA} mice were pre-trained on the rotarod for two consecutive days to reach a stable performance and then tested on day three. On the first day, mice were placed on the rotarod, rotating at a constant speed of 4 rpm. They remained on the rotarod until either one min had passed, or up to a maximum of 3 attempts at placing them on the rod. On the second day, mice were trained on the device with an accelerated rotation of 4 to 40 rpm, over a ten-min period. This training was repeated 3 times with approximately 30 min of rest between each trial. Mice were tested on the accelerating rod on day 3 and the latency to fall the device of each tested animal was recorded. The results are presented as the means of the 3 trials on day 3.

Open field. The locomotor behavior of 11-12-week-old male or female Syt1 cKO^{DA} mice was recorded using an infrared actimeter (*Superflex sensor version 4.6, Omnitech*) using the Fusion software (*v5.6 Superflex Edition*). A chamber partition was used to measure two mice at a time. Subjects were not given time to acclimate and spent a total of 60 min in the chamber with the following protocol: the first 20 min was used to record basal locomotion, while the following 40 min was used to record locomotion after saline or drug administration (i.p.). Drug treatments correspond to a single dose of cocaine hydrochloride at 20 mg/kg (*Medisca, cat# 53-21-4, Canada*) or D-amphetamine sulfate at 5 mg/kg (*Tocriss, 2813, UK*) at regimens known to increase locomotion (*Itzhak and Martin, 1999; Steinkellner et al., 2014*). SCH23390-HCl (*Sigma, D-054, Canada*) at 50 µg/kg, quinpirole-HCl at 0.2 mg/kg (*Sigma, Q-102, Canada*) and raclopride L-tartrate at 1 mg/kg (*Sigma, R-121, Canada*) were also used at selected high doses known to reduce locomotion in the open field (*Centonze et al., 2003; Dourado et al., 2016; Radl et al., 2018*). Each

drug was diluted into 0.9% sodium chloride (saline) solution (*Halyard, #cat 116*). Results are presented as the mean of the traveled distance.

Autoradiography

10-12-week-old male or female Syt1 cKO^{DA} mice were anesthetized using pentobarbital NaCl solution (7 mg/mL) injected intraperitoneally and then were perfused intracardially with 20 mL of PBS to remove the blood. The brains were extracted and quickly dipped in isopentane at -30°C for 1 min. 10-microns thick coronal sections of the whole striatum were then cut using a cryostat (*Leica Biosystem, Model 3050*) and mounted on charged microscope slides (*X-tra, Leica, Canada*). For binding assays, after a pre-wash step in Tris-HCl buffer (15 min) at room temperature, incubation was performed for 1 h at room temperature in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, in the presence of different concentrations (0.075 – 5 nM) of [³H]-raclopride (*specific activity 82.8 Ci/mmol, Perkin Elmer, #NET975250UC, Canada*) for D2 binding or different concentrations (0.150 – 10 nM) of [³H]-SCH23390 (*specific activity 83.6 Ci/mmol, Perkin Elmer, #NET930025UC, Canada*) for D1 binding. To determine the non-specific binding, adjacent sections were incubated respectively with 5 µM of sulpiride (*Sigma, cat#S7771, Canada*) for D2 binding and 20 nM mianserin hydrochloride (*Sigma, cat#M2525, Canada*) with 1 µM SCH-39166 hydrobromide (*Tocris, cat#2299, Canada*) for D1 binding. Incubation was terminated by rinsing sections twice for 5 min in ice-cold Tris-HCl, 50 mM (pH 7.4). Sections were then dipped briefly in cold distilled water and dried overnight. The microscope slides with tissue sections were placed in a light-proof X-ray cassette. Autoradiographs were prepared by placing the slide-mounted tissue sections in contact with a tritium-sensitive film (*Biomax MR, Kodack, cat#8715187, Canada*) for 6 weeks at room temperature. The films were then developed, and autoradiograms analyzed by densitometry. Autoradiograms were acquired using a Grayscale Digital Camera (*Model CFW-1612M, Scion Corporation, Maryland, USA*). The precise topography of D1 and D2 receptors in the striatum was determined from autoradiograms of 4 serial coronal sections for each dilution corresponding to approximately bregma +1.34 mm to 0.38 mm of the Paxinos and Watson mouse brain atlas (*Paxinos and Franklin, 2019*). In each section, the caudate-putamen was arbitrarily divided into 4 quadrants (dorso-lateral, ventro-lateral, dorso-medial and ventro-medial). For each quadrant, the mean signal intensities were measured on ImageJ software and non-specific binding was subtracted

from all density readings. The corrected optical gray densities of the different brain areas were converted into nCi/mg of tissue using a [³H] radioactive standard disposed on each film (*American Radiolabeled Chemicals Inc., Cat# ART 0123A*). The saturation binding curves were then analyzed on GraphPad software using a non-linear regression with the equation $Y = B_{\max} * X / (K_d + X)$, where Y represents the specific binding values (nCi/mg of tissue) and X the radioligand concentration to estimate B_{\max} , the maximum specific binding and K_d , the radioligand concentration needed to achieve a half-maximum binding at equilibrium. The two last parameters were extracted and represent respectively the receptor density and the radioligands affinity for D1 or D2 receptors.

Tissue preparation and immunohistochemistry

10-12-week-old male or female Syt1 cKO^{DA} mice were anesthetized using pentobarbital NaCl solution (7 mg/mL) injected intraperitoneally and then were perfused intracardially with 20 mL of PBS followed by 30 mL of paraformaldehyde (PFA) 4%. The brains were extracted, placed 48 h in PFA followed by 48h in a 30% sucrose solution and frozen in isopentane at -30°C 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-tyrosine hydroxylase (TH) (1:1000, AB152, 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, Emory University, USA (Cliburn et al., 2017)), a rabbit anti-5-HT (1:2000, 20080 ImmunoStar, In; USA), a chicken anti-GFP (1:1000, GFP-1020; Aves Labs, USA) and/or a rabbit anti-RFP (1:1000, CA600-401-379, Rockland Inc., 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, Canada). Slices were mounted on charged microscope slides (*Superfrost/Plus, Fisher Scientific, Canada*) and stored at 4°C prior to image acquisition.

Confocal imaging

Images were acquired using an Olympus Fluoview FV1000 point-scanning confocal microscope (*Olympus, Canada*) with a 60x oil-immersion objective (NA 1.42). Images acquired using 488nm, 546 nm and 647 laser excitations were scanned sequentially to prevent non-specific bleed-through signal. All image analysis was performed using ImageJ (*National Institutes of*

Health) software. For the immunohistochemical characterization of brain tissue obtained from Syt1 cKO^{DA} mice or virally induced Syt1 KO mice, surface and intensity for each signal were measured in a series of 5 different striatal sections ranging from bregma +0.98 to bregma -1.06 mm, with a total of 22 different spots for each hemisphere (**Fig. S4A**).

Stereology

One out of every 6th cryostat section was used for TH immunostaining stereological counting of DA neurons. After a PBS wash, the tissue was incubated for 10 min with 0.9% H₂O₂ solution, then washed with PBS again and incubated for 48h with a rabbit anti-TH antibody (1:1000, AB152, Millipore Sigma, USA) at 4°C, 12h with goat anti-rabbit biotin-SP-AffiniPure secondary antibody (111-065-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) at 4°C and 3h with horseradish peroxidase streptavidin (016-030-084, Cedarlane, USA). The diaminobenzidine (DAB) reaction was carried out for 45s, then stopped by incubation with 0.1M acetate buffer. Slices were mounted on charged microscope slides (*Superfrost/Plus*, Fisher Scientific, Canada) and left to dry for 96h after which they were stained with cresyl violet and went through incubations with increasing concentrations of alcohol. After short isopropanol and xylene baths, slides were sealed with Permount mounting medium (*SP15-100*, Fisher, USA) using glass coverslips. TH-immunoreactive neurons were counted in one out of every sixth section using a 100x oil-immersion objective on a Leica microscope equipped with a motorized stage. A 60 x 60 μm² counting frame was used in the Stereo Investigator (*MBF Bioscience*) sampling software with a 12 μm optical dissector (2 μm guard zones) and counting site intervals of 150 μm after a random start (100 μm intervals for unilateral lesion). Mesencephalic DA nuclei, including the VTA, SNc and RRF were examined. Stereological estimates of the total number of TH-immunoreactive neurons within each nucleus were obtained. The number of TH-negative neurons was also estimated similarly in each region based on cresyl violet staining.

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 (*Caroline Fasano et al., 2008*). Primary DA neurons from VTA or SNc were prepared from Syt1^{-/-} or Syt1^{+/+} pups and co-cultured with ventral striatum and dorsal striatum neurons from Syt1^{-/-} or Syt1^{+/+} pups, respectively. Neurons were seeded (60 000 cells/mL) 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, enriched with 1% penicillin/streptomycin, 1% Glutamax, 2% B-27 supplement and 5% fetal bovine serum (*Invitrogen, Canada*) plus 1/3 of minimum essential medium enriched with 1% penicillin/streptomycin, 1% Glutamax, 20 mM glucose, 1mM sodium pyruvate and 100 µl of MITO+ serum extender. All primary neuronal co-cultures were used at 14 days *in vitro* (DIV).

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-TH (1:2000, MAB318, Millipore Sigma, USA), rabbit anti-TH (1:2000, AB152, Millipore Sigma, USA), rabbit anti-Syt1 (1:1000, 105-103, Synaptic Systems, Germany), rabbit anti-VMAT2 (1:2000, gift of Dr. Gary Miller, Colombia University) and mouse anti-MAP2 (1:2000, MAB3418, Millipore Sigma, USA). 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, Canada*).

RT-qPCR

We used RT-qPCR to quantify the amount of mRNA encoding Syt1, 4, 7 and 11, Doc2b, TH, DAT and VMAT2 in brain tissue from P70 Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice. The brains were quickly harvested and the ventral mesencephalon containing SN/VTA structures were microdissected and homogenized in 500 µL of trizol. Next, RNA extraction was performed using RNAeasy 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 is presented in **supplementary Table 1**. The QuantStudio 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 as an endogenous control.

Western Blot

Striatum samples microdissected from Syt1^{+/+}, Syt1^{+/-}, Syt1^{-/-} adult mice were lysed in RIPA buffer (*Fisher Scientific, PI89900*) containing a protease inhibitor cocktail (*Sigma*). Homogenized tissue samples were centrifuged at 12000g for 30 min at 4°C. Supernatant was collected and protein quantification was done with BCA reagent (*Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, PI23227*). 20 µg 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 gentle shaking with rat anti-DAT (1:1000, *MAB369; MilliporeSigma, USA*), rabbit anti-TH (1:1000, *AB152, Millipore Sigma, USA*), rabbit anti-VMAT2 (1:5000, kindly provided by Dr. G.W. Miller, *Emory University, USA (Cliburn et al., 2017)*) and mouse anti-β-actin (1:5000, *A3854, Sigma-Aldrich, Canada*) primary antibodies. Membranes were washed 5 times with TBST buffer for 5 min each time. After this, appropriate secondary antibodies (1:5000) were added and the incubation was done at RT for 90 min with gentle shaking. Membranes were washed again with TBST buffer for 5 times X 5 min and developed using 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.

Microdialysis guide cannula implantation

10-12 weeks old male and female Syt1 cKO^{DA} mice were anesthetized with sodium isoflurane (2.5% isoflurane at 0.5 L/min oxygen flow), coupled with infiltration analgesia of 1.5 mg/kg lidocaine/bupivacaine 10 min prior to incision of the skull and stereotaxic implantation with a microdialysis guide cannula (*CMA 7, Harvard Apparatus*) into the left dorsal subdivision of the striatum (coordinates: 1.0 mm anterior of bregma, 2.0 mm lateral of bregma, and -3.3 mm below pia) and the right substantia nigra and ventral tegmental area (coordinates: -3.3 mm anterior of bregma, -0.8 mm lateral of bregma, and -3.4 mm below pia) following Paxinos coordinates (*Paxinos and Franklin, 2019*). These guide cannulas were then used to insert the microdialysis probes (6 kDa MW cut-off, *CMA 7, Harvard Apparatus*) into the target sites. Guide cannulas were secured with acrylic dental cement and an anchor screw was threaded into the cranium. Buprenorphine (0.05 mg/kg, subcutaneously) was used for postoperative analgesia (once daily for 2 days). Animals were allowed 1-week (housed one per cage) to recover from cannula implantation

before dialysis measurements of extracellular DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), norepinephrine (NE), and serotonin (5-HT) levels by microdialysis. A removable obturator was inserted into the cannula to prevent cerebrospinal fluid seepage and infection.

Microdialysis

Microdialysis probes were calibrated in aCSF containing (in mM): NaCl (126), KCl (3), NaHCO₃ (26), NaH₂PO₄ (3), MgCl₂ (1.3), CaCl₂ (2.3), and L-ascorbic acid (0.2). *In vitro* probe recovery ranged from 4% to 30% at a flow rate of 1 µL/min. A computer-controlled microinfusion pump (*CMA*) was used to deliver perfusate to the probes, and the dialysate was collected from the outlet line. Probes were inserted into the indwelling guide cannulas of the anesthetized animals and perfused with aCSF (flow rate set at 1 µL/min). To minimize the influence of needle trauma on experimental outcomes, dialysates samples were collected during a typical 60 min equilibration period but were discarded and not analyzed. Three samples were then taken at 20 min intervals for 60 min. Each 10 µl dialysate sample was collected in a fraction vial preloaded with 1 µl of 0.25 mol/l perchloric acid to prevent analyte degradation and immediately stored at 4 °C for subsequent analysis. Following microdialysis, mice received an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (120 mg/10 mg/kg) and were intracardially injected with cold saline, decapitated and the brains were harvested. After the microdialysis experiments, the striatum of each mouse was microdissected, and flash frozen in isopentane cooled to -35 °C on dry ice and stored at -80 °C prior to HPLC quantification.

High performance liquid chromatography

Extracellular DA, DOPAC, 5-HT and NE concentrations in the left dorsal subdivision of the striatum and the right substantia nigra and ventral tegmental area were determined with high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Dionex pump (*ultimate 3000*) coupled with electrochemical detection (EC) (*Isingrini et al., 2017*). Samples were run through a Luna C18 (2) 75 mm × 4.6 mm 3 µm analytical column at a flow rate of 1.5 ml/min and the electrochemical detector (*ESA CoulArray, model #5600A*) was set at a potential of -250 mV and +300 mV. The mobile phase consisted of 6% methanol, 0.341 mM 1-octanesulfoic acid sodium salt, 168.2 mM sodium acetate, 66.6 mM citric acid monohydrate, 0.025 mM ethylenediamine-tetra-acetic acid disodium and 0.71 mM triethylamine adjusted to pH 4.0–4.1 with acetic acid. Using ESA's CoulArray software, the position of the peaks for each metabolite was compared to an external

standard solution containing 25 ng/ml DA, DOPAC, 5-HT, NE and 50 mM acetic acid prepared fresh daily from stock solutions and loaded with samples into a refrigerated (10 °C) Dionex RS autosampler (*ultimate 3000*). Under these conditions, the retention time for DOPAC, NE, DA, and 5-HT was approximately 2.5 min, 1.1 min, 2.8 min, and 3.76 min respectively, with a total run time of 22 min/sample. Chromatographic peak analysis was accomplished by identification of unknown peaks in a sample matched according to retention times from known standards using Chromaleon software. The mean standard (n = 5) was used to quantify unknown peaks and to have the same retention time on each run. The analytical curve, as determined with duplicate standard solutions of DOPAC, NE, DA and 5-HT in nanopure water, was in the range of 7 to 500 ng/ml ($R^2 = 0.9963$, 0.9971, 0.9899 or 0.9775, respectively). The analytical curve was constructed by plotting the area under the curve. For tissular measures, microdissected striatum were homogenized in a solution which contained 45 μ l of 0.25 M perchlorate and 15 μ l of 2,3-dihydroxybenzoic acid (100 mg/ml) which served as an internal standard. Following centrifugation at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C, the supernatant was isolated to detect DA, DOPAC, NE and 5-HT using HPLC-EC as previously described. In parallel, pellets were reconstituted in 50 μ l of 0.1 N NaOH and kept for protein quantification using a BCA protein assay kit (*Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, PI23227*). Dialysate concentrations are expressed as ng/ml and tissular concentrations as ng/mg of total proteins.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed with Prism 9 software (GraphPad). The level of statistical significance was established at $p < 0.05$ in one or two-way ANOVAs with appropriate post-hoc tests or two-tailed t-tests with appropriate correction (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.4. Results

3.4.1. Syt1 is the main calcium sensor for fast axonal dopamine release.

In line with its high expression and localization in the axonal varicosities of DA neurons, Syt1 is a key regulator of activity-dependent DA release (*Mendez et al., 2011; Ducrot et al., 2020; Banerjee et al., 2020b*). We generated conditional deletion of Syt1 in DA neurons (Syt1 cKO^{DA}), by crossing Syt1^{lox/lox} mice with DAT^{IRESc^{re}} mice (**Fig. 1A**). Validating earlier results, we found using FSCV *ex vivo* in brain slices of Syt1^{+/+}, Syt1^{+/-} and Syt1^{-/-} mice an extensive reduction of phasic DA release induced by single electrical pulses in both the dorsal striatum (**Fig. 1B**: 0.074 $\mu\text{M} \pm 0.012 \mu\text{M}$, n = 8 mice, vs 1.42 $\mu\text{M} \pm 0.15$ in Syt1^{+/+}; n = 9 mice; 1-way ANOVA with Tukey, p < 0.0001) and ventral striatum (**Fig. 1C**: 0.144 $\mu\text{M} \pm 0.02 \mu\text{M}$, n = 8 mice, vs 1.252 $\mu\text{M} \pm 0.08$ in Syt1^{+/+}; n = 9 mice; 1-way ANOVA with Tukey, p < 0.0001) of Syt1^{-/-} mice. In Syt1^{-/-} mice, the residual signal was low in amplitude but still represented DA, as confirmed by the cyclic voltammogram (**Fig. S1A and 1B**). Stimulation with 10 Hz pulse trains only caused a very modest increase in DA overflow, only reaching significance in the ventral striatum (**Fig. S1D**). Mice in which DA neurons expressed a single allele of Syt1 also showed a small decrease in DA release, which reached significance in the ventral striatum (0.999 $\mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}$, n = 8 Syt^{+/-} mice; 1-way ANOVA with Tukey, p < 0.0001) (**Fig. 1C**). This observation argues for the existence of only a modest safety factor in the amounts of Syt1 required for normal DA neuron terminals function. We conclude that Syt1 acts as the main calcium sensor for fast activity-dependent DA release in the striatum, but that other calcium sensors are also likely to play a complementary role, which may be more extensive in the ventral (nucleus accumbens) compared to dorsal striatum.

3.4.2. Syt1 deletion also reduces DA release in the ventral mesencephalon.

As DA release in cell body region of DA neurons is also calcium-dependent and since synaptotagmin isoforms and active zone proteins have been suggested to have a role in STD DA release (*Mendez et al., 2011; Robinson et al., 2019; Delignat-Lavaud et al., 2021*), we also examined activity-dependent DA overflow in the ventral mesencephalon (**Fig. 1D**). We first measured DA release in the VTA of Syt1^{-/-} mice using an optimal FSCV paradigm, with pulse-train stimulation (30 pulses at 10 Hz) and aCSF containing the DAT blocker nomifensine and the D2 antagonist sulpiride, allowing the detection of STD DA release without the influence of DA

uptake and D2 autoreceptors activation (*Delignat-Lavaud et al., 2021 and previous chapter*). We observed a robust $\approx 68\%$ decrease of activity-dependent DA overflow in *Syt1*^{-/-} mice ($0.1 \mu\text{M} \pm 0.01 \mu\text{M}$, $n = 8$, vs $0.277 \mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}$ in $n = 9$ *Syt1*^{+/+} mice; 1-way ANOVA with Tukey, $p < 0.0001$). This decrease was also significant in heterozygote mice ($0.196 \mu\text{M} \pm 0.02 \mu\text{M}$, $n = 8$; 1-way ANOVA with Tukey, $p = 0.0310$). Similar recordings performed in the SNc also revealed a robust reduction ($\approx 65\%$) of evoked DA overflow (**Fig. S1C** - $0.087 \mu\text{M} \pm 0.01 \mu\text{M}$, $n = 5$ *Syt1*^{-/-} mice vs $0.25 \pm 0.04 \mu\text{M}$, $n = 6$ *Syt1*^{+/+} mice; Welch's t-test, $p = 0.0103$).

Because there is yet no evidence for the presence of *Syt1* in the STD compartment of DA neurons (*Mendez et al., 2011*) or any other neurons, this finding was unexpected. Interestingly, although the VTA region is well known for containing the cell body and dendrites of DA neurons, it has also been previously suggested to contain a small contingent of local dopaminergic axon collaterals with potential axonal release sites (*Rice and Patel, 2015*). The available anatomical data is however limited (*Deutch et al., 1988; Bayer and Pickel, 1990*). On the other hand, the SNc is believed to be devoid of axonal DA release sites (*Juraska et al., 1977; Wassef et al., 1981; Matsuda et al., 2009*), but here again, the supporting data is limited.

3.4.3. Somatodendritic optogenetic stimulation reveal unaltered STD DA release in the absence of *Syt1*.

In view of the surprising reduction of evoked DA overflow in the ventral mesencephalon of *Syt1*^{-/-} mice, we devised a new strategy to trigger STD DA release more selectively. For this, we combined FSCV with selective optogenetic stimulation of the STD compartment of neurons by expressing a STD-targeted version of channelrhodopsin (ChR2-Kv) (**Fig. 2**). Kv2.1 channels were previously reported to be restricted to the somatic and proximal dendritic membrane and absent from distal dendritic membrane, axons, and nerve terminals of cortical and hippocampal neurons (*Lim et al., 2000; Misonou et al., 2005; Jensen et al., 2017*). A 65 amino acid motif of the Kv2.1 voltage-gated potassium channel fused with the carboxy terminus of ChR2-EYFP (*Baker et al., 2016*) was inserted in a Cre-dependent AAV vector (AAV2/5-hsyn-DIO-ChR2-eYFP-Kv). A standard cell-wide hChR2 (AAV2/5-hsyn-DIO-ChR2-eYFP), previously used to trigger DA release in the striatum (*O'Neill et al., 2017*) and mesencephalon (*Delignat-Lavaud et al., 2021*) was used as control.

Validation of the construct in primary DA neurons from DAT^{IRRES}Cre mice showed the expected STD expression of the ChR2-Kv construct, with no expression in TH⁺/MAP2⁻ processes and varicosities (**Fig. S2**). Expression of the construct *in vivo* in DAT^{IRRES}Cre mice was efficient and restricted to the ventral mesencephalon (**Fig. 2A**). Confocal imaging at 60X revealed a membrane localization of ChR2-Kv at the soma of DA neurons (**Fig. 2B**). In the striatum, no eYFP signal was detected in the dorsal striatum but sparse signal was detectable in the ventral striatum, suggesting limited expression in a subset of VTA DA neuron axons in addition to the predominant STD expression. In line with this limited axonal expression of ChR2-Kv, DA release triggered by single-pulse optogenetic stimulation of ChR2-Kv in the striatum (dorsal and ventral) of Syt1^{+/+} mice was more than 3-fold lower compared to release evoked with conventional ChR2 ($0.39 \mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$, $n = 7$ mice vs $1.36 \mu\text{M} \pm 0.2 \mu\text{M}$, $n = 7$ mice; 2-way ANOVA with Tukey, $p < 0.0001$). Although evoked DA overflow in Syt1^{-/-} mice was 2-fold lower compared to Syt1^{+/+} mice, the difference did not reach statistical significance most likely due to the small size of the responses and their heterogeneity (**Fig. 2C**) ($0.21 \mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$, $n = 9$ mice; 2-way ANOVA with Tukey, $p = 0.3287$). The sodium channel blocker TTX ($1 \mu\text{M}$) abolished this small axonal DA release in all mice, thus demonstrating the requirement of action potentials in the response (**Fig. 2E**).

In the VTA (**Fig. 2D**), the release of DA induced by optogenetic train stimulation with hChR2 was easily detectable and of an amplitude similar to previously reported ($203 \text{ nM} \pm 13 \text{ nM}$, $n = 5$ mice) (*Delignat-Lavaud et al., 2021*). Release evoked by optogenetic stimulation with ChR2-Kv in Syt1^{+/+} mice was significantly lower ($132 \text{ nM} \pm 16 \text{ nM}$, $n = 7$ mice; 2-way ANOVA with Šidák, $p < 0.0001$) compared to hChR2 ($203 \text{ nM} \pm 13 \text{ nM}$, $n = 5$ mice) (**Fig. 2E**) and the signal detected in Syt1^{-/-} mice was lower compared to Syt1^{+/+} mice ($57 \text{ nM} \pm 7 \text{ nM}$, $n = 9$ mice; 2-way ANOVA with Šidák, $p < 0.0001$). To exclude any contribution from axonal DA release, additional FSCV recordings were obtained in the presence of TTX ($1 \mu\text{M}$). Under these conditions, STD DA release evoked by optogenetic stimulation of ChR2-Kv in Syt1^{+/+} mice ($44 \text{ nM} \pm 8 \text{ nM}$, $n = 7$ mice) was not significantly reduced compared to Syt1^{-/-} mice ($28 \text{ nM} \pm 7 \text{ nM}$, $n = 9$). Together these observations suggest that selectively triggered STD DA release is unaltered by loss of Syt1. The results also suggest that some of the DA release evoked by train stimulation in the ventral mesencephalon includes an axonal component, with electrical and optical stimulation with hChR2 therefore triggering a mixture of axonal and STD DA release.

3.4.4. Syt1 cKO^{DA} mice do not exhibit substantial motor defects.

DA release is known to play a key role in motor control (*Bergquist et al., 2003; Joshua et al., 2009*). Notably, loss of striatal DA innervation in PD is responsible for the cardinal motor features observed in the disease (*Halliday et al., 1990*). Blockade of DA receptors induces catalepsy and a range of other motor deficits in rodents and other species (*Hauber, 1996; Ward and Citrome, 2018*). Based on our results showing a dramatic impairment of phasic DA release in Syt1^{-/-} mice, we hypothesized that this would lead to major motor deficits in Syt1 cKO^{DA} mice.

First, we evaluated motor coordination using the rotarod (**Fig. 3A**) and the pole test (**Fig. 3B**). Surprisingly, Syt1^{-/-} and Syt1^{+/-} showed no deficits and even exhibited better performance on the rotarod task than wild type littermates, with a significantly higher latency to fall the rod (124s ± 12 for Syt1^{+/+} mice vs 197s ± 23s for Syt1^{+/-} mice; p = 0.0220 and 188s ± 20s for Syt1^{-/-} mice; 1-way ANOVA with Dunnett test, p = 0.0460 vs; n = 8 mice). In the pole test, no statistical difference was observed between genotypes for the time required for the animals to orient themselves facing in a downward direction (t-turn). For the time required to climb-down the pole, no difference was detected between Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice, although Syt1^{+/-} mice performed the task faster than WT mice (8s ± 0.7s vs 11s ± 0.5s for Syt1^{+/+}, n = 8; 1-way ANOVA with Dunnett test, p = 0.0414). Front paw grip strength was evaluated in the grip test (**Fig. 3C**). No statistical differences were observed regarding the force developed by the mice on the grid.

We next measured spontaneous locomotion and locomotion induced by the psychostimulant drugs cocaine (20 mg/kg) and amphetamine (5 mg/kg). We measured the traveled distances using an open field for 20 min, followed by another 40 min after drug or vehicle injection (0.9% saline). No difference was detected between Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice on basal locomotion after saline injection (**Fig. 3D**), with only a non-significant trend for higher traveled distance within the 5 min post injection in Syt1^{+/-} mice (**Fig. 3L**, 91% of baseline ± 16% vs 56% ± 13% for Syt1^{+/+} mice, n = 8; 1-way ANOVA with Dunnett test, p = 0.1211).

The increased locomotor response to the DA transporter blocker cocaine was comparable between genotypes (**Fig. 3E and G**). However, locomotion induced by the DA releaser amphetamine was sharply elevated in Syt1^{-/-} mice 10 min after the injection (+714% ± 103% vs +252 ± 29% in Syt1^{+/+}, n = 8; 1-way ANOVA with Dunnett test, p = 0.0046), which became maximal 20 min post-injection (+1045% ± 126% vs 523 ± 58%, n = 8; 1-way ANOVA with

Dunnett test, $p = 0.0069$) (**Fig. 3F**). Cumulative distance for the 40 min under treatment confirmed this effect with an average traveled distance for $Syt1^{-/-}$ mice of $+777\% \pm 67\%$ vs $472\% \pm 53\%$ for $Syt1^{+/+}$ (2-way ANOVA with Tukey, $p = 0.0004$) and $+481\% \pm 73\%$ for $Syt1^{+/-}$ mice (2-way ANOVA with Tukey, $p = 0.0009$) (**Fig. 3G**).

The observed increase in amphetamine-induced locomotion could result from increased amphetamine-induced DA secretion or from postsynaptic DA receptor sensitization. We next tested this hypothesis by administering the selective D1 receptor agonist SCH23390 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), the D2 receptor agonist quinpirole (0.2 mg/kg) or the D2 receptor antagonist raclopride (1 mg/kg). At the selected doses, all drugs caused an abrupt decrease in locomotion, with no significant differences between genotypes when considering the complete drug treatment period (**Fig. 3H-J-K**). However, when we compared the mean traveled distance within the first 5 min following drug injection (**Fig. 3L**), $Syt1^{-/-}$ mice showed a lower traveled distance in response to the D2 agonist quinpirole compared to $Syt1^{+/+}$ mice (respectively $21\% \pm 3\%$ $n = 10$, vs $47\% \pm 8\%$, $n = 8$; 1-way ANOVA with Dunnett test, $p = 0.0044$). The opposite pattern was detected in response to the D2 antagonist raclopride, with a significantly increased response in the $Syt1^{-/-}$ mice compared to $Syt1^{+/+}$ mice ($14\% \pm 3\%$ in $Syt1^{-/-}$ vs $3\% \pm 1\%$ in $Syt1^{+/+}$, $n = 10$; 1-way ANOVA with Dunnett test, $p = 0.0056$). During this period, no significant differences were once again observed among genotypes after the injection of the D1 agonist SCH23390.

Taken together, these results suggest that despite a $>90\%$ impairment of phasic DA release in the striatum and a substantial decrease in DA release in the mesencephalon, $Syt1$ cKO^{DA} mice do not exhibit any obvious defects in DA-dependent basic motor functions. Our observations lead us to hypothesize that such behaviors do not require phasic, activity-dependent DA release and can be maintained by basic resting levels of extracellular DA. Our results with D2 receptor ligands further suggest that adaptations are likely to occur in the DA system in these mice, in a manner that is similar to adaptations occurring at early stages of DA neuron degeneration in PD. In particular, D2 receptors can be hypothesized to undergo an increased density and/or affinity.

3.4.5. Increased D2 autoreceptor and DAT function in $Syt1$ cKO^{DA} mice.

As a first step to examine underlying adaptations to the DA system in $Syt1$ cKO^{DA} mice, we used FSCV to probe the functionality of D2 autoreceptors and of the membrane DA transporter (DAT) in the dorsal and ventral striatum. We measured the impact on DA release of the D2 receptor

agonist quinpirole (1 μM). In line with previous work showing that D2 autoreceptors negatively regulated DA release (*Stamford et al., 1988; Palij et al., 1990*), DA overflow evoked by single pulses in *Syt1^{+/+}* mice was decreased by $\approx 85\%$ in the dorsal striatum ($1.38 \mu\text{M} \pm 0.18 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.21 \mu\text{M} \pm 0.07 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 9$; Welch's t-test, $p = 0.0001$) and by $\approx 84\%$ in the ventral striatum ($1.22 \mu\text{M} \pm 0.1 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.196 \mu\text{M} \pm 0.06 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 9$; unpaired t-test, $p < 0.0001$) after a 15 min perfusion of quinpirole (**Fig. 4A, 4B**). In *Syt1^{-/-}* mice, quinpirole caused a complete abolition of detectable DA release in both the dorsal striatum ($0.061 \mu\text{M} \pm 0.006 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.001 \mu\text{M} \pm 0.001 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 8$; Welch's t-test, $p < 0.0001$) and ventral striatum ($0.13 \mu\text{M} \pm 0.02 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.004 \mu\text{M} \pm 0.002 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 8$; Welch's t-test, $p = 0.0014$). This observation further confirms that the remaining signal detected by FSCV in *Syt1^{-/-}* mice is indeed DA. ~~The increased relative effect of D2 autoreceptor stimulation (Fig. 3) also supports the hypothesis of an increased sensitivity of D2 receptors in *Syt1^{-/-}* mice.~~

We next evaluated the impact of the D2 autoreceptors antagonist sulpiride, previously shown to enhance DA release triggered by pulse trains (*Fawaz et al., 2009*). DA release evoked by pulse trains (30 pulses at 10 Hz) in the striatum of *Syt1^{+/+}* mice was robustly increased by sulpiride (5 μM) in both the dorsal striatum (149%) ($1.34 \mu\text{M} \pm 0.1 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $2.0 \mu\text{M} \pm 0.19 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 8$; unpaired t-test, $p = 0.0079$) and ventral striatum (167%) ($1.13 \mu\text{M} \pm 0.08 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $1.89 \mu\text{M} \pm 0.21 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 8$; Welch's t-test, $p = 0.0085$) (**Fig. 4C, 4D**). Despite a dramatic impairment of DA release evoked by train stimulation in *Syt1^{-/-}* mice (**Fig. S1D**), the effect of sulpiride on evoked DA release was similar in magnitude compared to the wild type animals in the dorsal striatum, with a +140% increase ($0.068 \mu\text{M} \pm 0.007 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.095 \mu\text{M} \pm 0.01 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 11$; unpaired t-test, $p = 0.0466$). In the ventral striatum, the effect of sulpiride on train-evoked DA overflow was higher in *Syt1^{-/-}* compared to *Syt1^{+/+}* mice, with a +261% increase ($0.13 \mu\text{M} \pm 0.02 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.34 \mu\text{M} \pm 0.08 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 11$; Welch's t-test, $p = 0.0318$). Together with our results with quinpirole, these findings again argue that D2 autoreceptor function is increased in *Syt1^{-/-}* mice, especially in the ventral striatum region.

Finally, we evaluated the functionality of the DAT by quantifying the impact of the DAT blocker nomifensine (5 μM) on train-evoked DA overflow. As expected, such treatment greatly

enhanced DA overflow in wild type animals, with a +288% increase in the dorsal striatum ($1.79 \mu\text{M} \pm 0.19 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $5.15 \mu\text{M} \pm 0.74 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 4$; unpaired t-test, $p = 0.0045$) and a +221% increase in the ventral striatum ($1.51 \mu\text{M} \pm 0.2 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $3.34 \mu\text{M} \pm 0.52 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 4$; unpaired t-test, $p = 0.0173$) (**Fig. 4E, 4F**). The relative effect of nomifensine in $\text{Syt1}^{-/-}$ mice was significantly higher than in $\text{Syt1}^{+/+}$ mice, with a +685% increase in the dorsal striatum ($0.108 \mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.74 \mu\text{M} \pm 0.22 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 6$; Welch's t-test, $p = 0.0367$) and a +544% in the ventral striatum ($0.16 \mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}$ pre-treatment vs $0.87 \mu\text{M} \pm 0.13 \mu\text{M}$ after treatment, $n = 6$; Welch's t-test, $p = 0.0162$) (**Fig. 4E, 4F**). These results demonstrate that DAT function is intact in $\text{Syt1}^{-/-}$ mice. Interestingly, they further suggest that nomifensine may act in some way to rescue part of the impaired activity-dependent DA release in these mice. Although speculative, this could be through its electrogenic activity that directly modulates membrane potential (*Carvelli et al., 2004*).

3.4.6. Higher D2 receptor density with no change in affinity in $\text{Syt1}^{\text{cKO}^{\text{DA}}}$ mice.

As the maintenance of motor behaviors in $\text{Syt1}^{-/-}$ mice could be due in part to adaptations of presynaptic and/or postsynaptic DA receptors in the striatum, we next used autoradiography to quantify D1 and D2 binding using the selective D1 and D2 receptor radioligands [^3H]-SCH23390 and [^3H]-raclopride, respectively. No change of K_d for D1 or D2 binding was observed in any analyzed striatal region (dorso-lateral, ventro-lateral, dorso-medial and ventro-medial), indicating that receptor affinity for these radioligands was unchanged in $\text{Syt1}^{\text{cKO}^{\text{DA}}}$ mice (**Fig. S3**). Similarly, no change of maximal binding capacity (B_{max}) was observed for the D1 receptor (**Fig. 5A**). However, a significant increase in D2 receptor B_{max} was detected in the ventro-lateral part of the striatum of $\text{Syt1}^{-/-}$ mice (**Fig. 5B**, $81.7 \text{ nCi/mg of tissue} \pm 14.5$ vs $46.3 \text{ nCi/mg} \pm 4.2$, $n = 4$ mice; unpaired t-test, $p = 0.0413$). A tendency for a general increase of B_{max} in the whole striatum was also observed ($57.3 \text{ nCi/mg} \pm 9$ vs $36.7 \text{ nCi/mg} \pm 4.1$, $n = 4$ mice; unpaired t-test, $p = 0.0697$). The lack of change in D1 receptor binding in $\text{Syt1}^{\text{cKO}^{\text{DA}}}$ mice is in line with the lack of change in the behavioral response to the D1 receptor antagonist SCH23390 in $\text{Syt1}^{-/-}$ mice. The increased D2 receptor binding observed in the ventro-lateral striatum of these mice is compatible with our observation of increased behavioral responses to the D2 receptor antagonist raclopride. It also provides further support for the hypothesis that in the absence of evoked DA release, adaptations

to DA receptors combined with maintained basal extracellular DA levels are sufficient to support most DA-dependent behaviors.

3.4.7. Adaptations of DA synthesis and packaging in Syt1 cKO^{DA} mice.

Compensatory changes at early stages of DA neuron degeneration in PD include not only receptor adaptations, but also enhanced DA synthesis (*Donnan et al., 1991; Richard and Bennett, 1994*) and increased axonal sprouting. The latter has been linked to reduced activation of D2 autoreceptors (*Parish et al., 2001; Tripanichkul et al., 2003; C. Fasano et al., 2008; Fasano et al., 2010, 2013; Giguère et al., 2019*). We therefore hypothesized that reduced activity-dependent DA release in Syt1^{-/-} mice might lead to an increased density of DA neuron terminal markers in the striatum. We next used immunohistochemistry and quantitative confocal microscopy to measure striatal levels of the DA synthesis enzyme TH, the vesicular DA transporter VMAT2 and the DAT. Serotonin (5-HT) innervation was also examined because previous work showed that this system undergoes compensatory sprouting in response to reduced DA levels (*Gagnon et al., 2018*).

We measured signal surface and intensity for these markers in a series of 5 different striatal slices ranging from bregma +0.98 to bregma -1.06 mm, with a total of 22 different spots for each hemisphere (**Fig. S4A**). We found a global increase of TH signal surface in Syt1^{-/-} mice compared to Syt1^{+/+} animals, both in the dorsal striatum (135% ± 6% of control n = 20 hemispheres from 10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p = 0.0001) and ventral striatum (148% ± 6% of control, n = 20/10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p <0.0001) (**Fig. 6A, 6B**). A global increase of TH signal intensity was also observed, in the dorsal (117% ± 3% of control, n = 20/10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p = 0.0005) and ventral striatum (125% ± 4% of control, n = 20/10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p <0.0001) (**Fig. 6C**). A similar increase in VMAT2 immunoreactivity surface (145% ± 10% of control, n = 20/10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p = 0.0043) and signal intensity (123% ± 5% of control, n = 20/10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p = 0.0011) was observed in the dorsal striatum and in the ventral striatum (signal surface; 157 ± 10% of control, n = 20/10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p = 0.0003, signal intensity; 130% ± 5% of control, n = 20/10 mice; 2-way ANOVA with Šidák, p <0.0001). Overall, these results suggest that in Syt1^{-/-} mice, the total density of dopaminergic axonal processes and possibly the total vesicular pool/stock of DA are increased, possibly explaining the selective increase in amphetamine-induced but not cocaine-induced locomotion in these mice.

Opposite changes in striatal DAT immunostaining were observed in Syt1 cKO^{DA} mice, with a global decrease of signal surface in the dorsal striatum ($62\% \pm 6\%$ of control, $n = 20/10$ Syt1^{-/-} and $22/11$ Syt1^{+/+}; 2-way ANOVA with Šidák, $p = 0.0094$) and in the ventral striatum ($64\% \pm 7\%$ of control, $n = 20/10$ Syt1^{-/-} and $22/11$ Syt1^{+/+}; 2-way ANOVA with Šidák, $p = 0.0131$) (**Fig. 6A, B, C**). The DAT signal intensity appeared unchanged in the ventral striatum but was significantly decreased in the dorsal striatum ($89\% \pm 2\%$ of control, $n = 20/10$ Syt1^{-/-} and $22/11$ Syt1^{+/+}; 2-way ANOVA with Šidák, $p = 0.0280$).

These results are compatible with the establishment of compensatory mechanisms acting together to maintain extracellular DA levels in the striatum Syt1 cKO^{DA} mice. These compensatory changes in TH and VMAT2 occurred in the absence of any change in DA neuron number in the VTA and SNc of Syt1^{-/-} mice, as confirmed by stereological counting of TH-positive neurons in these structures (**Fig. 6D**).

Finally, while 5-HT immunoreactive signal intensity in the striatum remained unchanged after Syt1 deletion, a small decrease of the 5-HT signal surface was visible in the dorsal striatum ($72\% \pm 8$ of control, $n = 20/10$ Syt1^{-/-} and $22/11$ Syt1^{+/+}; 2-way ANOVA with Šidák, $p = 0.0399$) and ventral striatum ($65\% \pm 7$ of control, $n = 20/10$ Syt1^{-/-} and $22/11$ Syt1^{+/+}; 2-way ANOVA with Šidák, $p = 0.0114$) (**Fig. 6A, B, C**). This result demonstrates a lack of serotonergic compensatory sprouting in the striatum of Syt1 cKO^{DA} mice.

Arguing that compensatory adaptations occur gradually in Syt1^{-/-} mice during the postnatal period as a result of abrogation of activity-dependent DA release, we observed no significant changes in the general morphological development of DA neurons isolated from P0-P3 pups and grown *in vitro* for 2-weeks (**Fig. S5**).

Primary postnatal mesencephalic DA neurons from Syt1^{-/-} mice were examined to identify any developmental changes resulting from loss of Syt1. As expected, Syt1 immunoreactivity was absent from the axonal varicosities of these neurons (**Fig. S5A**) ($n = 29$ fields for Syt1^{-/-} and 35 for Syt1^{+/+}). A subset of these TH-positive axonal varicosities was also positive for VMAT2, a proportion that was not different in Syt1^{-/-} mice compared to Syt1^{+/+} mice (**Fig. S5B and G**, $n = 50$ fields for Syt1^{-/-} and 55 for Syt1^{+/+}). Most of these varicosities were non-synaptic in structure, as revealed by the observation that only a very small subset was in contact with a MAP2-positive dendritic segment independently of mouse genotype (**Fig. S5C and F**, $n = 47$ fields for Syt1^{-/-} and

64 for Syt1^{+/+}), in line with recent results (Ducrot *et al.*, 2020). The intensity of TH immunoreactivity in the axon terminals and of VMAT2 in the cell body of DA neurons was also unchanged in Syt1^{-/-} mice compared to Syt1^{+/+} mice (**Fig. S5H, J**) (TH; n = 138 fields for Syt1^{-/-} and 166 fields for Syt1^{+/+}, VMAT2; n = 17 Syt1^{-/-} fields and 22 Syt1^{+/+} fields). A small increase in VMAT2 signal in the axon terminals of Syt1^{-/-} was however observed, similar to *in vivo* observations (6002 ± 732 pixels/field, n = 43 for Syt1^{-/-} fields vs 3765 ± 590 pixels/field, n = 45 for Syt1^{+/+} fields; unpaired t-test p = 0.0191).

Survival of DA neurons in these cultures over 14 days was not significantly different between genotypes (**Fig. S5K**, n = 10 coverslips Syt1^{+/+} and 12 Syt1^{-/-}). Finally, the number of axonal branches and their length was unchanged (**Fig. S5L, M, N, O**). These results argue that, *in vitro*, the basic development of DA neurons is unimpacted by Syt1 deletion.

Finally, we also unveiled compensatory adaptations in adult Syt1 cKO^{DA} mice by quantification of mRNA relative levels in total microdissected ventral mesencephalon (**Fig. S6A**, n = 5 mice from each genotypes). We observed significant upregulations (1-way ANOVA with Dunnett) of *th* (1.48 folds, p = 0.0142), *Slc6a3* (DAT) (1.38 folds, p = 0.0339) and *Syt4* (1.25 folds, p = 0.0199) in Syt1^{+/-} mice and upregulations of *Syt4* (1.29 folds, p = 0.0103) and *Syt7* (1.22 folds, p = 0.0474) in Syt1^{-/-} mice. It should be noted that these changes of expression could be underestimated as our analysis was performed on whole microdissected ventral midbrains, therefore including non-dopaminergic neurons. This dilution effect is visible for instance in the Syt1 mRNA quantification, which is only reduced by ≈25% in Syt1^{+/-} mice (p = 0.0065) and by ≈58% in Syt1^{-/-} mice (p < 0.0001). Adaptations also occurred at protein levels, as measured by Western Blot in total microdissected striatum (**Fig. S6B-F**), with a significant increase of the VMAT2 in Syt1^{+/-} mice (1.2 fold; 1-Way ANOVA with Dunnett, p = 0.0270) and in Syt1^{-/-} mice (1.38, p < 0.0001). No change in relative protein levels was observed for TH and DAT.

3.4.8. Acute deletion of Syt1 in adult mice impairs DA release but prevents adaptations.

Since Syt1 cKO^{DA} developed strong adaptations, which likely happened during postnatal development, we knocked out Syt1 in adult mice by injecting 6-7 weeks old Syt1^{lox/lox} mice with an AAV vector allowing expression of the Cre recombinase in DA neurons (AAV9-TH-cre-myc-2A-fusion-red). Three weeks after stereotaxic virus injection in the mesencephalon of these mice,

strong expression of the fusion-red reporter was detected in a majority of DA neurons (**Fig. 7A**). The reporter was also found in a subset of TH-negative neurons at the sites of infection, revealing the partial selectivity of the constructs used. FSCV recordings in the striatum and mesencephalon of these mice revealed a robust decrease of DA release evoked by single electrical pulses compared to controls, both in the dorsal ($0.44 \mu\text{M} \pm 0.04 \mu\text{M}$, $n = 16/8$ vs $1.12 \mu\text{M} \pm 0.07 \mu\text{M}$, $n = 14/7$; 2-way ANOVA with Šidák, $p < 0.0001$) and ventral striatum ($0.37 \mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}$, $n = 16/8$ vs $0.89 \mu\text{M} \pm 0.1 \mu\text{M}$, $n = 14/7$; 2-way ANOVA with Šidák, $p < 0.0001$). DA release in the VTA of Cre virus injected mice showed a strong decrease in comparison to control mice injected with the control AAV (CTRL; $0.24 \mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}$, $n = 14/7$, Cre AAV; $0.026 \mu\text{M} \pm 0.01 \mu\text{M}$, $n = 16/8$; 2-way ANOVA with Šidák, $p = 0.0171$). This result validates the key role of Syt1 as the main calcium sensor controlling phasic DA release in the adult brain.

Immunohistochemical analysis of TH and DAT in these Syt1 adult KO mice showed that both TH and DAT surface and signal intensity were unchanged, except for a slight increase of the TH signal surface in the ventral striatum ($n = 12$ hemispheres/6 mice) ($+139\% \pm 18\%$ vs control; 2-way ANOVA with Šidák, $p = 0.0348$) (**Fig. 7C, D, E**). Overall, these results reveal that adult deletion of Syt1 leads to a strong reduction of activity-dependent DA release, accompanied by blunted neuroanatomical adaptations in comparison with conditional Syt1 cKO^{DA} mice.

3.4.9. Basal extracellular DA levels and total tissue DA are not altered in Syt1 cKO^{DA} mice.

Based on our FSCV and anatomical results showing a range of adaptations similar to those occurring at early stages of PD and potentially enhancing the response to basal extracellular DA, we hypothesize that DA-dependent motor behaviors in Syt1 cKO^{DA} mice are maintained because of the presence of sufficient basal levels of extracellular DA in the striatum of these mice. To test this hypothesis, we used microdialysis in anesthetized mice implanted with two cannulas to measure extracellular DA and metabolites in the dorsal striatum and in the ventral mesencephalon. Following this sampling, the striatum of each animal was also microdissected and the total striatal content of DA and metabolites were quantified by HPLC (**Fig. 8A**). Our results reveal that striatal tissue contents of DA, DOPAC, serotonin (5-HT) and norepinephrine (NE) were not significantly different in Syt1^{-/-} mice ($n = 12$) compared to Syt1^{+/+} mice ($n = 10$) and (**Fig. 8B**). In addition, the DA/DOPAC ratio was found to be unchanged in Syt1^{-/-} mice, suggesting an intact DA turnover.

Microdialysis similarly revealed that even if activity-dependent DA release was mostly blocked in Syt1^{-/-} mice, basal extracellular DA levels in the striatum and mesencephalon of these mice were not reduced in comparison to Syt1^{+/+} mice (**Fig. 8C**). Similarly, extracellular levels of DOPAC, 5-HT and NE were also unchanged. Together, these results indicate that the pool of releasable DA is not decreased by loss of Syt1 and that these mice can maintain intact and sufficient levels of extracellular DA to maintain a basal tone of D1 and D2 receptor activation.

3.5. Discussion

In the present study, we demonstrate that Syt1 is the main calcium sensor involved in fast activity-dependent DA release, confirming previous results obtained first *in vitro* (Mendez *et al.*, 2011), and more recently *in vivo* (Banerjee *et al.*, 2020b). Our work confirms, but also extends, these previous observations in three ways.

First, while previous *in vivo* work using amperometry concluded that release evoked by single spikes was completely abrogated in Syt1^{-/-} mice, we find that a small component of evoked DA release is in fact maintained in the dorsal (≈5%) and ventral striatum (≈12%) This remaining release was abolished using the D2 receptor agonist quinpirole. This observation, in addition to the analysis of voltammograms, confirms the dopaminergic origin of the signal detected by FSCV in Syt1^{-/-} mice and strongly suggests the involvement of another calcium sensor mediating fast, synchronous release. Syt7 would be a logical candidate because it was previously demonstrated to be highly expressed in DA neurons and localized in both axonal varicosities and in the somatodendritic compartment of these neurons (Mendez *et al.*, 2011). Interestingly, we detected a small increase in Syt7 mRNA purified from the ventral mesencephalon of Syt1^{-/-} mice, suggesting a possible functional compensation by this calcium sensor after Syt1 deletion (**Fig. S4**). This modest 1.2-fold increase is likely to represent an underestimation of the real compensation because our analysis was performed on mRNA obtained from whole microdissected ventral mesencephalon, therefore including non-DA neurons. This situation also explains why Syt1 mRNA was only decreased by ≈58% in Syt1^{-/-} mice. However, Syt7 constitutive KO mice were recently found to have no impairment of single-pulse evoked DA release in the striatum, instead playing a role in STD DA release (Delignat-Lavaud *et al.*, 2021). This absence of effect at the terminals echoes previous results in GABAergic neurons where Syt7 deletion failed to reduce fast synchronous release, slow asynchronous release, or short-term synaptic plasticity (Maximov *et al.*, 2008). However, a role of Syt7 in asynchronous release of neurotransmitters was demonstrated using double knock-out of Syt1 and Syt7 (Bacaj *et al.*, 2015, 2013). We can thus speculate that a role of Syt7 in gating evoked DA release would be unveiled by a double KO of Syt1 and 7 in DA neurons. Other synaptotagmin isoforms expressed in DA neurons could also be involved in supporting release in the absence of Syt1. We found that Syt4 mRNA is also upregulated in Syt1^{-/-} mice. However, this isoform appears to only play a role in STD DA release in DA neurons (Mendez *et al.*, 2011; Delignat-Lavaud *et al.*, 2021). Syt11, suggested to participate in regulating DA vesicle

pool replenishment (*Wang et al., 2018*), could also potentially be involved. Calcium sensors of the Doc2 family are also potential candidates because they have previously been shown to act as modulators of spontaneous synaptic transmission by a calcium-independent mechanism in cortical synapses (*Pang et al., 2011*). However, expression of Syt11 and Doc2b were found to be unchanged in our RT-qPCR analysis of Syt1 cKO^{DA} mice.

Secondly, results from the current study extend previous work by showing that basal motor functions in mice are unimpaired under conditions where most activity-dependent DA release from VTA and SNc DA neurons is blocked. This observation may be surprising considering that axonal and STD DA release is known to play a critical role in motor control (*Bergquist et al., 2003; Joshua et al., 2009*). Our work suggests that basal levels of DA in the striatum, deriving either from spontaneous exocytosis and/or from the very small remaining phasic release, are sufficient to support these basic behaviors and that a large phasic DA signal is not necessary. The latter results challenge current beliefs on the roles of phasic DA release in mediating movement and suggest that only a modest level of extracellular DA is sufficient.

Moreover, we find that Syt1 cKO^{DA} mice, despite a dramatic impairment of evoked DA release, produce viable, fertile offspring's, with normal body weight (data not shown) and no in visu physical or behavioral abnormalities. However, we observed multiple behavioral, physiological and anatomical phenotypes pointing towards the establishment of functional adaptations that tune the DA system to the existing conditions by maximizing DA production and packaging as well as postsynaptic receptor activation.

In open-field experiments, we found that while cocaine-induced locomotion was unchanged in Syt1^{-/-} animals, amphetamine-induced locomotion was robustly enhanced. Cocaine is known to increase extracellular DA by blocking reuptake through the DAT, while amphetamine induces a similar elevation by a more complex mechanism including impaired VMAT2-dependent vesicular storage and reversed transport (*Sulzer et al., 2005*). These results, together with our observation of unchanged tissue DA levels, indicate that while the total pools of DA are not altered in Syt1 KO animals, there are pre- and postsynaptic adaptations taking place after the loss of Syt1. The observed increase in VMAT2 expression in Syt1 KO mice might explain in part the differential impact of loss of Syt1 on amphetamine and cocaine-induced locomotor activation. Our behavioral results with DA receptor agonists and our autoradiography results suggest that D2 receptors are

most affected, with an increased response to the D2 agonist quinpirole and a reduced response to the D2 antagonist raclopride, together with increased D2 receptor binding in the ventro-lateral striatum. The D1 receptor system was unchanged in Syt1^{-/-} animals, as no differences emerged for locomotion induced by the D1 agonist SCH23390, or for D1 ligand binding.

We also find clear presynaptic adaptations illustrated by an increase of TH and VMAT2 signal surface and intensity and a decrease in DAT immunoreactivity in both the ventral and dorsal striatum. One interpretation of the increases in TH and VMAT2 signal is that there may be an increase in the axonal arborization of DA neurons in Syt1^{-/-} mice as well as a decrease in reuptake capacity. We and others have previously provided strong support for the hypothesis that DA, through D2 autoreceptors is a key regulator of axon growth by DA neurons (*Parish et al., 2002; Tripanichkul et al., 2003; Giguère et al., 2019*). In the context of a strong reduction in evoked DA release, it is to be expected that D2 autoreceptors would be chronically under-stimulated leading to removal of a brake on axon growth and thus an enhanced density of terminals, in line with our recent work showing axonal arbor expansion after conditional deletion of the D2 receptor gene in DA neurons (*Giguère et al., 2019*). Further experiments will be required to demonstrate such an axonal arbor expansion more directly in Syt1^{-/-} mice. The decrease in DAT immunoreactivity suggests reduced expression of DAT in the KO mice. Our qPCR results show no change in DAT mRNA levels in the KO mice. Western blot also failed to detect a change in DAT protein, although an increase in VMAT2 levels was confirmed with this technique. Although speculative, it is possible that different pools of DAT are detected in fixed and non-fixed material. A reduced level of DAT on DA neuron axon terminals could in theory lead to reduced rates of DA reuptake and thus contribute to maintaining extracellular DA levels in the Syt1 deficient mice. Our FSCV experiments were not able to resolve this as the very small responses remaining in the KO mice precluded a reliable analysis of estimated reuptake kinetics. Quantifications of DAT function in striatal synaptosome preparations might help to resolve this.

Arguing that such compensatory changes in Syt1^{-/-} mice result from an early and substantial loss of evoked DA release, we found little if any changes in TH and DAT immunoreactivity in adult mice in which Syt1 was deleted by injecting a TH-Cre virus in the ventral mesencephalon. These results indicate that compensatory events are likely to take place during early pre- and postnatal development of the Syt1 KO mice. Another possibility is that the level of infection and

impairment of DA release in the adult KO animals did not exceed the threshold necessary to induce compensatory mechanisms. Our *in vitro* results however suggest that lack of Syt1 does not lead to substantial alterations of the survival, growth and basic connectivity of DA neurons, further pointing towards the implication of circuit-level changes as drivers of the pre- and postsynaptic adaptations.

A third notable discovery deriving from the present work is the unexpected impairment of activity-dependent DA release in the ventral mesencephalon. This observation is surprising because on the one hand, DA release in this region is thought to derive mostly from the STD compartment of DA neurons, and on the other hand, Syt1 is typically known as an axon terminal-specific protein. In line with this, previous work in primary DA neurons failed to detect Syt1 immunoreactivity in the cell body and dendrites of DA neurons, with the protein detected in the vast majority of non-synaptic and synaptic terminals along DA neuron axons (*Mendez et al., 2011; Ducrot et al., 2020*). One possibility is that part of the DA release detected in the VTA and SNc derives from local DA neuron axon collaterals, which would contain Syt1. However, very little solid anatomical data exists currently to support the existence of a large number of such local collaterals, although minimal quantitative data suggest that the VTA contain axonal collaterals arising from its own axons and from SNc DA neurons (*Deutch et al., 1988; Bayer and Pickel, 1990*). To address this question more directly, we devised a new strategy to selectively activate the STD compartment of DA neurons using an optogenetic approach. For this, we expressed a Kv2.1-ChR2-YFP fusion construct in DA neurons that we showed was predominantly expressed in the STD compartment of DA neurons. While the expression of this ChR2 protein was purely STD in primary DA neurons, a small contingent of axons in the ventral striatum appeared to contain the protein. As optically-evoked DA release in the ventral striatum of these mice was blocked by suppressing firing with TTX, we performed all experiments in ventral mesencephalic slices in the presence of TTX, thus limiting any contribution of axonal processes to evoked DA release. We found that STD DA release was still detectable under such conditions and this STD DA release was not reduced by *syt1* gene deletion. Together, these results provide support for the fact that activity-dependent DA release detected in the VTA, and potentially also in the SNc, implicates a mix of STD and axonal DA release. A dual nature of released DA in the mesencephalon was also previously suggested based on an analysis of the calcium-dependency of DA release in the guinea pig VTA (*Chen et al., 2011*), although other work has provided support for a similar calcium-

dependency of release in mouse striatum and mesencephalon (*Beckstead et al., 2004, 2007; Courtney et al., 2012; Ford et al., 2009, 2010; Delignat-Lavaud et al., 2021*). Because the available anatomical data suggests that DA containing axonal varicosities are extremely scarce in the SN and VTA except in the context of compensatory axonal sprouting associated with partial lesions (*Fernandes Xavier et al., 1994*), it would be important to revisit this question in the future with a more thorough anatomical investigation. The novel optogenetic approach described here in order to trigger STD DA release more selectively should be very useful in the future to further explore the distinct molecular machinery involved in STD and axonal DA release so as to extend recent work showing a role for Syt4 and Syt7 isoforms in this process (*Mendez et al., 2011; Delignat-Lavaud et al., 2021*).

Considering that electrically evoked DA release in the VTA of Syt1 cKO^{DA} mice was reduced by approximately two-thirds, the near abolition of DA release in the VTA in the adult Syt1 KO mice is a puzzling observation. Considering the suboptimal selectivity of the TH-Cre virus used, one obvious possibility is that this could be an artifact due to abrogation of neurotransmitter release from local non-DA neurons that are also stimulated by the extracellular electrodes and that contribute to triggering STD DA release. An approach to resolve this would be to combine this adult KO strategy with the proposed STD optogenetic approach. The use of an inducible DAT-Cre line would also be another possibility to obtain a more selective adult Syt1 KO.

Our results shed new light on the striking resilience of DA-dependent motor functions at early stages of PD, during which an extensive loss of DA in the striatum gradually occurs with substantial motor dysfunctions only appearing after more than 70% of terminals in the striatum are lost (*Halliday et al., 1990*). This resilience has been hypothesized to be due to gradually established compensations in the DA system, including increased DA synthesis in the remaining DA axons and D2 receptor upregulation, which has been observed in human tissue and in multiple PD models (*Bezard et al., 2003; Mercuri and Bernardi, 2005; Golden et al., 2013*). Our work raises the hypothesis that as loss of DA terminals progresses in PD, even if phasic DA release is greatly impaired, as long as a sufficient tone of basal extracellular is maintained, many basic motor functions will be preserved. This may also help explain why even strategies that increase the basal tone of DA without restoring the normal connectivity of DA neurons, such as the implantation of DA-secreting non-neuronal cells can help to reduce motor symptoms in PD animal models (*Parmar*

et al., 2019). In this context Syt1 cKO^{DA} could represent a new model to study compensatory mechanisms and sensitivity in PD.

This model also represents a new tool to study spontaneous release mechanisms and to tackle the role of phasic DA release in the brain. Evaluation of other DA-controlled functions such as motivation, learning, cognition or reward would be an important next step to further document the role of phasic DA release. Our findings are also likely to be relevant to a better understanding of signaling by other neuromodulators such as serotonin and norepinephrine, that show connectivity patterns that are similar to that of DA neurons.

Our results are also compatible with previous work obtained in mice in which 90% of SNc dopaminergic neurons were genetically ablated, leading to a consequent depletion of > 95% of striatal DA (*Golden et al.*, 2013). In these mice, motor behaviors of young-adult or aged mice were also largely unaltered. These mutant mice also exhibited an exaggerated response to L-DOPA suggesting that preservation of motor functions involves sensitization of striatal DA receptors. This result is in keeping with our amphetamine-induced locomotion and autoradiography results, which also point toward the sensitization of DA receptors in Syt1^{-/-} mice. The authors concluded that <5% of striatal dopamine is sufficient to maintain basic motor functions.

In summary, we conclude that although Syt1 is clearly the main calcium sensor controlling DA release, a small component of phasic DA release requires another calcium sensor. We also conclude that Syt1-dependent phasic DA release is dispensable for many basic motor functions that require instead only a basal level of extracellular DA that could be provided either by (a) spontaneous DA exocytosis, (b) by the small component of phasic DA release that depends on other calcium sensors, (c) by phasic but desynchronized exocytosis or even (d) by DAT-mediated reverse transport. Further work will be required to test these possibilities.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. R. Schneggenburger for kindly provided the Syt1-floxed mouse, Dr. J. Surmeier for kindly provided TH-cre and control viruses, Dr. G. Miller for kindly provided VMAT2 antibody, Dr. A. Gratton for interpretation of HPLC data, Dr. D. Lévesque for autoradiography analysis, IRIC genomic platform for RT-qPCR analysis, Neurophonic Québec for cloning and packaging ChR2-Kv virus, F.C. Ron for support, M-E. Delignat-Lavaud for illustrations. This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant RGPIN-2020-05279) to L-E.T. B.D-L received a graduate student award from Parkinson Canada.

Author contributions

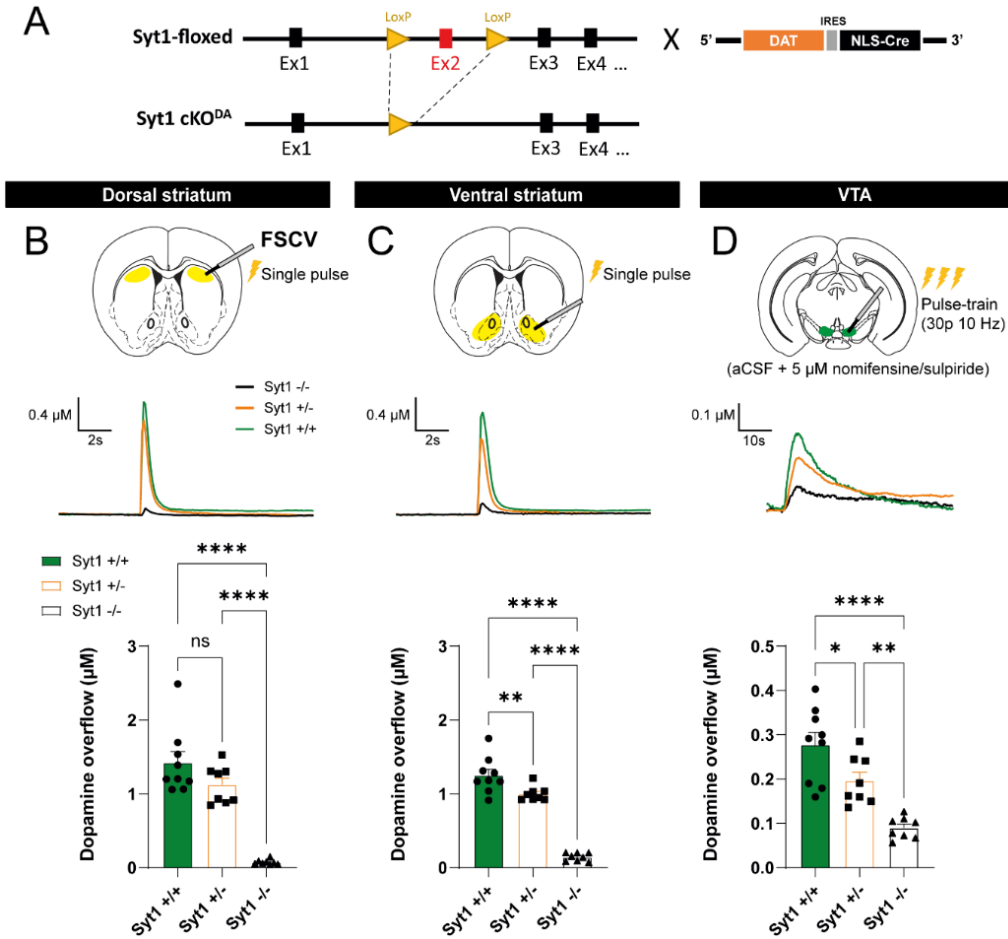
B.D-L.: conceptualization and design, acquisition, analysis, validation and interpretation of data (voltammetry, behavior, autoradiography, IHC, viral infections and RT-qPCR), drafting or revising the manuscript. J.K.: acquisition and analysis of data (IHC). C.D.: acquisition and analysis of data (ICC). I.M.: acquisition and analysis of data (microdialysis). S.M.: acquisition and analysis of data (Western Blot). N.G.: acquisition and analysis of data (stereology), revising the manuscript. L.M.: acquisition of data (HPLC). C.L.: acquisition of data (autoradiography). S.B.N.: acquisition of data (ICC). M-J.: acquisition of data (cell culture), P. R-N.: review and editing, D.L.: review, editing and analysis of data (autoradiography), L. D.B.: review and editing, L-E.T.: conceptualization and design, resources, funding acquisition, writing - review and editing.

Declaration of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

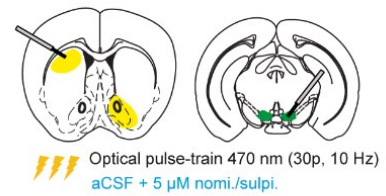
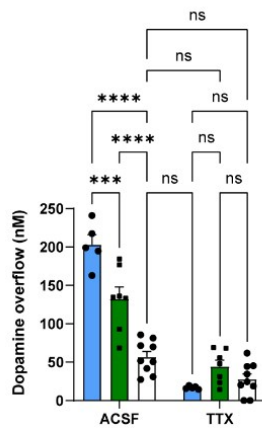
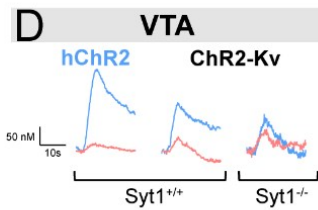
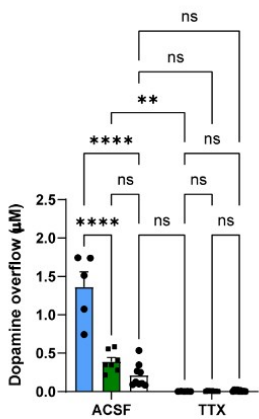
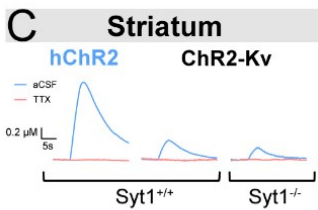
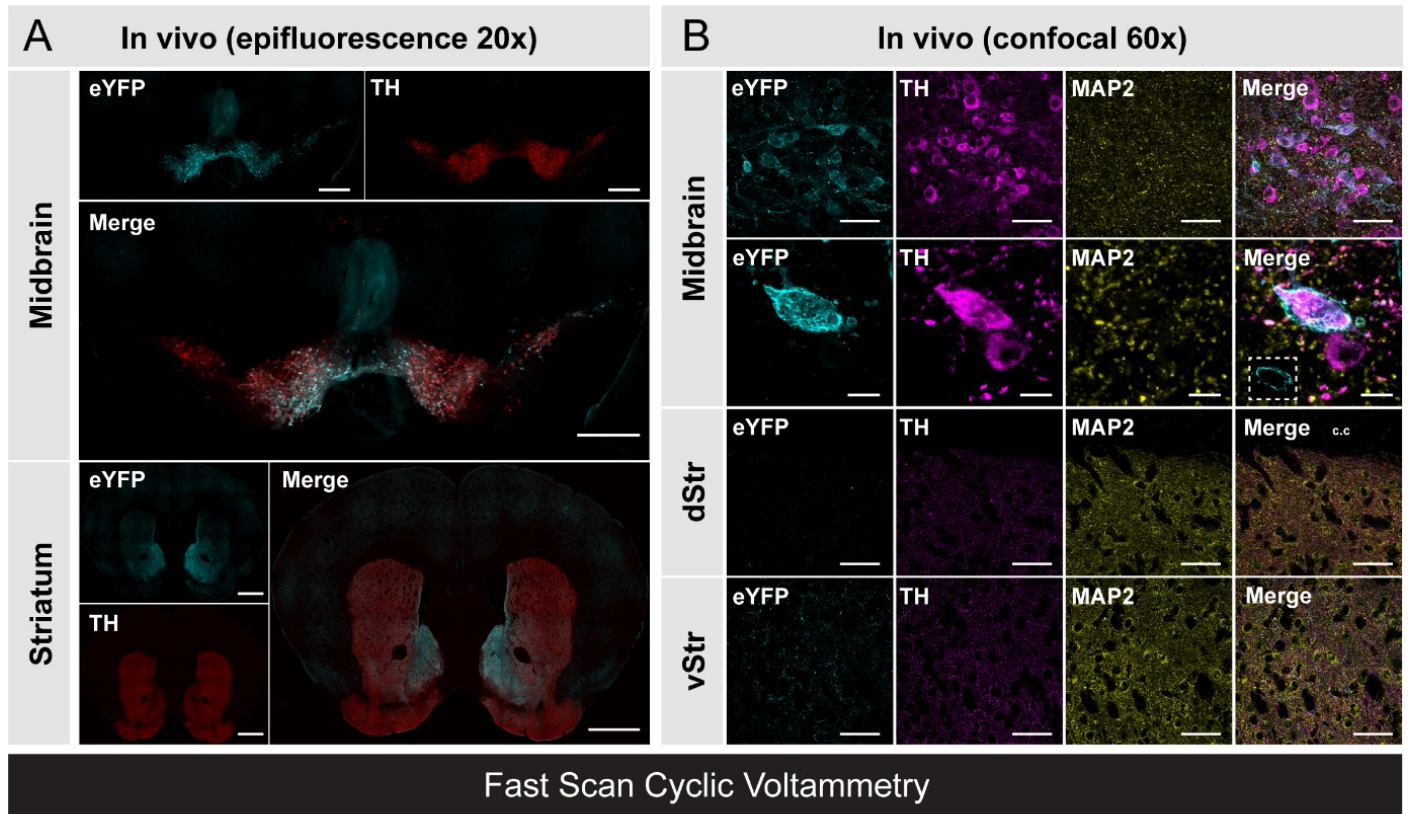
3.6. Figures and legends

Figure 1. – Syt1 is the main calcium sensor for fast axonal dopamine release.

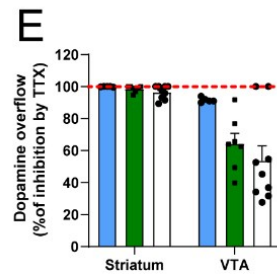


(A) Generation of conditional knock-out of Syt1 in DA neurons by crossing Syt1-floxed mice (*Syt1^{lox/lox}*) with *DAT^{IREScre}* mice. (B) Fast scan cyclic recording of Syt1 cKO^{DA} mice in the dorsal striatum. Representative traces (top) and quantification of peak amplitude (bottom) obtained with single-pulse electrical stimulation (1 ms, 400 µA) in Syt1^{+/+} (n = 18 slices/9 mice), Syt1^{+/-} (n = 16/8) and Syt1^{-/-} mice (n = 16/8). (C) Same, but in the ventral striatum (NAc core and shell). (D) Representative traces (top) and quantification of peak amplitude (bottom) obtained in the VTA with aCSF containing nomifensine (DAT blocker) and sulpiride (D2 antagonist) (both at 5 µM), and pulse-train stimulation (30 pulses of 1 ms at 10 Hz, 400µA). Error bars represent ± S.E.M. and the statistical analysis was carried out by 1-way ANOVAs followed by Tukey tests (ns, non-significant; *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001).

Figure 2. – Somatodendritic optogenetics reveals unaltered STD DA release in the absence of *Syt1*.

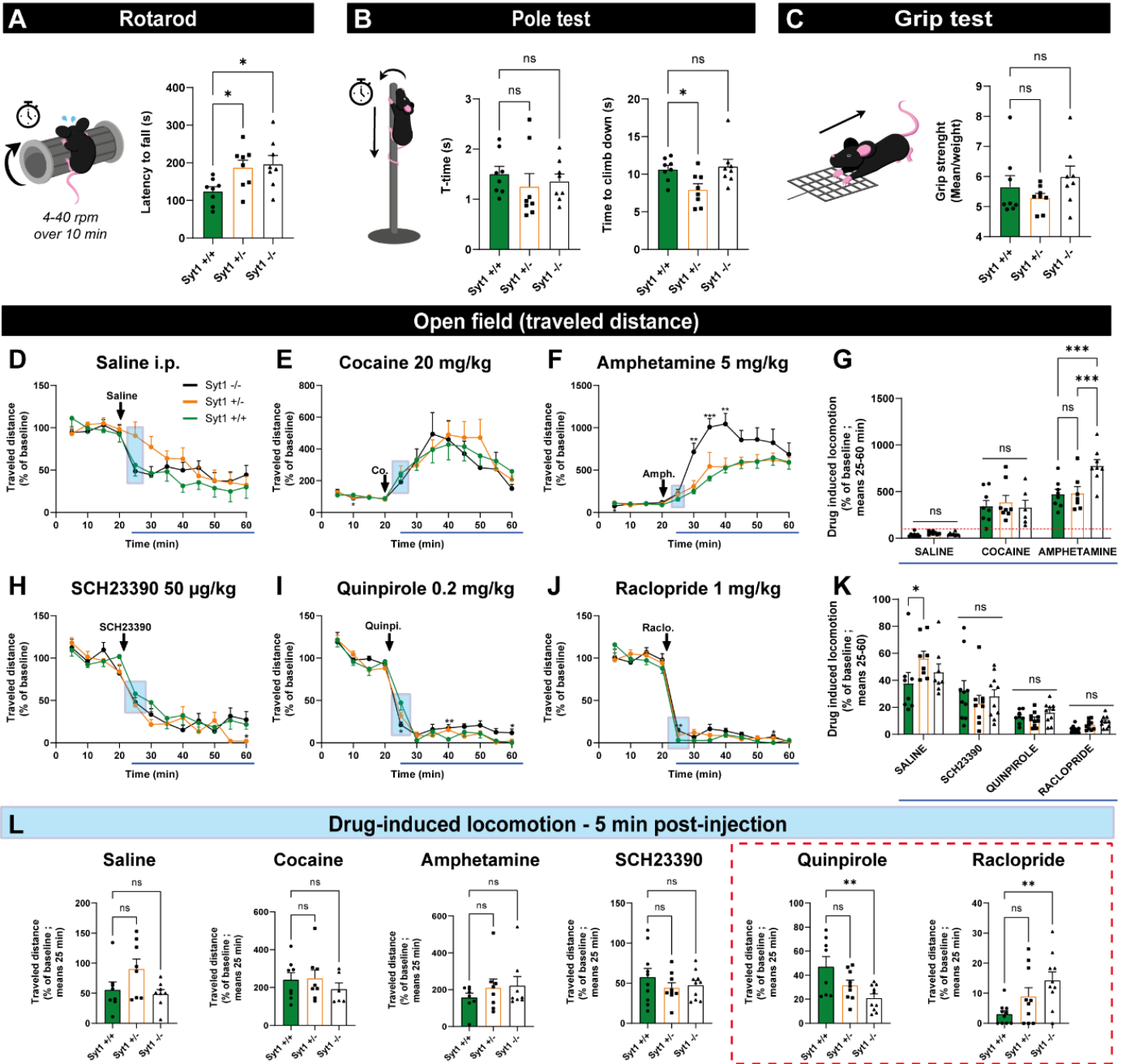


■ Syt1^{+/+} hChR2
■ Syt1^{+/+} ChR2-Kv
■ Syt1^{-/-} ChR2-Kv



(A) Immunohistochemistry in brain slices of adult *Syt1* cKO^{DA} mice infected with AAV2/5-hsyn-DIO-ChR2-eYFP-Kv, showing expression of ChR2-Kv (eYFP) in the whole ventral mesencephalon (scale bar = 500 μ m) and striatum (scale bar = 1 mm) using epifluorescence microscope at 20x. **(B)** Expression of ChR2-Kv in the same mice evaluated by confocal microscopy at 60x shows infected DA neurons (TH) in the midbrain (up panel, scale bar = 50 μ m). Optical zoom and z-stack on an infected DA neuron showing the membrane distribution of the eYFP signal (bottom panel, scale bar = 10 μ m, insert in the merge image shows the eYFP signal at a single focal plane). Evaluation of the eYFP signal in the striatum shows no axonal processes in the dorsal sector but a small contingent of positive fibers in the ventral sector of the striatum (scale bar = 50 μ m). **(C-E)** Fast scan cyclic voltammetry recordings with average $[DA]_o$ peaks obtained in striatal **(C)** and midbrain **(D)** slices of infected *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice with AAV2/5-hsyn-DIO-ChR2-eYFP-Kv (ChR2-Kv) or AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP (control hChR2). Representative traces of each conditions are shown at the top. DA release was optically triggered in each region using pulse-train stimulation (30 pulses of 470 nm blue light at 10 Hz) in ACSF containing 5 μ M of nomifensine and sulpiride. **(E)** TTX (1 μ M) effect on average $[DA]_o$ peaks in the striatum and the VTA (% of inhibition).

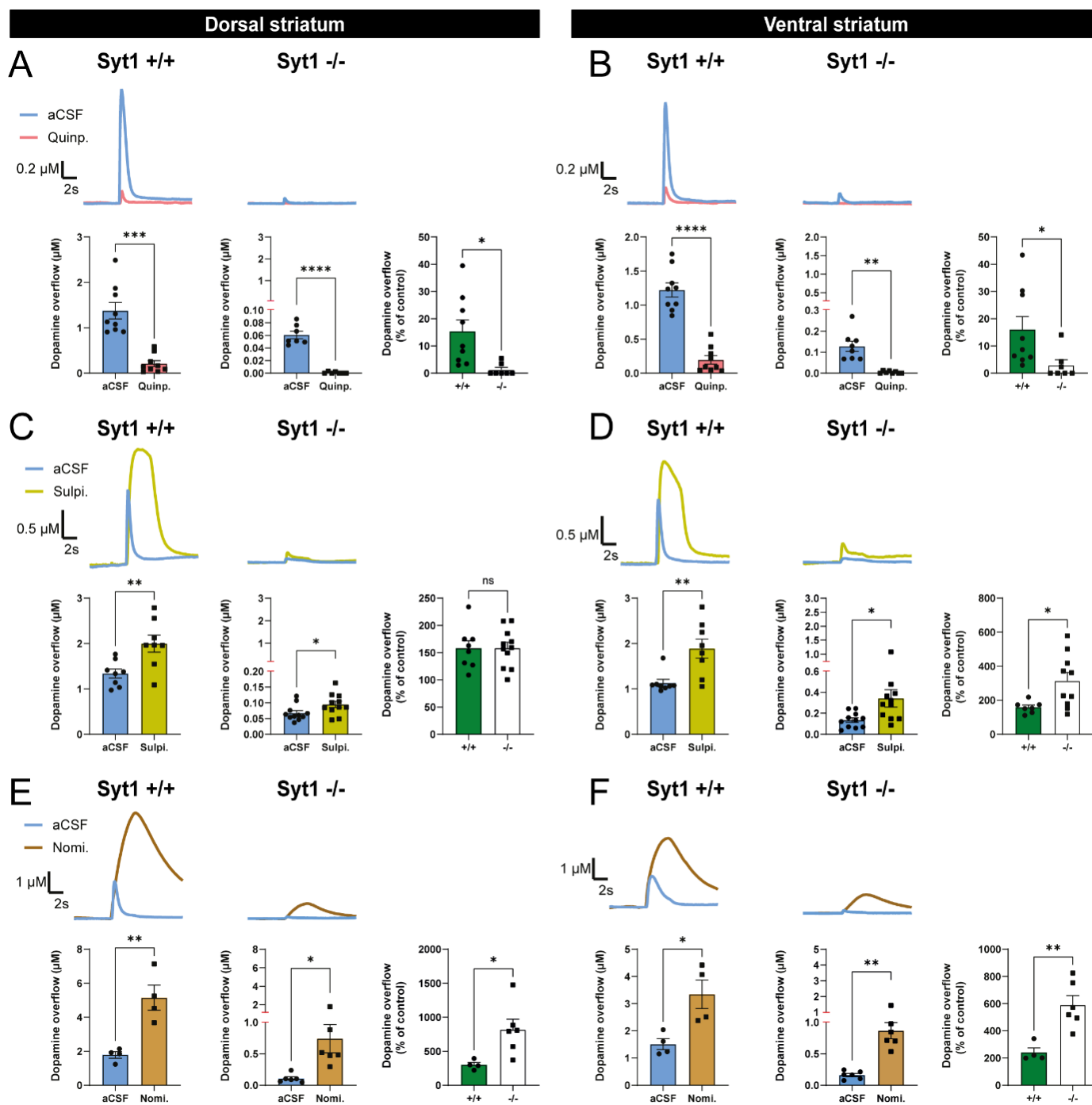
Figure 3. – *Syt1 cKO^{DA}* mice do not exhibit any substantial motor defects.



(A) Latency to fall from the device during the rotarod test for *Syt1*^{+/+}, *Syt1*^{+/-} and *Syt1*^{-/-} mice ($n = 8$, mean of 3 attempts) (B) Time for *Syt1*^{+/+}, *Syt1*^{+/-} and *Syt1*^{-/-} mice ($n = 8$) to turn (t-turn) and climb down the vertical pole (mean of 3 attempts/2 days). (C) Forelimb grip strength (mean of 3 trials/weight) developed by *Syt1*^{+/+}, *Syt1*^{+/-} and *Syt1*^{-/-} mice ($n = 8$), using a force sensor connected

to a grid. Statistical analysis for A-C were carried out by 1-way ANOVAs followed by Dunnett tests. **(D-L)** Locomotion of *Syt1* cKO^{DA} mice measured as traveled distance (% of a 20 min baseline) under saline treatment (n = 8 mice) **(D)**, cocaine at 20 mg/kg (n = 8 *Syt1*^{+/+}/*Syt1*^{+/-} and 6 *Syt1*^{-/-}) **(E)**, amphetamine at 5 mg/kg (n = 8 mice) **(F)**, the D1 agonist SCH23390 at 50 µg/kg (n = 10 *Syt1*^{+/+}/*Syt1*^{-/-} and 9 *Syt1*^{+/-}) **(H)**, the D2 agonist quinpirole at 0.2 mg/kg (n = 10 *Syt1*^{-/-} / *Sy*^{+/-} and 8 *Syt1*^{+/+}) **(I)** and the D2 antagonist raclopride at 1 mg/kg (n = 10 mice) **(J)**. Statistical analyses for D-J were carried out by 2-way ANOVAs followed by Dunnett tests. **(G&K)** Average drug-induced locomotion (% of baseline) during a 40 min recording period (mean between 25-60 min) are represented for cocaine/amphetamine treatment **(G)** and for SCH23390/quinpirole/raclopride treatments **(K)**. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Tuckey tests. Blue squares indicate the average traveled distance for each mouse, 5 min after receiving an i.p. injection of each tested drugs **(L)**. Statistical analysis was carried out by 1-way ANOVAs followed by Dunnett tests. Error bars represent ± S.E.M. (ns, non-significant; *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001).

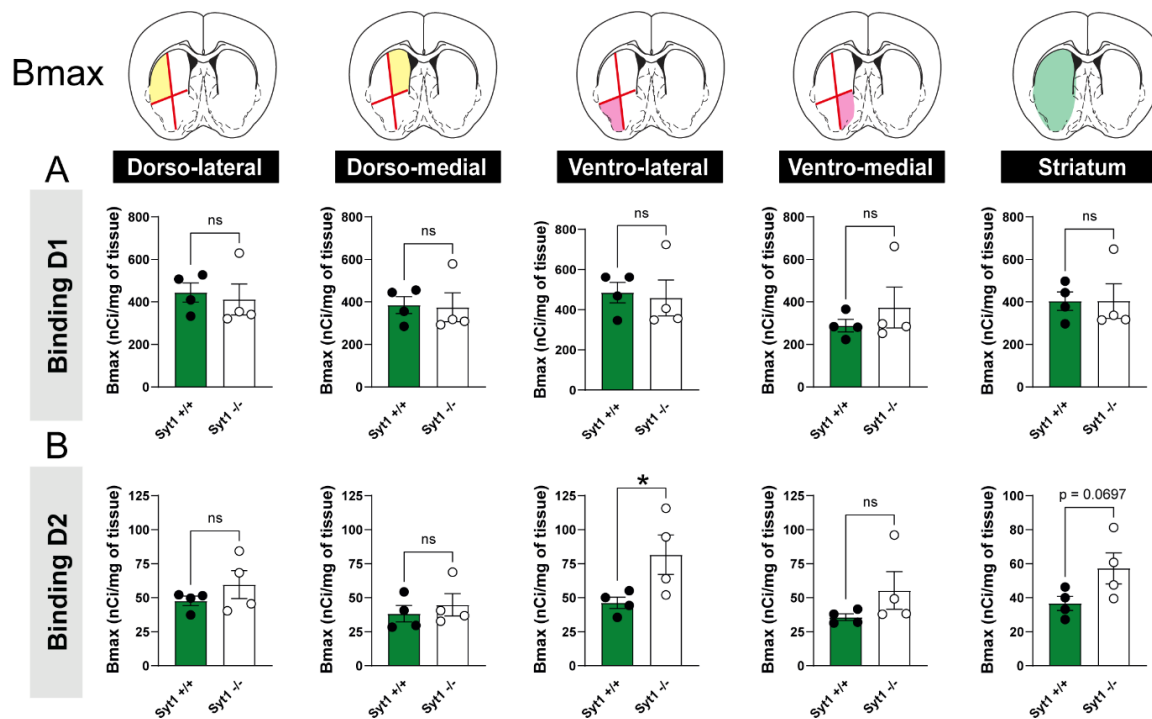
Figure 4. – Increased D2 autoreceptor and DAT function in *Syt1* cKO^{DA} mice.



(A) FSCV representative traces (top) and quantification of peak amplitude (bottom) obtained in *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice with single-pulse electrical stimulation and aCSF containing 1 μM of the D2 agonist quinpirole. **(B)** Same, but in the ventral striatum. **(C)** FSCV representative traces (top) and quantification of peak amplitude (bottom) obtained in *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice with pulse-train

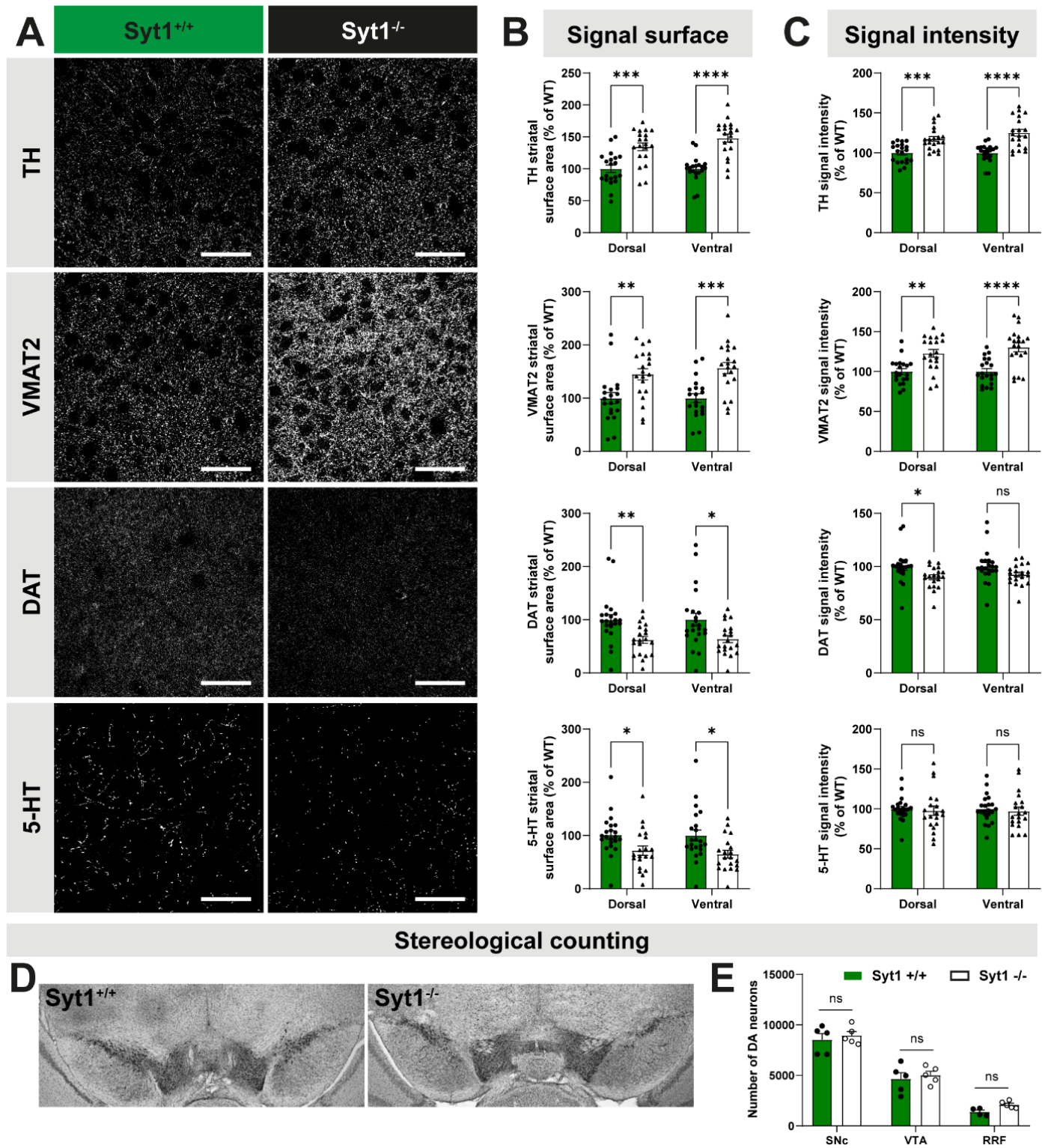
stimulation and aCSF containing 5 μ M of the D2 antagonist sulpiride. **(D)** Same, but in the ventral striatum. **(E)** FSCV representative traces (top) and quantification of peak amplitude (bottom) obtained in *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice with pulse-train stimulation and aCSF containing 5 μ M of the DAT blocker nomifensine. **(F)** Same, but in the ventral striatum. For each tested drug, the effect on DA release (% of control) for both genotypes is indicated in the right panel. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Šidák's corrections. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Figure 5. – Higher D2 receptor density with no change in affinity in *Syt1* cKO^{DA} mice.



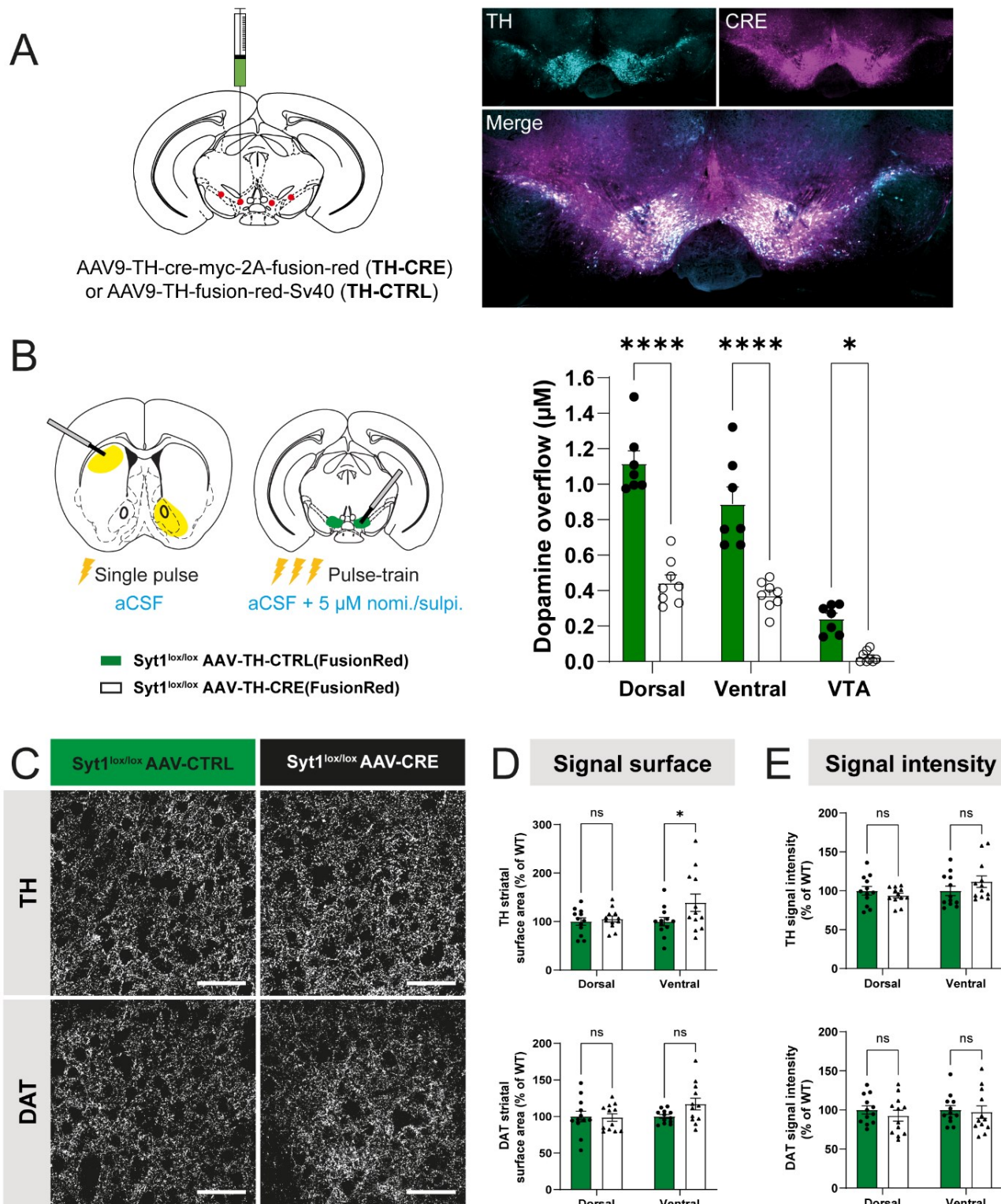
Density of DA receptors (B_{max}) for D1 (**A**) and D2 (**B**) in *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice ($n = 4$). Each binding was analyzed with a series of 4 serial coronal sections (bregma +1.34 mm to +0.38 mm) and by dividing each section into 4 quadrants (dorso-lateral, ventro-lateral, dorso-medial and ventro-medial). The data followed a log-normal distribution and unpaired *t*-tests were done after the data were converted to a log scale. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Figure 6. – Adaptations of DA synthesis and packaging in *Syt1* cKO^{DA} mice.



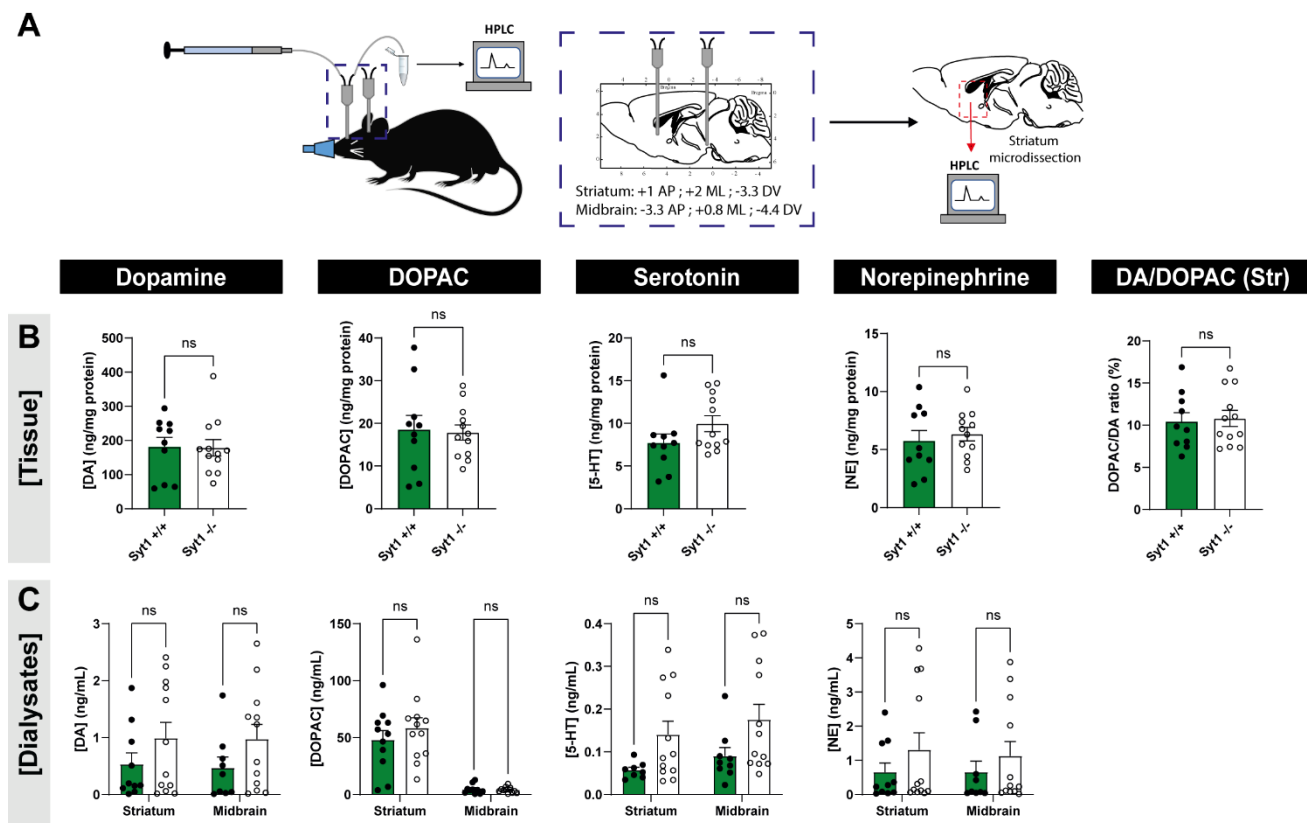
(A) *Immunochemistry of striatal slices from 10-12 week-old Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice (60x confocal) using (from top to bottom): tyrosine hydroxylase (TH), vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2), dopamine transporter (DAT) and serotonin (5-HT) immunostainings. Scale bar = 50 μ m. (B) Quantification of each signal surface (% of WT) in the dorsal and ventral striatum (n = 20 hemispheres/10 mice). (C) Same with signal intensity. (D) TH immunoreactive cells in the midbrain of Syt1^{+/+} and Syt1^{-/-} mice, identified by the brown DAB staining. (E) Stereological counts of DA neurons in the SNc, VTA and RRF. Unbiased stereological counting was performed by a blinded observer to estimate the number of DA neurons. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Šidák's corrections. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).*

Figure 7. – Acute deletion of *Syt1* in adult mice impairs DA release but prevents adaptations.



(A) Stereotaxic injections of AAV9-TH-Cre and AAV9-TH-FusionRed (control) viruses in 6-7-week old *Syt1^{lox/lox}* mice effectively infects the whole ventral mesencephalon (epifluorescence imaging of TH (cyan) and FusionRed (Cre, magenta) immunostainings). **(B)** FSCV recordings (DA overflow in μM) of dorsal and ventral striatum (single electrical pulse 1 ms, 400 μA , normal aCSF) and VTA (pulse-train 30p, 1ms, 400 μA , 10 Hz in presence of 5 μM of nomifensine/sulpiride) from *Syt1^{lox/lox}* mice injected with AAV9-TH-Cre and AAV9-TH-Control viruses. **(C)** Immunohistochemistry of striatal slices from 9-10 week old *Syt1^{lox/lox}* injected with AAV9-TH-Cre (black) and AAV9-TH-control (green) illustrating TH and DAT immunostaining (60x confocal). Scale bar = 50 μm . **(B)** Quantification of each signal surface (% of WT) in the dorsal and ventral striatum of injected mice ($n = 12$ hemispheres/6 mice). **(C)** Same with signal intensity. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Šidák's corrections. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Figure 8. – Basal extracellular DA levels and total tissue DA are not altered in *Syt1* cKO^{DA} mice.



(A) Schematic representation of the intracerebral microdialysis protocol performed on anesthetized *Syt1* cKO^{DA} and control mice. (B) Quantification of total DA, DOPAC, serotonin and norepinephrine striatal content (ng/mg of total proteins) and DA/DOPAC ratio ($n = 10$ *Syt1*^{+/+} and 12 *Syt1*^{-/-}). Statistical analysis was carried out by unpaired *t*-test. (C) Extracellular quantification (ng/mL) by microdialysis of the same molecules in the dorsal striatum and in the mesencephalon of *Syt1* cKO^{DA} mice, with an average of 3 dialysates for each animal. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Šidák's corrections. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

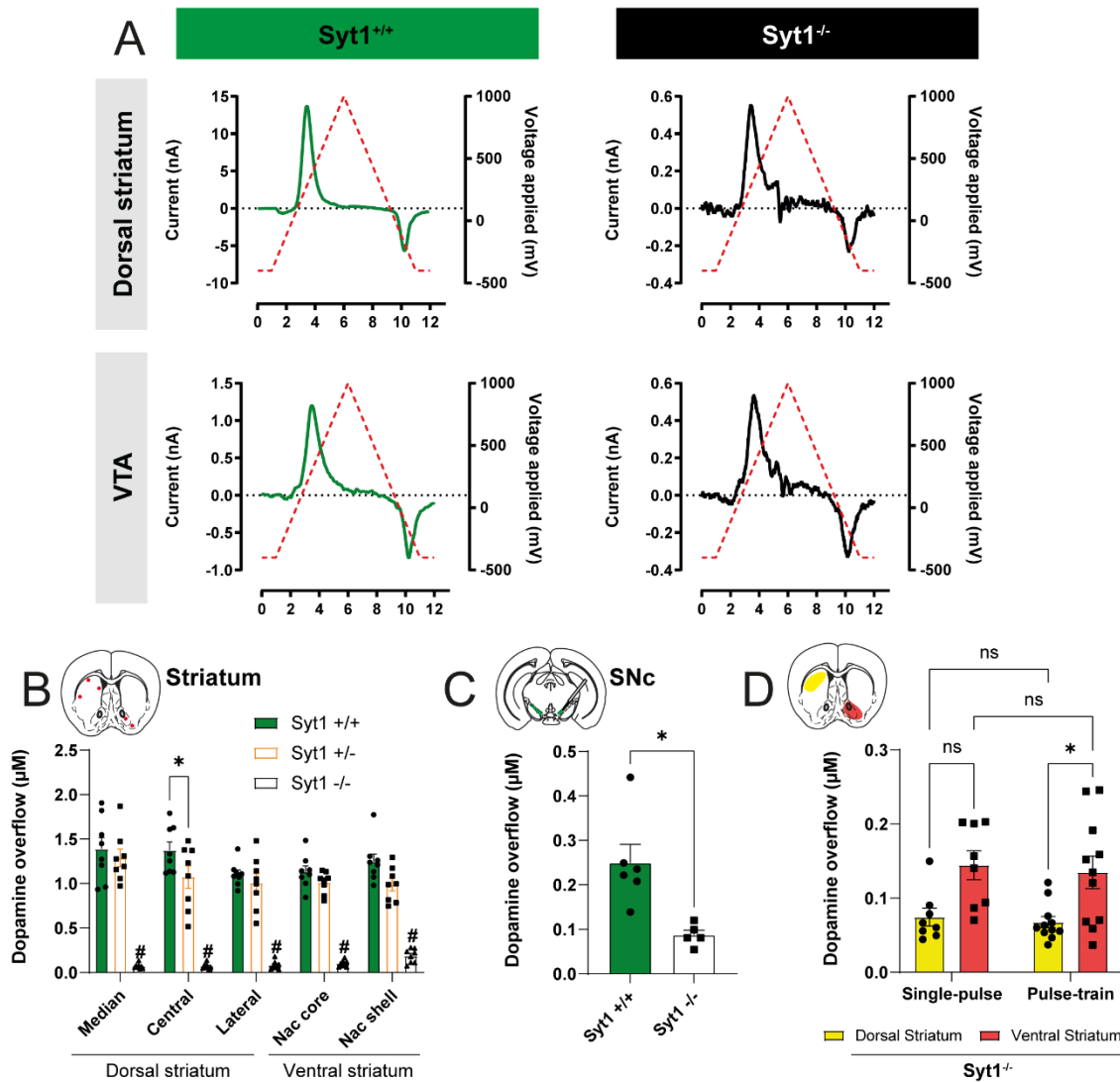
3.7. Supplemental information

Supplemental Table 1: *primers used for RT-qPCR quantifications.*

GENE	UPL PROBE	OLIGO FWD	OLIGO REV	REFSEQ OF ISOFORM DETECTED	EFFICIENCY
<i>GAPDH</i>	80	agccacatcgctcagacac	gcccaatacgaccaaacc	NM_008084.2	91%
<i>TH</i>	15	ccaagggcttcagaagag	gggcatcctc gatgagact	NM_009377	106%
<i>SLC18A2</i>	25	caactttggagttggtttgc	ccaccaggtagcccatgata	NM_172523.3	93%
<i>SLC6A3</i>	16	ggaggcttacaggacctcaa	gagcccgaggaagtctgttt	NM_010020.3	95%
<i>SYT1</i>	63	gggaagaccatgaaggatca	tgaagctttccagtttctcc	NM_009306.3, NM_001252341.1, NM_001252342.1	90%
<i>SYT4</i>	25	cccagaaaacctaagtagcaaaaa	agagcggctttacccttcac	NM_009308.3	90%
<i>SYT7</i>	6	gacgccacacgatgagtct	ctcagaacccggggagag	NM_018801.3, NM_173067.3, NM_173068.2	103%
<i>SYT11</i>	27	ggggtgtgtgctgtaaaagg	gtgctcacgggatattctta	NM_018804.3	90%
<i>DOC2B</i>	1	ggctgatccctacgtcaaac	ccgaagagttttgttctgagc	NM_007873.3	98%

Supplemental figure and legends

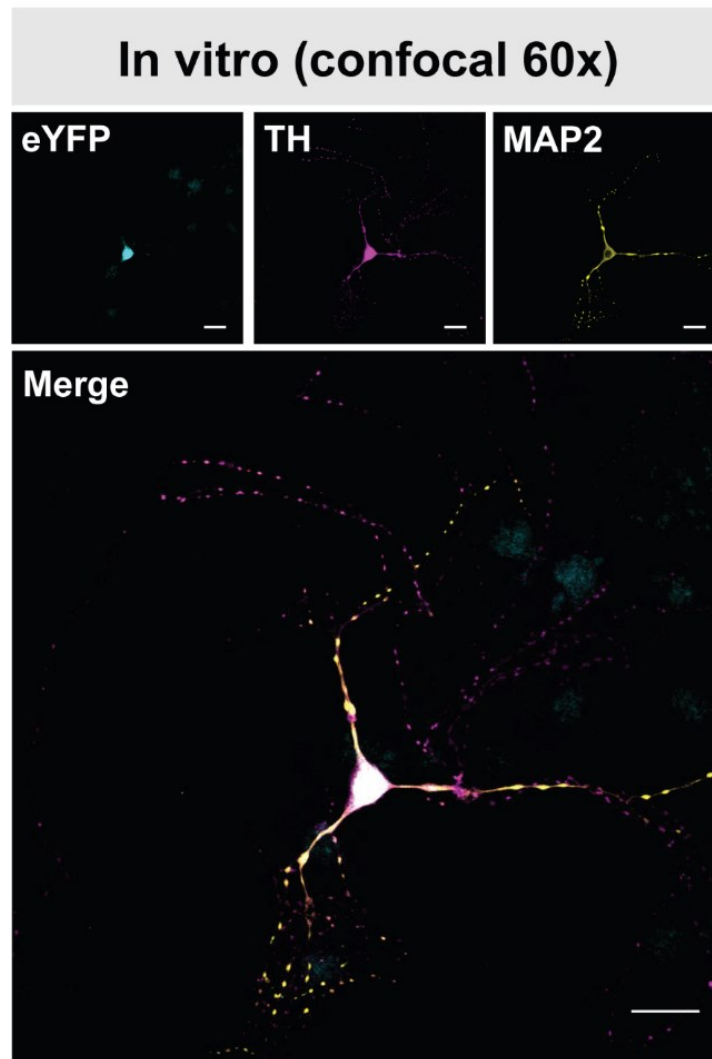
Figure 9. – Figure S1- FSCV recordings in *Syt1* cKO^{DA} mice.



(A) Representative voltammograms obtained in the dorsal striatum and VTA from *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice using a voltage ramp of -400 to 1000 mV vs Ag/AgCl at 300 V/s with a 100 ms sampling interval. (B) Regional sampling (single pulse, 1 ms, 400 μA) of DA release in *Syt1*^{+/+} ($n = 18$ slices/9 mice), *Syt1*^{+/-} ($n = 16/8$) and *Syt1*^{-/-} mice ($n = 16/8$) in the dorsal striatum (median, central and lateral) and ventral striatum (Nac core and shell). Statistical analysis was carried out by a 2-way ANOVA followed by a Tukey test. (C) Quantification of peak amplitude measured in the SNc of *Syt1*^{+/+} ($n = 12/6$) and *Syt1*^{-/-} mice ($n = 10/5$) with pulse-train stimulation in presence of 5 μM of nomifensine/sulpiride. Statistical analysis was carried out by an unpaired *t*-test with Welch's

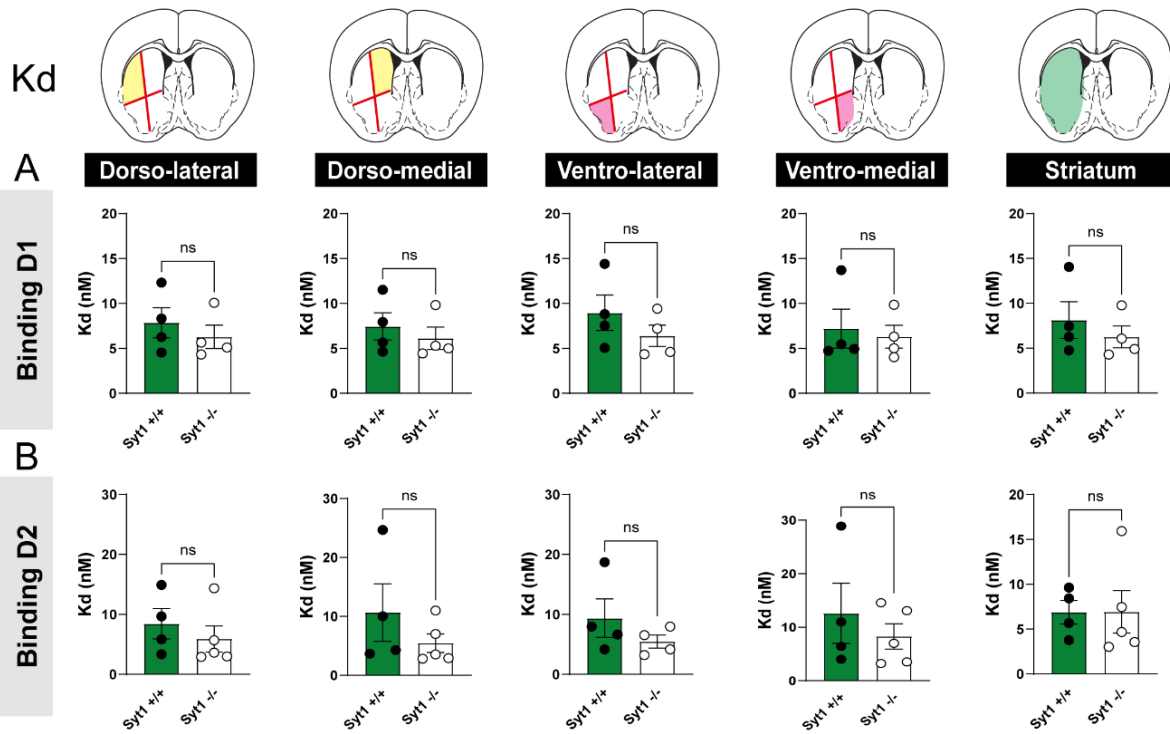
correction. **(D)** Quantification of peak amplitude measured in the dorsal (yellow) and ventral striatum (red) of *Syt1*^{-/-} mice using single pulse ($n = 16/8$) or pulse-train stimulation ($n = 22/11$). Statistical analysis was carried out by a 2-way ANOVA followed by a Šidák's correction. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Figure 10. – Figure S2: Somatodendritic subcellular localization of ChR2-Kv in cultured dopamine neurons.



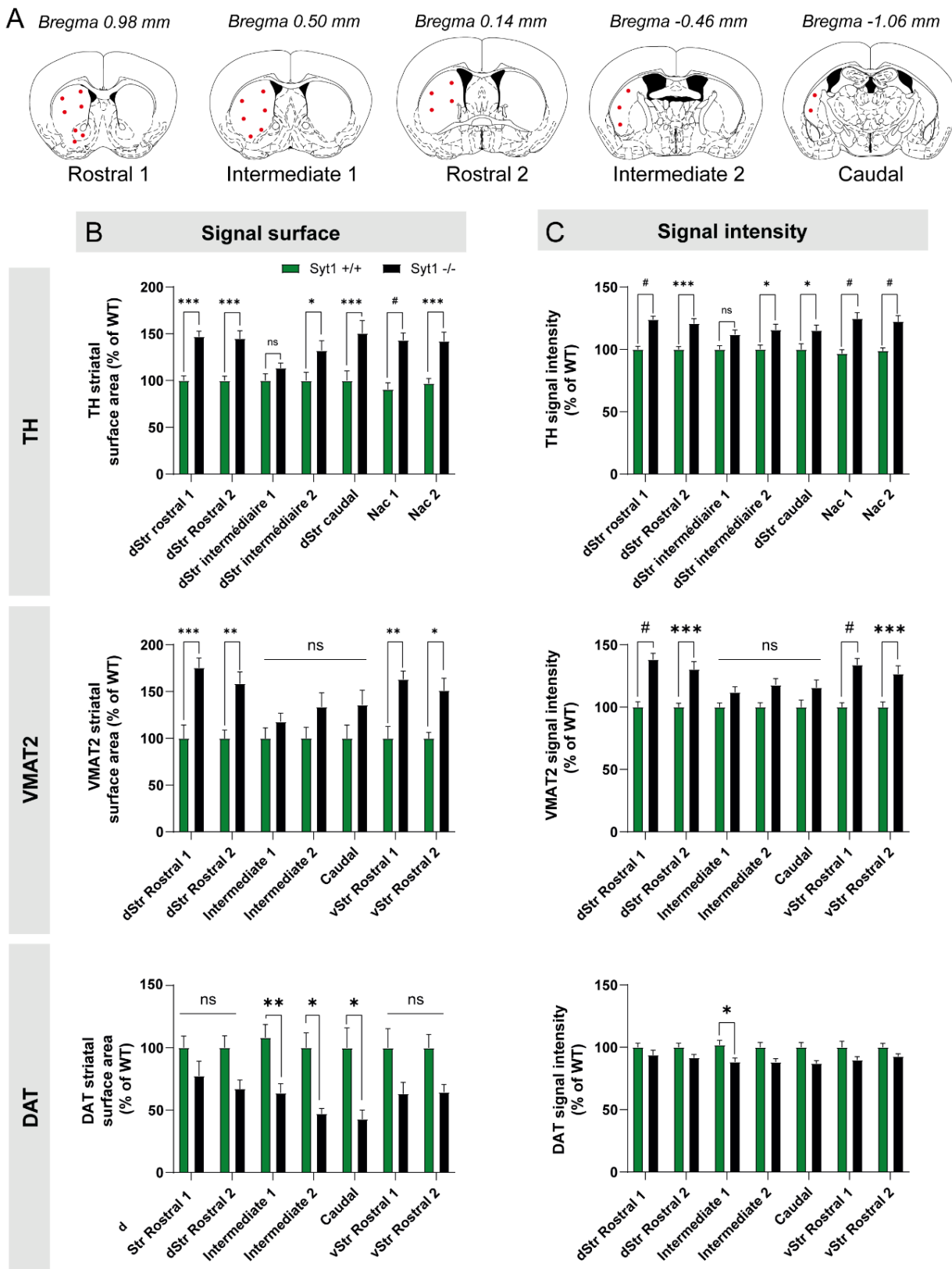
Immunocytochemistry in primary cultured DA neurons (TH) infected with AAV2/5-hsyn-DIO-ChR2-eYFP-Kv shows the expression of ChR2-Kv (eYFP) within the soma and proximal dendrite (TH⁺/MAP2⁺), but a lack of expression in the axonal compartment (TH⁺/MAP2⁻ processes), with confocal microscopy at 60x (scale bar = 20 μ m).

Figure 11. – Figure S3: Autoradiography of D1 and D2 receptors in *Syt1* cKO^{DA} mice.



Affinity of [³H]-SCH23390 and [³H]-raclopride for D1 (A) and D2 (B) dopamine receptors in *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice (*n* = 4). Each binding was analyzed with a series of 4 serial coronal sections (bregma +1.34 mm to +0.38 mm) and by dividing each section into 4 quadrants (dorso-lateral, ventro-lateral, dorso-medial and ventro-medial). The data followed a lognormal distribution and unpaired *t*-tests were performed after the data were converted to a log scale. Error bars represent ± S.E.M. (ns, non-significant; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001; ****, *p* < 0.0001).

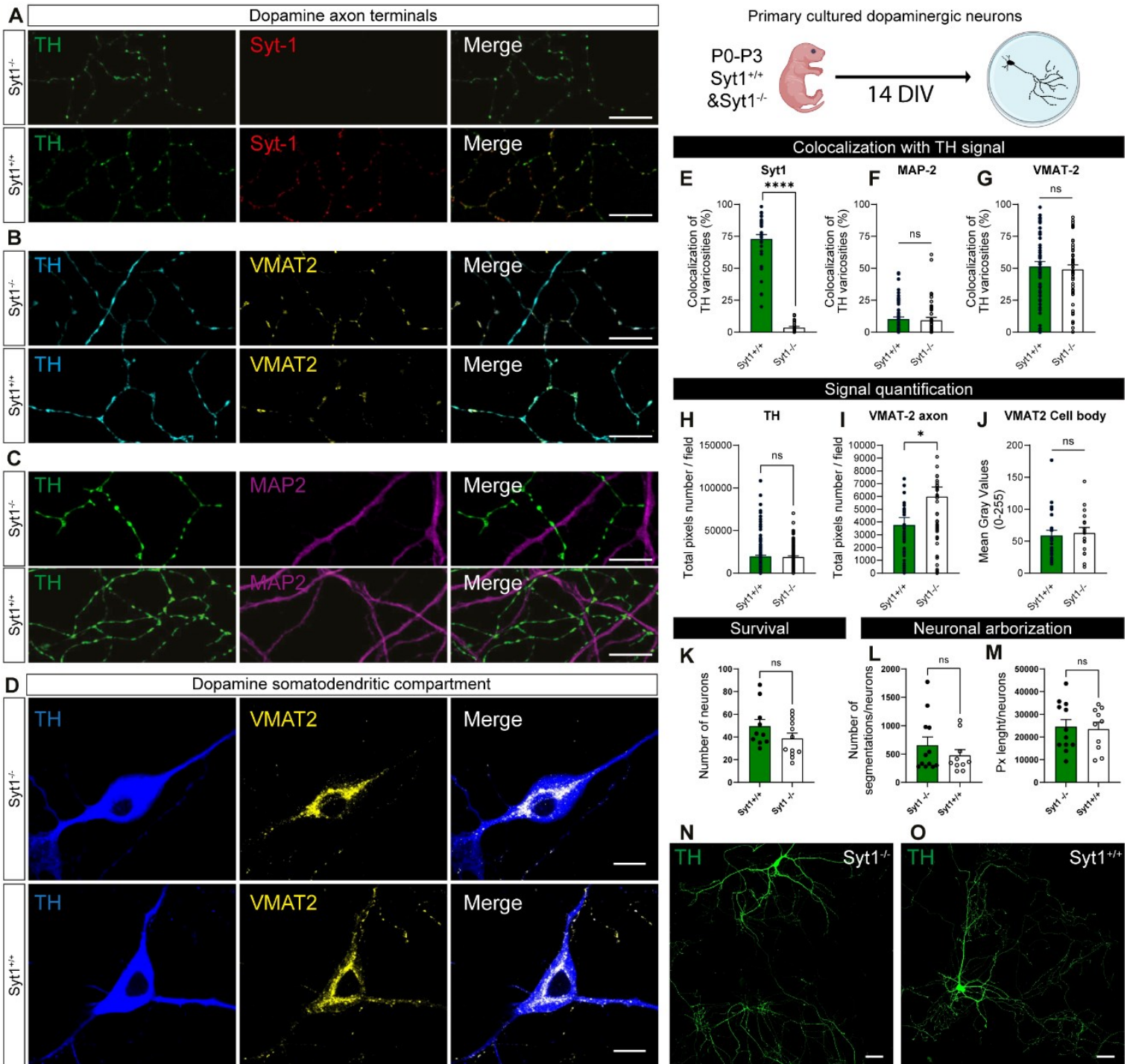
Figure 12. – Figure S4: Regional adaptations of the dopaminergic system of *Syt1* cKO^{DA} mice.



(A) Schematic representation of striatal slices used for immunohistochemistry characterization. Surface and intensity for each signal were measured in a series of 5 different striatal slices ranging from bregma +0.98 to bregma -1.06 mm, with a total of 22 different areas for each hemisphere.

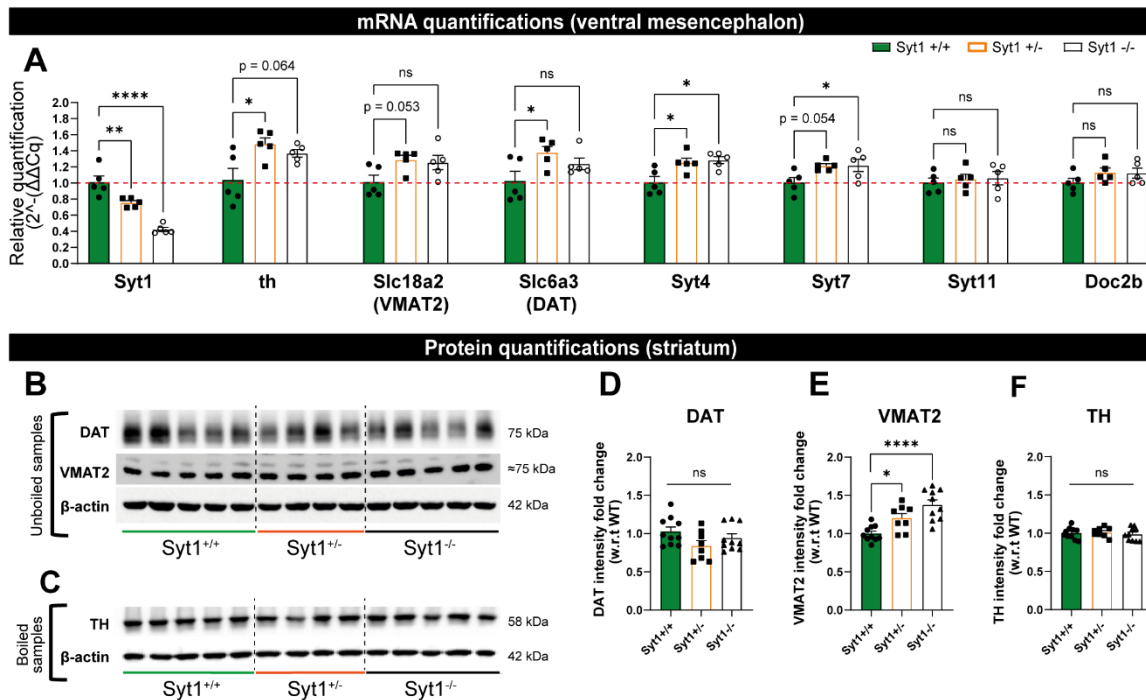
(B) Quantification of signal surface (% of WT) for TH, VMAT2, DAT and 5-HT in the different striatal regions examined: “rostral 1 and 2, intermediate 1 and 2 and caudal (n = 20 hemispheres/10 mice). “Nac 1 and 2” referring to the ventral striatum (nucleus accumbens) from the rostral 1 and 2 slices respectively. **(C)** Same for signal intensity of each immunostaining. Statistical analysis was carried out by 2-way ANOVAs followed by Šidák’s corrections. Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Figure 13. – Figure S5: No significant changes in the overall morphological development of cultured DA neurons.



Primary DA neurons from VTA or SNc were cultured from *Syt1*^{-/-} or *Syt1*^{+/+} P0-P3 pups and used for immunocytochemistry (ICC) at 14 days in vitro (DIV). **(A)** Immunocytochemistry of cultures prepared from *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice showing colocalization of *Syt1* signal with TH⁺ axonal varicosities (confocal 60x, scale bar = 10 μm). **(B)** Same with VMAT2 antibody. **(C)** Synaptic contacts of TH⁺ varicosities on MAP2⁺/TH⁺ dendrites. **(D)** Colocalization of VMAT2 signal with TH⁺ soma and dendrites (scale bar = 5 μm). **(E-G)** Quantifications of *Syt1* **(E)**, MAP2 **(F)** and VMAT2 **(G)** percentage of colocalization with TH⁺ varicosities. **(H-J)** Quantification of TH **(H)** and axonal **(I)** and somatodendritic **(J)** VMAT2 signals. **(K)** Evaluation of cultured *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} DA neuron survival, assessed by their number/coverslips at 14 DIV. **(L-M)** Evaluation of cultured *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} DA neuron development, assessed by the number of TH⁺ processes **(L)** and their length **(M)**. **(N-O)** Representative TH⁺ DA neurons at 14 DIV from *Syt1*^{-/-} **(N)** and *Syt1*^{+/+} pups (confocal 20x, scale bar = 50 μm). Error bars represent ± S.E.M. (ns, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Figure 14. – Figure S6: Gene expression and protein levels in *Syt1* cKO^{DA} mice.



(A) Relative changes of mRNA levels measured by RT-qPCR, from microdissected ventral mesencephalon containing the SN/VTA of adult *Syt1*^{+/+}, *Syt1*^{+/-} and *Syt1*^{-/-} mice (*n* = 5 per genotype). Ct values (mean of duplicate repeats) of *th*, *Slc18a2* (VMAT2), *Slc6a3* (DAT), *Syt1*, 4, 7 and 11 mRNA levels were normalized to the Ct value of GAPDH in the same samples. (B) Representative western blots illustrating either DAT, VMAT2 and β -actin from total striatum unboiled homogenates of adult *Syt1*^{+/+}, *Syt1*^{+/-} and *Syt1*^{-/-} mice. (C) Same for TH and β -actin in boiled samples. (D-F) Immunoblot quantifying relative protein levels (fold change compared to controls) for DAT (D), VMAT2 (E) and TH (F) (*n* = 10 *Syt1*^{+/+} and *Syt1*^{-/-} mice, *n* = 8 *Syt1*^{+/-}). Error bars represent \pm S.E.M. (ns, non-significant; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001; ****, *p* < 0.0001).

3.8. References

- Andrews, N.W., Chakrabarti, S., 2005. There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII. *Trends Cell Biol* 15, 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.001>
- Antonopoulos, J., Dori, I., Dinopoulos, A., Chiotelli, M., Parnavelas, J.G., 2002. Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. *Neuroscience* 110, 245–256. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00575-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00575-9)
- Bacaj, T., Wu, D., Burré, J., Malenka, R.C., Liu, X., Südhof, T.C., 2015. Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *PLOS Biology* 13, e1002267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002267>
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., Malenka, R.C., Südhof, T.C., 2013. Synaptotagmin-1 and Synaptotagmin-7 Trigger Synchronous and Asynchronous Phases of Neurotransmitter Release. *Neuron* 80, 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.026>
- Baker, C.A., Elyada, Y.M., Parra, A., Bolton, M.M., n.d. Cellular resolution circuit mapping with temporal-focused excitation of soma-targeted channelrhodopsin. *eLife* 5, e14193. <https://doi.org/10.7554/eLife.14193>
- Banerjee, A., Imig, C., Balakrishnan, K., Kershberg, L., Lipstein, N., Uronen, R.-L., Wang, J., Cai, X., Benseler, F., Rhee, J.S., Cooper, B.H., Liu, C., Wojcik, S.M., Brose, N., Kaeser, P.S., 2020a. Molecular and functional architecture of striatal dopamine release sites. *bioRxiv* 2020.11.25.398255. <https://doi.org/10.1101/2020.11.25.398255>
- Banerjee, A., Lee, J., Nemcova, P., Liu, C., Kaeser, P.S., 2020b. Synaptotagmin-1 is the Ca²⁺ sensor for fast striatal dopamine release. *eLife* 9, e58359. <https://doi.org/10.7554/eLife.58359>
- Bayer, V.E., Pickel, V.M., 1990. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *J. Neurosci.* 10, 2996–3013.
- Beckstead, M.J., Ford, C.P., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2007. Presynaptic regulation of dendrodendritic dopamine transmission. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1479–1488. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05775.x>

- Beckstead, M.J., Grandy, D.K., Wickman, K., Williams, J.T., 2004. Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron* 42, 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.019>
- Bergquist, F., Niazi, H.S., Nissbrandt, H., 2002. Evidence for different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. *Brain Res.* 950, 245–253. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03047-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03047-0)
- Bergquist, F., Shahabi, H.N., Nissbrandt, H., 2003. Somatodendritic dopamine release in rat substantia nigra influences motor performance on the accelerating rod. *Brain Research* 973, 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02555-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02555-1)
- Bezard, E., Gross, C.E., Brotchie, J.M., 2003. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends in Neurosciences* 26, 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00038-9)
- Carvelli, L., McDonald, P.W., Blakely, R.D., DeFelice, L.J., 2004. Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. *PNAS* 101, 16046–16051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403299101>
- Centonze, D., Grande, C., Saulle, E., Martín, A.B., Gubellini, P., Pavón, N., Pisani, A., Bernardi, G., Moratalla, R., Calabresi, P., 2003. Distinct Roles of D1 and D5 Dopamine Receptors in Motor Activity and Striatal Synaptic Plasticity. *J Neurosci* 23, 8506–8512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-24-08506.2003>
- Chen, B.T., Patel, J.C., Moran, K.A., Rice, M.E., 2011. Differential calcium dependence of axonal versus somatodendritic dopamine release, with characteristics of both in the ventral tegmental area. *Front Syst Neurosci* 5, 39. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00039>
- Cliburn, R.A., Dunn, A.R., Stout, K.A., Hoffman, C.A., Lohr, K.M., Bernstein, A.I., Winokur, E.J., Burkett, J., Schmitz, Y., Caudle, W.M., Miller, G.W., 2017. Immunochemical localization of vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in mouse brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy, Monoamine Transporters in Health and Disease* 83–84, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.11.003>
- Courtney, N.A., Mamaligas, A.A., Ford, C.P., 2012. Species Differences in Somatodendritic Dopamine Transmission Determine D2-Autoreceptor-Mediated Inhibition of Ventral Tegmental Area Neuron Firing. *J. Neurosci.* 32, 13520–13528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2745-12.2012>

- Delignat-Lavaud, B., Ducrot, C., Kouwenhoven, W., Feller, N., Trudeau, L.-É., 2021. Implication of synaptotagmins 4 and 7 in activity-dependent somatodendritic dopamine release. *bioRxiv* 2021.01.25.427983. <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.427983>
- Descarries, L., Bérubé-Carrière, N., Riad, M., Bo, G.D., Mendez, J.A., Trudeau, L.-É., 2008. Glutamate in dopamine neurons: Synaptic versus diffuse transmission. *Brain Research Reviews, Basal Ganglia* 58, 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.10.005>
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Bosler, O., Doucet, G., 1996. Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 375, 167–186. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961111\)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
- Deutch, A.Y., Goldstein, M., Baldino, F., Roth, R.H., 1988. Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 537, 27–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb42095.x>
- Donnan, G.A., Woodhouse, D.G., Kaczmarczyk, S.J., Holder, J.E., Paxinos, G., Chilco, P.J., Churchyard, A.J., Kalnins, R.M., Fabinyi, G.C., Mendelsohn, F.A., 1991. Evidence for plasticity of the dopaminergic system in parkinsonism. *Mol Neurobiol* 5, 421–433. <https://doi.org/10.1007/BF02935563>
- Dourado, M., Cardoso-Cruz, H., Monteiro, C., Galhardo, V., 2016. Effect of Motor Impairment on Analgesic Efficacy of Dopamine D2/3 Receptors in a Rat Model of Neuropathy. *J Exp Neurosci* 10, JEN.S36492. <https://doi.org/10.4137/JEN.S36492>
- Ducrot, C., Bourque, M.-J., Delmas, C.V.L., Racine, A.-S., Bello, D.G., Delignat-Lavaud, B., Lycas, M.D., Fallon, A., Michaud-Tardif, C., Nanni, S.B., Herborg, F., Gether, U., Nanci, A., Takahashi, H., Parent, M., Trudeau, L.-E., 2020. Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *bioRxiv* 2020.05.11.088351. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088351>
- Fasano, C., Bourque, M.-J., Lapointe, G., Leo, D., Thibault, D., Haber, M., Kortleven, C., Desgroseillers, L., Murai, K.K., Trudeau, L.-É., 2013. Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spiny neurons through both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology* 67, 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.030>

- Fasano, C., Kortleven, C., Trudeau, L.-E., 2010. Chronic activation of the D2 autoreceptor inhibits both glutamate and dopamine synapse formation and alters the intrinsic properties of mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 32, 1433–1441. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07397.x>
- Fasano, C., Poirier, A., DesGroseillers, L., Trudeau, L.-E., 2008. Chronic activation of the D2 dopamine autoreceptor inhibits synaptogenesis in mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 28, 1480–1490. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06450.x>
- Fasano, Caroline, Thibault, D., Trudeau, L.-É., 2008. Culture of Postnatal Mesencephalic Dopamine Neurons on an Astrocyte Monolayer. *Current Protocols in Neuroscience* 44, 3.21.1-3.21.19. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0321s44>
- Fawaz, C.S., Martel, P., Leo, D., Trudeau, L.-E., 2009. Presynaptic action of neurotensin on dopamine release through inhibition of D2 receptor function. *BMC Neuroscience* 10, 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-96>
- Fernandes Xavier, F.G., Doucet, G., Geffard, M., Descarries, L., 1994. Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 59, 77–87. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90100-7)
- Ford, C.P., Gantz, S.C., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2010. Control of extracellular dopamine at dendrite and axon terminals. *J. Neurosci.* 30, 6975–6983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1020-10.2010>
- Ford, C.P., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2009. The Time Course of Dopamine Transmission in the Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 29, 13344–13352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3546-09.2009>
- Fortin, G.D., Desrosiers, C.C., Yamaguchi, N., Trudeau, L.E., 2006. Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *J Neurochem* 96, 1740–1749. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03699.x>
- Gagnon, D., Eid, L., Coudé, D., Whissel, C., Di Paolo, T., Parent, A., Parent, M., 2018. Evidence for Sprouting of Dopamine and Serotonin Axons in the Pallidum of Parkinsonian Monkeys. *Front. Neuroanat.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00038>
- Giguère, N., Delignat-Lavaud, B., Herborg, F., Voisin, A., Li, Y., Jacquemet, V., Anand-Srivastava, M., Gether, U., Giros, B., Trudeau, L.-É., 2019. Increased vulnerability of nigral

- dopamine neurons after expansion of their axonal arborization size through D2 dopamine receptor conditional knockout. *PLOS Genetics* 15, e1008352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008352>
- Golden, J.P., Demaro, J.A., Knoten, A., Hoshi, M., Pehek, E., Johnson, E.M., Gereau, R.W., Jain, S., 2013. Dopamine-dependent compensation maintains motor behavior in mice with developmental ablation of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 33, 17095–17107. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0890-13.2013>
- Halliday, G.M., Li, Y.W., Blumbergs, P.C., Joh, T.H., Cotton, R.G.H., Howe, P.R.C., Blessing, W.W., Geffen, L.B., 1990. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 27, 373–385. <https://doi.org/10.1002/ana.410270405>
- Hauber, W., 1996. Impairments of movement initiation and execution induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors are reversed by a blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 73, 121–130. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00036-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00036-x)
- Hikima, T., Lee, C.R., Witkovsky, P., Chesler, J., Ichtchenko, K., Rice, M.E., 2021. Activity-dependent somatodendritic dopamine release in the substantia nigra autoinhibits the releasing neuron. *Cell Rep* 35, 108951. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108951>
- Isingrini, E., Guinaudie, C., C Perret, L., Rainer, Q., Moquin, L., Gratton, A., Giros, B., 2017. Genetic elimination of dopamine vesicular stocks in the nigrostriatal pathway replicates Parkinson's disease motor symptoms without neuronal degeneration in adult mice. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12810-9>
- Itzhak, Y., Martin, J.L., 1999. Effects of cocaine, nicotine, dizocipiline and alcohol on mice locomotor activity: cocaine–alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. *Brain Research* 818, 204–211. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01260-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01260-8)
- Jensen, C.S., Watanabe, S., Stas, J.I., Klaphaak, J., Yamane, A., Schmitt, N., Olesen, S.-P., Trimmer, J.S., Rasmussen, H.B., Misonou, H., 2017. Trafficking of Kv2.1 Channels to the Axon Initial Segment by a Novel Nonconventional Secretory Pathway. *J Neurosci* 37, 11523–11536. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3510-16.2017>

- Joshua, M., Adler, A., Bergman, H., 2009. The dynamics of dopamine in control of motor behavior. *Current Opinion in Neurobiology, Motor systems • Neurology of behaviour* 19, 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.10.001>
- Juraska, J.M., Wilson, C.J., Groves, P.M., 1977. The substantia nigra of the rat: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 172, 585–600. <https://doi.org/10.1002/cne.901720403>
- Kochubey, O., Babai, N., Schneggenburger, R., 2016. A Synaptotagmin Isoform Switch during the Development of an Identified CNS Synapse. *Neuron* 90, 984–999. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.038>
- Lim, S.T., Antonucci, D.E., Scannevin, R.H., Trimmer, J.S., 2000. A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K⁺ channel in hippocampal neurons. *Neuron* 25, 385–397. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80902-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80902-2)
- Liu, C., Goel, P., Kaeser, P.S., 2021. Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nature Reviews Neuroscience* 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00455-7>
- Liu, C., Kershberg, L., Wang, J., Schneeberger, S., Kaeser, P.S., 2018. Dopamine Secretion Is Mediated by Sparse Active Zone-like Release Sites. *Cell* 172, 706–718.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.008>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K.C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., Kaneko, T., 2009. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *J. Neurosci.* 29, 444–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>
- Maximov, A., Lao, Y., Li, H., Chen, X., Rizo, J., Sørensen, J.B., Südhof, T.C., 2008. Genetic analysis of synaptotagmin-7 function in synaptic vesicle exocytosis. *PNAS* 105, 3986–3991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712372105>
- Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Fasano, C., Kortleven, C., Trudeau, L.-E., 2011. Somatodendritic Dopamine Release Requires Synaptotagmin 4 and 7 and the Participation of Voltage-gated Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* 286, 23928–23937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.218032>
- Mercuri, N.B., Bernardi, G., 2005. The ‘magic’ of l-dopa: why is it the gold standard Parkinson’s disease therapy? *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.05.002>

- Misonou, H., Mohapatra, D.P., Trimmer, J.S., 2005. Kv2.1: A Voltage-Gated K⁺ Channel Critical to Dynamic Control of Neuronal Excitability. *NeuroToxicology, First International Porto Pirgos Conference on Advances in Neuroscience* 26, 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.02.003>
- O’Neill, B., Patel, J.C., Rice, M.E., 2017. Characterization of Optically and Electrically Evoked Dopamine Release in Striatal Slices from Digenic Knock-in Mice with DAT-Driven Expression of Channelrhodopsin. *ACS Chem Neurosci* 8, 310–319. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00300>
- Ovsepian, S.V., Dolly, J.O., 2011. Dendritic SNAREs add a new twist to the old neuron theory. *PNAS* 108, 19113–19120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017235108>
- Palij, P., Bull, D.R., Sheehan, M.J., Millar, J., Stamford, J., Kruk, Z.L., Humphrey, P.P., 1990. Presynaptic regulation of dopamine release in corpus striatum monitored in vitro in real time by fast cyclic voltammetry. *Brain Res* 509, 172–174. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90329-a](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90329-a)
- Pang, Z.P., Bacaj, T., Yang, X., Zhou, P., Xu, W., Südhof, T.C., 2011. Doc2 supports spontaneous synaptic transmission by a Ca²⁺-independent mechanism. *Neuron* 70, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.011>
- Parish, C.L., Finkelstein, D.I., Drago, J., Borrelli, E., Horne, M.K., 2001. The role of dopamine receptors in regulating the size of axonal arbors. *J Neurosci* 21, 5147–5157.
- Parish, C.L., Stanic, D., Drago, J., Borrelli, E., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., 2002. Effects of long-term treatment with dopamine receptor agonists and antagonists on terminal arbor size. *European Journal of Neuroscience* 16, 787–794. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02132.x>
- Parmar, M., Torper, O., Drouin-Ouellet, J., 2019. Cell-based therapy for Parkinson’s disease: A journey through decades toward the light side of the Force. *Eur. J. Neurosci.* 49, 463–471. <https://doi.org/10.1111/ejn.14109>
- Paxinos and Franklin’s the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact - 5th Edition [WWW Document], n.d. URL <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates-compact/franklin/978-0-12-816159-3> (accessed 5.6.21).
- Radl, D., Chiacchiarretta, M., Lewis, R.G., Brami-Cherrier, K., Arcuri, L., Borrelli, E., 2018. Differential regulation of striatal motor behavior and related cellular responses by

- dopamine D2L and D2S isoforms. *PNAS* 115, 198–203.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1717194115>
- Rice, M.E., Patel, J.C., 2015. Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0185>
- Richard, M.G., Bennett, J.P., 1994. Regulation by D2 dopamine receptors of in vivo dopamine synthesis in striata of rats and mice with experimental parkinsonism. *Exp Neurol* 129, 57–63. <https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1146>
- Robinson, B.G., Cai, X., Wang, J., Bunzow, J.R., Williams, J.T., Kaeser, P.S., 2019. RIM is essential for stimulated but not spontaneous somatodendritic dopamine release in the midbrain. *eLife* 8, e47972. <https://doi.org/10.7554/eLife.47972>
- Schultz, W., 2007. Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722>
- Stamford, J.A., Kruk, Z.L., Millar, J., 1988. Actions of dopamine antagonists on stimulated striatal and limbic dopamine release: an in vivo voltammetric study. *Br J Pharmacol* 94, 924–932. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11605.x>
- Steinkellner, T., Mus, L., Eisenrauch, B., Constantinescu, A., Leo, D., Konrad, L., Rickhag, M., Sørensen, G., Efimova, E.V., Kong, E., Willeit, M., Sotnikova, T.D., Kudlacek, O., Gether, U., Freissmuth, M., Pollak, D.D., Gainetdinov, R.R., Sitte, H.H., 2014. In Vivo Amphetamine Action is Contingent on α CaMKII. *Neuropsychopharmacol* 39, 2681–2693. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.124>
- Sudhof, T.C., 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., Galli, A., 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog. Neurobiol.* 75, 406–433. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.003>
- Surmeier, D.J., Graves, S.M., Shen, W., 2014. Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 29, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.07.008>
- Tripanichkul, W., Stanic, D., Drago, J., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., 2003. D2 Dopamine receptor blockade results in sprouting of DA axons in the intact animal but prevents

- sprouting following nigral lesions. *Eur J Neurosci* 17, 1033–1045. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02547.x>
- Wang, C., Kang, X., Zhou, L., Chai, Z., Wu, Q., Huang, R., Xu, H., Hu, M., Sun, X., Sun, S., Li, J., Jiao, R., Zuo, P., Zheng, L., Yue, Z., Zhou, Z., 2018. Synaptotagmin-11 is a critical mediator of parkin-linked neurotoxicity and Parkinson's disease-like pathology. *Nat Commun* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02593-y>
- Ward, K.M., Citrome, L., 2018. Antipsychotic-Related Movement Disorders: Drug-Induced Parkinsonism vs. Tardive Dyskinesia—Key Differences in Pathophysiology and Clinical Management. *Neurol Ther* 7, 233–248. <https://doi.org/10.1007/s40120-018-0105-0>
- Wassef, M., Berod, A., Sotelo, C., 1981. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience* 6, 2125–2139. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90003-8)
- Xu, J., Mashimo, T., Südhof, T.C., 2007. Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca²⁺ sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 54, 567–581. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.004>

Chapitre 4 – Discussion

4.1. Caractéristiques de la libération somatodendritique de DA mesurés par voltammétrie cyclique dans des tranches mésencéphaliques de souris

Les découvertes précédentes de l'équipe du Dr Louis-Éric Trudeau ont découlé de l'utilisation d'un modèle *in vitro* pour mesurer la libération STD de DA à partir de cultures primaires de neurones DA de rats. C'est en utilisant ce modèle que l'équipe est parvenue à fournir la preuve que la libération STD de DA survient par un mécanisme d'exocytose SNARE-dépendant et requière les isoformes Syt4 et 7 de la synaptotagmine (Fortin *et al.*, 2006; Mendez *et al.*, 2011). Pour permettre d'étudier à terme les rôles fonctionnels et comportementaux de la libération STD de DA, le premier objectif de mon projet de thèse a consisté à établir un modèle sur tranche de cerveau nous permettant de mesurer la libération STD sur tissu intact de souris sauvages et génétiquement modifiées.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude sur tranche de la libération STD de DA a déjà été réalisée par le passé par d'autres équipes, notamment en combinant la stimulation extracellulaire avec la technique de voltammétrie cyclique afin de détecter les taux de DA en temps réel. Une limitation importante de cette approche est qu'elle repose sur une stimulation extracellulaire qui dépolarise non sélectivement les neurones DA, mais aussi les neurones glutamatergiques et GABAergiques et les terminaisons sérotoninergiques qui sont abondantes dans le mésencéphale ventral. Cela complique en partie l'interprétation des données en voltammétrie, compte tenu du relargage de substances électrochimiquement détectables comme la 5-HT (Nedergaard *et al.*, 1988; S. J. Cragg *et al.*, 1997).

Nous avons donc tenté d'optimiser cette stratégie en évaluant une approche combinant voltammétrie cyclique avec une activation optogénétique (sélective) des neurones DA exprimant la channelrhodopsine. Cette approche a récemment été utilisée pour évaluer la libération axonale de DA (O'Neill *et al.*, 2017), ou typiquement pour stimuler les neurones de la SNc/VTA afin de procéder à des enregistrements dans le striatum ou des évaluations comportementales, mais

personne ne l'avait encore exploitée pour mesurer spécifiquement la libération STD de DA. Nous avons démontré que cette approche optogénétique, en combinaison avec un blocage des autorécepteurs D2 et de la recapture par le DAT, peut se montrer efficace à l'étude de la libération STD de DA.

Le principal problème qui a émergé de cette approche est cependant l'instabilité des réponses avec des stimulations optiques répétées à 5 minutes d'intervalle, au même site d'enregistrement. Cette atténuation progressive qui survient au cours des stimulations contraste avec la stabilité observée en stimulation électrique.

Il est possible que la diminution observée avec une stimulation optique résulte d'une faible capacité de réserve de DA libérable, en raison d'un pool vésiculaire limité dans les somas et dendrites des neurones DA (*Wilson et al., 1977; Groves et Linder, 1983; Bayer et Pickel, 1990; Nirenberg et al., 1996*). La stimulation électrique serait alors plus efficace à recruter les différentes réserves de DA somatodendritique, dans un contexte où les capacités de recapture sont par ailleurs bloquées. Il est également possible que l'atténuation progressive des réponses ne soit pas observée en stimulation électrique, car cette forme de stimulation recrute des mécanismes neuromodulateurs facilitateurs, résultants de l'activation de terminaisons afférentes sur les neurones DA, libérant la 5-HT, la NE, l'acétylcholine, le glutamate, le GABA et/ou des neuropeptides (*Ludwig, 2005; Bergquist and Ludwig, 2008; Rice and Patel, 2015*). En faveur de cette seconde hypothèse, le groupe de Rice qui a caractérisé la libération de DA en utilisant la même approche d'optogénétique dans le striatum a constaté le même phénomène d'atténuation des réponses avec des trains de stimulation optique, et de stabilité des réponses en stimulation électrique (*O'Neill et al., 2017*). Ces auteurs ont conclu que les niveaux d'expression de la ChR2 n'étaient pas en cause, de la même façon que l'atténuation des réponses était visible dans notre étude aussi bien chez les souris Ai32 et celles exprimant ChR2 par infection virale. En revanche, ils ont observé que l'atténuation des réponses avec des stimulations répétées pouvait aussi être constatée en stimulation électrique si les enregistrements étaient faits en présence d'un antagoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR). Ce résultat a démontré l'influence de la neuromodulation cholinergique dans le striatum. Il est donc très certainement probable qu'il en soit de même au compartiment somatodendritique. D'autres expériences seront nécessaires pour tester cette hypothèse, par exemple en procédant aux mêmes

enregistrements par stimulations électriques répétées, en présence de différentes drogues agissant sur les autres systèmes présents dans le mésencéphale ventral (glutamate, GABA, sérotonine...).

L'étude de O'Neill a également montré que l'atténuation des réponses peut être évitée en enregistrant dans de multiples sites du striatum, chacun stimulé une seule fois ou bien encore par l'utilisation de stimulations unitaires. Ces stratégies sont cependant plus difficilement réalisables dans le cas de la libération somatodendritique. D'une part, car nous avons montré que chez la souris l'utilisation de stimulations uniques n'est pas une stratégie efficace pour déclencher la libération STD de DA, même en condition de blocage du DAT et des autorécepteurs D2. D'autre part, la faible superficie de la région du mésencéphale ventrale (en comparaison du striatum) limite les stratégies d'échantillonnage avec des enregistrements dans à de multiples endroits.

Par ailleurs, la libération somatodendritique dépend du calcium, mais comme nous l'avons vu, il existe des résultats contradictoires quant à la sensibilité au calcium de la libération STD comparativement à la libération axonale (*Chen et Rice, 2001 et Ford et al., 2010*). Déterminer la sensibilité calcique de la libération de DA chez la souris *ex vivo* n'est pas anodin, car la dépendance au calcium moins élevée au niveau STD, observée par le groupe de Rice a servi de base au développement du modèle en culture de Mendez, qui a mesuré la libération STD en assumant que la libération terminale était totalement bloquée à 0.5 mM de calcium. Les résultats du groupe de Williams (*Ford et al., 2010*) laissent entendre une certaine similarité des mécanismes de libération de la DA dans le striatum et la région somatodendritique, ce qui entre en contradiction avec les résultats de Mendez et du groupe de Rice. Dans cette étude, nous avons réévalué la sensibilité calcique de la libération STD de DA par rapport à la libération axonale sur des tranches de mésencéphale de souris perfusées avec différentes concentrations extracellulaires de calcium (0, 0.5 et 2.4 mM) et avons conclu à une dépendance au calcium identique entre libération axonale et somatodendritique. Il est possible qu'une conclusion différente ait été faite dans les tranches de cerveau de cobaye, car certains aspects du mécanisme de libération STD de DA diffèrent selon les espèces, par exemple une possible plus grande contribution du senseur calcique Syt7, à faible affinité pour le calcium, pour la libération STD chez le cobaye. Une autre possibilité est qu'une composante axonale soit également présente dans le signal dopaminergique détecté en voltammétrie. Cette possibilité a été évoquée précédemment, en particulier dans le cas de la VTA

(Chen et al., 2011), mais les données anatomiques allant en ce sens sont encore très limitées (Bayer et Pickel, 1990; Deutch et al., 1988).

4.2. Implication des synaptotagmines 4 et 7 dans la libération axonale et somatodendritique de dopamine

4.2.1. Rôle de Syt4 et Syt7 dans la libération de DA

Enfin, dans la continuité des travaux *in vitro* de Mendez en 2011, nous avons cherché à déterminer si Syt4 et Syt7 étaient nécessaires à la libération STD de DA *in vivo*. Nous avons ainsi confirmé que ces deux isoformes sont présentes dans le compartiment somatodendritique des neurones DA, présentant une colocalisation notable avec VMAT2.

Nous avons par la suite mesuré l'amplitude de la libération de DA dans des tranches de souris KO constitutives pour ces isoformes. De façon intéressante, les KO unitaires de Syt4 ou Syt7 n'ont conduit à aucun déficit de la libération phasique de DA au niveau axonal et somatodendritique. Ce résultat suggère la mise en place de mécanismes de compensations homéostatiques durant le neurodéveloppement, bien que notre analyse de RT-qPCR chez ces souris n'ait pas révélé de changements notables d'expression de Syt1, Syt4, Syt5, Syt7 ou Syt11 dans l'un ou l'autre des KO constitutifs. Cependant, une limitation de l'approche est qu'elle s'est faite sur l'ARNm totale de cerveaux de souris Syt4 et Syt7 KO. Bien que ces deux isoformes soient présentes dans tout le SNC, il est possible que des mécanismes de compensation spécifiques au système dopaminergique soient masqués compte tenu de la faible proportion de cette population de neurones. Répéter ces quantifications d'expression génique sur des neurones dopaminergiques isolés permettrait de pallier ce problème.

Des résultats intéressants ont néanmoins émergé de l'étude des doubles KO pour Syt4 et Syt7. La libération STD de DA chez ces souris a été impactée à hauteur de 50%, tandis que la libération axonale est restée intacte ce qui (1) confirme les travaux de Mendez (2011) sur cultures primaires de neurones DA, (2) suggère l'existence de mécanismes distincts entre libération axonale et STD, et (3) indique une possible redondance fonctionnelle de Syt4 et Syt7 dans ce processus. Cette baisse de moitié de la libération STD n'était surprenamment pas constatée chez des souris knock-out pour

Syt4 et hétérozygote pour Syt7, ce qui indique que Syt7 joue un rôle prépondérant dans ce processus, la présence d'un seul de ses allèles suffisant à restaurer pleinement la libération STD.

Par ailleurs, en considérant également que la libération STD évoquée n'est que partiellement altérée chez le double KO Syt4 /7 (tout comme elle l'était dans l'étude de Mendez), nous pouvons donc émettre l'hypothèse de l'existence d'un autre mécanisme de libération. La Syt11 pourrait être un autre senseur calcique impliqué dans ce processus, car, comme vu précédemment, elle possède des analogies avec Syt4, avec une mutation sur son domaine calcique C2B (*von Poser et al., 1997*), est un facteur de risque génétique pour la maladie de Parkinson (*International Parkinson Disease Genomics Consortium et al., 2011*), un substrat de l'ubiquitine ligase Parkin (*Huynh et al., 2003*) et joue un rôle dans le remplissage du stock vésiculaire de DA (*Wang et al., 2018*). Le modèle murin de délétion conditionnelle de Syt11 pourrait ainsi être utilisé afin d'évaluer la libération somatodendritique de DA.

4.2.2. Limitations de l'étude

4.2.2.1. Emploi de modèles de délétions constitutives

Une limitation évidente de notre l'étude était la non-disponibilité de souris KO conditionnelles ou inductibles pour les Syts 4 et 7. Nous avons ainsi été contraints d'utiliser des souris dont la délétion des gènes *syt4* et *syt7* était constitutive. Cela pose problème, étant donné que ces gènes sont fortement exprimés dans le SNC (*Berton et al., 1997; Sugita et al., 2001*) et pourraient avoir des conséquences notables, notamment sur la neurotransmission des autres systèmes neuronaux sur le système dopaminergique, à la fois au compartiment axonal et somatodendritique. Par exemple, il est connu que les systèmes glutamatergiques et GABAergiques, à l'origine de la majorité des connexions sur les neurones DA, contribuent à la régulation de la libération STD dans la SNc et la VTA (*Chen and Rice, 2002*). Parmi ces effets difficilement prévisibles, nous avons par exemple constaté que Syt4 semble avoir un rôle dans le neurodéveloppement de la commissure antérieure et du corps calleux, tous deux présentant des déficits majeurs, clairement visibles sur les tranches de striatum enregistrées. Cette observation est quelque peu surprenante, compte tenu du fait que la souris a été générée par le groupe de Herschman il y a plus de deux décennies (*Ferguson et al., 2000*), mais qu'à notre connaissance aucun autre groupe n'a rapporté ce phénotype. Une variété de morphogènes, facteurs de guidance axonale et autres protéines ont déjà été caractérisés dans le cas du neurodéveloppement de la commissure antérieure (*Serafini et al., 1996; Henkemeyer et al.,*

1996; Fazeli et al., 1997; Giger et al., 2000; Chen et al., 2000; Kullander et al., 2001; Sahay et al., 2003; Uemura and Takeichi, 2006; Islam et al., 2009; Ito et al., 2010; Moldrich et al., 2010; Klingler et al., 2015), et Syt4 pourrait ainsi s'ajouter à cette liste. Cette observation pose ainsi la question du rôle que pourrait avoir cette isoforme, ou même plus spécifiquement de la libération STD de DA, dans le neurodéveloppement des neurones dopaminergiques. Ainsi, le développement et l'utilisation de KO conditionnels et inductibles pour Syt4 et Syt7, constitueraient une amélioration significative à l'étude de leurs rôles dans le système dopaminergique *in vivo*.

4.2.2.2. Rôle de Syt4 et 7 au niveau des astrocytes et concept de gliotransmission

Dans mes études je me suis focalisé essentiellement sur le rôle des Syts dans la transmission dopaminergique et notamment sur les effets locaux après leurs délétions. Selon nos hypothèses, l'impact des délétions de Syt4 et 7 (et Syt1) sur la libération de DA serait en lien direct avec leur fonction de senseur calcique de l'exocytose. Cependant, une attention pourrait aussi être portée également à l'avenir sur leur rôle dans le trafic intracellulaire des organites responsables de la libération de la DA (voir perspective). En lien avec les limitations précédemment énoncées, les KO constitutif de Syt4 et Syt7 peuvent poser problème car il se pourrait que ces délétions n'aie pas uniquement un rôle spécifique et local sur la libération de DA mais plutôt un rôle en amont.

En dehors des autres systèmes neuronaux pouvant directement agir sur la neurotransmission dopaminergique, un facteur présentement très peu considéré, compte tenu de la tradition neurocentrique, serait le rôle que pourrait jouer la glie et en particulier les astrocytes dans la modulation de l'activité des neurones dopaminergiques. On sait depuis longtemps que les astrocytes captent des neurotransmetteurs, mais la suggestion qu'ils libèrent également eux-même certains transmetteurs, un concept portant le nom de gliotransmission, est relativement récente (Hamilton et Attwell, 2010). On sait par exemple que les astrocytes peuvent libérer du glutamate, du GABA, de l'ATP et de la D-sérine (co-agoniste avec la glycine pour l'activation des récepteurs NMDA), de manière dépendante du calcium, ce qui module l'excitabilité neuronale (Parri et al., 2001; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Perea and Araque, 2005; D'Ascenzo et al., 2007), la libération des neurotransmetteurs et la plasticité synaptique (Araque et al., 1998; Coco et al., 2003; Yang et al., 2003; Zhang et al., 2003; Fiacco and McCarthy, 2004; Pascual et al., 2005; Serrano et al., 2006; Jourdain et al., 2007; Andersson et al., 2007; Perea and Araque, 2007; Pangršič et al., 2007; Corkrum et al., 2020). Au sein du système dopaminergique, la

communication apparaît comme étant bidirectionnelle, avec des astrocytes répondants dans un premier temps à différents neurotransmetteurs (glutamate, DA et opioïdes) par une élévation des niveaux intracellulaires de calcium via l'activation de différents récepteurs couplés aux protéines G (y compris DARs) et libérant dans un second temps des gliotransmetteurs pouvant à leur tour avoir une influence sur l'activité des neurones DA (*voir revue de Corkrum et Araque, 2021*).

Des études en microscopie électronique ont montré que les astrocytes ne présentent pas de zones de libération structurellement organisées comme celles retrouvées au niveau des synapses neuronales (*Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007*). Néanmoins, les astrocytes cultivés ou fraîchement isolés expriment VAMP2, VAMP3 (également connu sous le nom de cellubrevine) et la syntaxine (*Parpura et al., 1995; Maienschein et al., 1999; Cahoy et al., 2008*), et soit SNAP25 (*Maienschein et al., 1999*), soit son analogue SNAP23 (*Hepp et al., 1999; Cahoy et al., 2008*). Par ailleurs certains astrocytes ont montré une faible expression des senseurs calciques Syt1, Syt4 et Syt7, et une forte expression de la Syt11 (*Cahoy et al., 2008*). Une absence d'expression de Syt1 et Syt2 a en revanche été démontrée par RT-PCR/immunobuvardage dans des astrocytes en culture contrairement à Syt4, Syt5 et possiblement Syt11 (*Zhang et al., 2004*). Cette étude a par ailleurs détecté la présence de structures immunoréactives pour Syt4 dans les prolongements astrocytaires et une baisse de son expression obtenue avec des siRNA a également conduit à une inhibition de la libération de glutamate dépendante du calcium, démontrant ainsi un rôle fonctionnel de cette isoforme au niveau des astrocytes. Ces données invitent également à un examen plus approfondi du rôle que pourrait jouer Syt7 et Syt11 dans la libération de transmetteurs astrocytaires et de l'impact que cela pourrait avoir sur l'activité des neurones DA.

Il est intéressant de noter que les seules isoformes de la famille des Syts ayant été détectées au niveau des cellules gliales, soit Syt4 et Syt7 (et possiblement Syt5 et Syt11), soient également les mêmes pour lesquelles nous suspectons un rôle spécifique dans la libération somatodendritique de DA. On comprend dès lors que le recours à des KO constitutifs de Syt4 et Syt7 pourrait constituer une autre limitation à notre étude compte tenu de la communication bidirectionnelle que pourrait avoir le système DA et la glie. Un effort devra être fait afin d'être plus spécifique et également exploré plus spécifiquement ces questions de gliotransmission dans un autre projet.

4.2.2.3. Limitations techniques et méthodologiques

Une autre limitation concerne le mode de stimulation employé. La caractérisation de la libération STD de DA des souris KO s'est faite au moyen de trains de stimulations électriques (30 stimulations à 10 Hz), une méthode qui s'est révélée efficace et stable à déclencher la libération STD, mais qui manque de spécificité, ce qui complique son étude. Par exemple, il a été montré que des trains de stimulations (10 Hz) dans la SNc provoquent une libération de glutamate pouvant activer les récepteurs mGluR1 des neurones DA, ce qui facilite la libération STD (*Patel et al., 2009*). Cette influence neuromodulatrice peut également s'exercer avec les autres systèmes de neurotransmission présents dans le mésencéphale ventral. L'innervation sérotoninergique en provenance du raphé dorsal peut souvent s'avérer problématique à l'étude de la libération STD de DA, la 5-HT étant elle-même oxydoréductible et présentant une plus grande adsorption sur les fibres de carbone (*S. J. Cragg et al., 1997; Threlfell and Cragg, 2007*). Il faut néanmoins souligner que cette "contamination" est dépendante de la région enregistrée (SNc ou VTA) et de l'espèce utilisée, due à des différences anatomiques quant à l'innervation sérotoninergique. Notamment, la VTA des souris, rats et des cobayes présente peu, voir pas, d'innervation 5-HT contrairement à la SNc, et est souvent considérée comme une région permettant d'obtenir un signal dopaminergique « pure » en voltammétrie cyclique (*Hallman and Jonsson, 1984; S. J. Cragg et al., 1997; Courtney et al., 2012*). Il est donc peu probable que ce problème de spécificité entre en compte dans notre étude où les enregistrements étaient menés dans la VTA. A noter que ce fait est un avantage dans notre étude mais pose plus globalement le problème de la généralisation des résultats obtenus aux espèces plus hautes dans l'échelle phylogénétique.

La méthode d'échantillonnage employée pourrait également venir jouer un rôle dans le cas de la libération axonale de DA dans le striatum. La caractérisation de celle-ci chez les souris KO s'est faite au moyen d'un échantillonnage dans de multiples sites du striatum dorsal et ventral, avec des stimulations unitaires (1 pulse de 1 ms à 400 μ A). Cette méthode, permissive du fait des hauts niveaux de DA libérable dans le striatum, couramment employée en voltammétrie, permet de minimiser la variabilité due à l'hétérogénéité des sites de libération dans le striatum et l'influence des autres systèmes de transmission. Il est apparu quelque peu étonnant de ne constater aucun effet des KO de Syt4 et Syt7 et des double KO sur la libération terminale de DA. Quoique moins surprenant dans le cas de Syt4, qui présente une localisation strictement somatodendritique, nous montrons ici que Syt7 se retrouve en revanche dans l'arborisation axonale et de nombreuses

varicosités DA, suggérant un rôle à ce niveau. Récemment, une synergie a été démontrée entre Syt1 et Syt7 dans des cellules chromaffines, Syt7 favorisant l'amorçage des vésicules à la membrane, tout en ralentissant la fusion en entrant en compétition avec Syt1 (*Tawfik et al., 2021*). Ces deux isoformes ont par ailleurs démontré leur rôle respectif dans la libération synchrone et asynchrone de neurotransmetteurs (*Bacaj et al., 2013*). Étant chacune présente au niveau des varicosités dopaminergiques (*Mendez et al., 2011*), il est donc probable que leurs actions s'exercent également dans ce système. Le rôle de Syt7 dans le striatum pourrait ainsi être possiblement mieux caractérisé en changeant de paradigme de stimulation, avec l'utilisation de stimulations pairées au même endroit, ou de trains permettant de mieux rendre compte des mécanismes de libération asynchrone de DA.

Ce rôle de Syt7 a été très récemment démontré par le groupe de Jackman au moyen des nouveaux senseurs dopaminergiques dLight (1.3b) pour mesurer la libération de DA (*Kissiwaa et al., 2021*). Le groupe a notamment découvert que Syt7 contrôle une composante cachée de facilitation de la relâche de DA, qui peut être mise en évidence en diminuant la probabilité de libération ou avec des stimulations à basse fréquence des terminaisons axonales. Ils ont par ailleurs constaté une dépression synaptique importante dans des neurones Syt7 KO, lors de stimulations qui imitent le patron de décharge *in vivo* des neurones de la SNc. Ces fonctions de Syt7 dans la facilitation synaptique se sont par ailleurs également retrouvées au niveau somatodendritique (mesure de la libération de DA par détection des D2-IPSCs). Ainsi, dans cette étude, à la suite d'un potentiel d'action, l'entrée de calcium qui en résulte conduit à une activation de Syt7 entraînant une facilitation à court terme de la libération de DA qui se trouve potentialisée pendant quelques centaines de millisecondes.

4.3. Rôle de la synaptotagmine 1 dans la libération phasique de dopamine

Après avoir confirmé un rôle de Syt4 et Syt7 dans la libération somatodendritique de DA, la suite de mon projet de thèse s'est intéressée à Syt1, l'isoforme principale de la famille des synaptotagmines. Nous avons ainsi généré une souris KO conditionnelle de Syt1 dans le système dopaminergique (Syt1 cKO^{DA}), afin de caractériser le rôle de Syt1, à la fois au compartiment axonal (striatum) et somatodendritique (VTA et SNc), ainsi que les conséquences du blocage de la libération phasique de DA qui en résulte.

4.3.1. Rôle de Syt1 dans la libération phasique axonale de dopamine

Le premier objectif de l'étude était de mieux caractériser la machinerie moléculaire impliquée dans l'exocytose de la DA au niveau des terminaisons axonales. Comme nous l'avons vu en introduction, celle-ci est encore à l'heure actuelle très limitée et la plupart des acteurs présynaptiques sont supposés exister sur la base des connaissances que nous avons des autres systèmes de neurotransmission dans le SNC. Lors de l'initiation de ce projet en 2019 nous savions seulement à partir des travaux menés sur cultures primaires de neurones DA, que Syt1 était enrichie au niveau des terminaisons synaptiques, colocalisant avec les varicosités TH à hauteur de 70-90% (*Ducrot et al., 2021*) et que l'utilisation de SiRNA contre Syt1 *in vitro* a permis de démontrer son implication dans la libération terminale (*Mendez et al., 2011*). Il était alors apparu pertinent d'aller confirmer le rôle de Syt1 *in vivo*, mais également les conséquences de son KO conditionnel dans le système DA. Durant la réalisation de ce projet, le groupe de Kaeser a également généré la souris Syt1 cKO^{DA} de son côté et a démontré son rôle comme senseur calcique principal de la relâche rapide de DA au niveau des terminaisons (*Banerjee et al., 2020*). Cependant, notre projet, mené en parallèle a grandement étendu leurs conclusions, dont nous discuterons en détail dans les prochaines sections.

Dans notre étude, l'utilisation de la technique de voltammétrie cyclique sur tranche de souris Syt1 cKO^{DA}, a permis tout d'abord de confirmer le rôle majeur de Syt1 dans la libération phasique de DA dans le striatum. Celle-ci s'est retrouvée grandement impactée aussi bien au niveau du striatum dorsal ($\approx 95\%$) que ventral ($\approx 88\%$). La libération subsistante nous a permis de démontrer

l'existence d'un autre mécanisme pouvant contrôler la libération de DA dans les terminaisons axonales. En comparaison, le groupe de Kaeser a rapporté avoir échoué à détecter la libération de DA évoquée par stimulation optique ou électrique sur des tranches de souris Syt1 cKO^{DA} au moyen de la technique d'ampérométrie (Banerjee et al., 2020). Seule de fortes dépolarisations induites au KCl ou l'utilisation de trains de stimulation en condition de blocage du DAT (par la nomifensine) leur ont permis de détecter de la DA et de conclure que sa libération asynchrone était non altérée par la délétion de Syt1. Dans chacune des régions enregistrées de notre étude, nous avons pu constater l'existence d'une libération phasique résiduelle (abolie par traitement avec l'agoniste des autorécepteurs D2 quinpirole) et détectable aussi bien en trains de stimulation qu'en stimulation unitaire. Quoique spéculatif, il est possible que la plus grande résolution temporelle de la technique d'ampérométrie (de l'ordre de la ms) en comparaison avec la voltammétrie (100 ms) puisse masquer une forme de libération asynchrone subsistante, par nature plus lente. Compte tenu des arguments présentés précédemment, Syt7 apparaît comme le candidat le plus plausible à la régulation de cette forme de libération, en adéquation avec nos résultats de RT-qPCR montrant une augmentation de l'expression de cette isoforme dans le mésencéphale ventral des souris Syt1 cKO^{DA}. Il serait pertinent d'évaluer son rôle dans la relâche phasique asynchrone de DA, dans un modèle où Syt1 aurait été préalablement supprimée, comme cela a été réalisé précédemment par le groupe de Südhof dans les neurones de l'hippocampe (Bacaj et al., 2013).

4.3.2. Rôle de Syt1 dans la libération phasique somatodendritique de dopamine

Le second objectif de notre projet était de mieux caractériser la libération somatodendritique de DA en continuation de nos travaux sur Syt4 et Syt7. Sur la base d'études précédentes nous savions qu'une machinerie moléculaire était au moins en partie commune à la libération terminale, avec la participation notamment de SNAP-25 et de la synaptobrevine-2 (Bergquist et al., 2002; Fortin et al., 2006; Ovsepian and Dolly, 2011; Hikima et al., 2021). D'un autre côté, Syt1 n'a pas montré de localisation au soma et dendrites des neurones DA et ne semblait pas non plus impliquée dans la relâche STD de DA *in vitro* (Mendez et al., 2011). Cependant, un article alors récent du groupe de Kaeser a démontré l'implication de la protéine de zone active RIM dans la libération STD phasique (mais pas spontanée) de DA. Ces auteurs ont en effet constaté que la libération STD de DA mesurée par les courants D2-IPSCs sur des tranches de souris KO pour la protéine RIM était abolie (B. G. Robinson et al., 2019). Dans leurs réponses aux évaluateurs, ils ont précisé avoir

échoué à démontrer la localisation somatodendritique de la protéine RIM, compte tenu de la densité élevée des contacts synaptiques en provenance de divers neurones dans la région du mésencéphale ventral, un défi qui se pose évidemment aussi dans le cas de Syt1. Néanmoins, Syt1 étant comme RIM une protéine de zone active exprimée par les neurones DA, nous nous sommes ainsi questionnés sur son rôle dans la libération STD.

Une première possibilité est que la libération de DA dans le mésencéphale ventral puisse se produire à différents endroits : au niveau des somas et des dendrites des neurones DA, mais possiblement aussi au niveau de terminaisons axonales. Un faisceau d'indices apportés par notre première étude orientait en effet vers une hypothétique contribution axonale : (1) la double délétion de Syt4 et Syt7 dans notre première étude a causé la diminution de seulement 50% de la libération STD, ce qui a indiqué l'implication d'un ou plusieurs autres mécanismes de libération. (2) Notre étude a par ailleurs démontré une sensibilité au calcium identique entre libérations STD et axonale. (3) Le double KO de Syt4 et Syt7 a souligné la contribution prépondérante de Syt7 dans ce processus, or cette isoforme est présente à la fois au compartiment STD, mais également axonal dans les neurones DA. L'expression de Syt7 est d'ailleurs régulée à la hausse dans le mésencéphale ventral des souris Syt1 cKO^{DA}. Ces observations supportaient ainsi un peu plus l'hypothèse d'une composante axonale dans la libération STD qui avait été auparavant spéculé par le groupe de Rice (*Rice and Patel, 2015*). Une seconde hypothèse était que Syt1 pouvait être fonctionnellement actif à contrôler la libération STD de DA *in vivo*, malgré une localisation subcellulaire incertaine et la faible densité de vésicules synaptiques au soma et dendrites des neurones DA.

En réalisant des enregistrements en voltammétrie dans des tranches de mésencéphales de souris Syt1 CKO^{DA}, nous avons ainsi démontré le rôle de Syt1 dans la libération phasique de DA au compartiment STD, celle-ci se trouvant diminuée aussi bien au niveau de la VTA (~68%) que de la SNc (~65%). Afin de déterminer si le rôle de Syt1 comme senseur calcique de la libération STD de DA était fonctionnel ou témoignait d'une origine axonale de la DA, nous avons développé une nouvelle approche reposant sur la stimulation optogénétique du compartiment STD des neurones DA, en combinaison avec l'utilisation de TTX pour bloquer toute propagation des potentiels d'action et libération axonale. Nous avons constaté que la libération STD de DA était toujours détectable dans de telles conditions et que celle-ci n'était pas réduite par la délétion du gène *syt1*. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la libération phasique de DA détectée dans la VTA (et

potentiellement dans la SNc), implique un mélange de libération axonale et somatodendritique et que le KO conditionnel de Syt1 n'a un impact que sur la première de ces deux formes de libération. Ce résultat invite ainsi à reconsidérer la présence de collatérales en provenance d'axones des neurones dopaminergiques dans le mésencéphale ventral, afin de compléter les quelques études réalisées en microscopie électronique par le passé (*Deutch et al., 1988; Bayer and Pickel, 1990*).

Un résultat quelque peu surprenant a cependant émergé de l'analyse du KO aigu de Syt1. L'utilisation d'un virus AAV-TH-Cre sur des souris Syt1 floxées adultes a montré une abolition complète de la libération STD de DA évoquée électriquement dans la VTA. Trois hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat. La première serait due à une limitation technique de l'approche employée dans l'étude. En effet, la spécificité du virus TH-cre s'est révélée sous-optimale, avec une grande proportion de neurones TH-négatifs retrouvés infectés au niveau des sites d'injection. La non-spécificité des injections, bien que non quantifiée, était clairement visible sur les immunomarquages. Syt1 étant le principal senseur calcique impliqué dans la relâche rapide des neurotransmetteurs dans le cerveau, sa délétion pourrait ainsi venir impacter les systèmes de neurotransmissions (glutamatergiques, GABAergiques, sérotoninergiques...) pouvant réguler la libération somatodendritique de DA, comme on l'a vu précédemment. Une deuxième hypothèse serait liée à un effet léthal des infections virales et de la délétion aiguë subséquente de Syt1 au niveau des neurones DA chez la souris adulte. Cette hypothèse apparaît cependant peu probable, car le comptage stéréologique des neurones DA chez les souris Syt1 cKO^{DA} n'a pas montré d'effet de la délétion de Syt1 sur la survie des neurones dopaminergiques. Cela dit, dans ce modèle des mécanismes de compensations pourraient survenir rapidement durant le développement et pour cette raison il apparaîtrait alors pertinent d'effectuer un comptage cellulaire des souris injectées avec le virus AAV-TH-Cre, d'une part pour évaluer la survie, et d'autre part pour évaluer la proportion de neurones infectés dopaminergiques et non dopaminergiques. Enfin, ce résultat pourrait en fait suggérer une contribution prépondérante de la libération phasique axonale en comparaison de la libération somatodendritique. Cette dernière pourrait, dans un contexte où le KO de Syt1 survient durant le développement, s'activer pour compenser la perte de la libération terminale et aider à maintenir des niveaux ambiants de DA dans le mésencéphale ventral. Les mesures de libération restantes dans nos études semblent par ailleurs indiquer que même dans un contexte de KO survenant durant le neurodéveloppement, la libération axonale jouerait un rôle important. Ainsi, les résultats chez le double KO Syt4/7 pourraient indiquer que

celles-ci contribueraient pour la moitié de la relâche de DA dans le compartiment STD et au deux-tiers dans le cas de notre étude sur le Syt1 cKO^{DA}.

Il faut également noter qu'une abolition complète de la libération somatodendritique a également été observée par le groupe de Kaeser chez les souris RIM cKO^{DA}. Cela dit, chez ces souris la méthodologie employée pourrait être en cause, les mesures de la libération phasique de DA se faisant indirectement par l'étude des courants D2-IPSCs. Il est envisageable que l'activation de ces récepteurs se fasse sur des sites proches d'une source de DA et ainsi ne dépendrait pas d'une diffusion extensive de la DA (*Hikima et al., 2021*). La mesure des courants D2-IPSCs pourrait ainsi théoriquement rendre mieux compte d'un mode de communication synaptique, auquel la libération phasique axonale viendrait jouer un rôle prépondérant, ce qui expliquerait l'abolition des réponses observées chez les RIM KO. L'utilisation de la voltammétrie en revanche permet de mesurer la DA qui diffuse à une certaine distance de son point de libération, permettant ainsi de mieux appréhender le concept de transmission volumique. Par ailleurs, c'est particulièrement le cas dans nos études où la libération phasique de DA est mesurée en condition de blocage de la recapture (nomifensine) et des autorécepteurs D2 (sulpiride). Réaliser des enregistrements de libération somatodendritique chez les souris RIM cKO^{DA} par voltammétrie cyclique et les paradigmes utilisés dans nos études pourrait s'avérer ainsi pertinent.

Il serait également pertinent d'établir une meilleure distinction entre VTA et SNc. Dans nos études, les enregistrements se sont faits essentiellement au niveau de la VTA, où les niveaux de DA sont plus importants. Cela dit, nos résultats de voltammétrie chez les souris Syt1 cKO^{DA} ont montré une baisse de 65% de la libération de DA évoquée électriquement au niveau de la SNc, démontrant la participation de Syt1 à ce processus et laissant aussi envisager l'existence d'une composante de libération axonale. Ce résultat apparaîtrait un peu surprenant compte tenu du fait que, contrairement à la VTA, la présence de sites de libération axonale n'a pas été constatée anatomiquement au niveau de cette structure (*Juraska et al., 1977; Wassef et al., 1981; Matsuda et al., 2009*), sauf dans quelques neurones de la SNc (<10%) marqués individuellement dans l'étude de Prensa et Parent (2001). Notre KO de Syt1 étant conditionnel, il apparaît peu probable que la baisse de libération STD constatée soit attribuable à l'innervation sérotoninergique importante de la SNc et pouvant contaminer les voltammogrammes. Il est néanmoins possible qu'il y ait dans la SNc l'existence de terminaisons axonales en provenance de la VTA, comme on peut l'observer

dans certains modèles de néoinnervation après lésion partielle à la 6-OHDA (*Fernandes Xavier et al., 1994*). L'utilisation de l'optogénétique et une meilleure caractérisation neuroanatomique des Syt1 cKO^{DA} permettraient de répondre à ces questions.

4.3.3. Rôle de la libération phasique de dopamine dans la régulation des comportements locomoteurs

Nous nous sommes également intéressés aux conséquences de la délétion de Syt1 et de la déficience de la libération phasique de DA chez les souris Syt1 cKO^{DA}. Malgré cette dernière, les souris étaient capables de produire une progéniture viable et fertile, avec un poids corporel normal et aucune anomalie physique ou comportementale notable, un constat qui s'est par la suite étendu au comportement locomoteur de base, évalué par différents tests. Ainsi, une autre contribution importante de notre étude a été de démontrer la résilience importante des fonctions motrices dépendantes de la DA dans un contexte de quasi-abolition de la libération phasique de DA. Un résultat qui est apparu quelque peu surprenant compte tenu du rôle de la libération axonale et somatodendritique dans le contrôle de ces fonctions (*Bergquist et al., 2003; Joshua et al., 2009*), bien qu'il convient de noter que certains comportements locomoteurs puissent aussi être indépendants de la DA (*Kalivas et al., 1983; Cornish et al., 2001*). Dans le contexte pathologique de la maladie de Parkinson, c'est la perte massive de l'innervation des neurones DA de la SNc et la déplétion des niveaux de DA dans le striatum qui est responsable des symptômes moteurs de la maladie (*Halliday et al., 1990*).

Les performances motrices non altérées, voir augmentées (rotarod) des souris Syt1 cKO^{DA} nous ont poussé à émettre l'hypothèse que la libération phasique de DA dans le striatum et le compartiment somatodendritique n'est pas nécessaire pour le contrôle locomoteur, ou bien alors un rôle dispensable dès lors qu'un certain tonus basal des niveaux extracellulaires de DA subsiste dans ces régions pour y activer ses récepteurs. Nous avons ainsi quantifié les niveaux de DA et de ses métabolites par microdialyse intracérébrale couplée à l'HPLC et constaté que ni les niveaux tissulaires, ni ceux extracellulaires de DA n'étaient altérés chez les KO et donc, que ces souris étaient capables de conserver une forme de libération spontanée et/ou phasique subsistante et suffisante. Ce résultat est en adéquation avec ceux publiés par le groupe de Kaeser qui a procédé à la même approche de microdialyse (*Banerjee et al., 2020*).

Ces données remettent ainsi en cause les croyances actuelles sur les rôles de la libération phasique de DA dans la médiation du mouvement et suggèrent que seul un niveau modeste de DA extracellulaire est suffisant. Deux autres modèles génétiques pourraient également venir appuyer cette hypothèse :

Premièrement, un modèle de souris transgénique fut développé par Golden et ses collaborateurs de façon à faire exprimer sélectivement la toxine diphtérique dans les neurones dopaminergiques, afin de les détruire au cours du neurodéveloppement (*Golden et al., 2013*). L'objectif de l'étude était ainsi de déterminer la nécessité de ces neurones pour le maintien d'un comportement moteur normal chez les souris adultes et âgées. L'efficacité de la stratégie était telle que 90% des neurones DA de la SNc et plus de 95% des niveaux de DA dans le striatum étaient ainsi perdus, mais surprenamment ce déficit majeur n'était pas accompagné de défaut moteur. Les auteurs de l'étude ont ainsi postulé qu'en réalité moins de 5% de la DA libérée dans le striatum était nécessaire au maintien des fonctions motrices chez ces souris. Un deuxième modèle de souris transgénique s'est quant à lui intéressé aux conséquences fonctionnelles de l'altération de la libération phasique de DA chez des souris KO pour les récepteurs NMDA (*Zweifel et al., 2009*). Le déclenchement en rafales (*burst*) par les neurones DA est en effet contrôlé, en partie, par des courants postsynaptiques excitateurs (EPSCs) lents et de grandes amplitudes provenant des récepteurs NMDA qui permettent la sommation temporelle des connexions synaptiques sur les neurones DA. En générant un KO conditionnel pour ces récepteurs dans le système DA, les auteurs de l'étude ont ainsi montré par voltammétrie cyclique que la libération phasique de DA était altérée dans le striatum. Néanmoins, malgré ce défaut, beaucoup de comportements dopamino-dépendant n'étaient pas impactés, incluant une fois encore la locomotion.

Au total, ces études rejoignent ainsi nos observations de voltammétrie montrant environ 95% de perte de la libération phasique de DA, mais sans altérations des comportements moteurs. Elles posent la question de la fonction réelle de la neurotransmission rapide et synchrone contrôlée par Syt1. Dans un contexte pathologique, ces résultats pourraient apporter un éclairage dans le cas de la maladie de Parkinson. On peut émettre l'hypothèse qu'au fur et à mesure que la perte des terminaisons DA progresse, tant qu'un tonus suffisant de DA extracellulaire basal est maintenu, de nombreuses fonctions motrices de base seront préservées, et ce, même si la libération phasique de DA est fortement altérée. Cela peut également aider à expliquer pourquoi les stratégies telles que

le traitement à la L-DOPA ou l'implantation de cellules sécrétrices de DA, visant à augmenter le tonus basal de la DA sans restaurer la connectivité normale de ces neurones, peuvent aider à réduire les symptômes moteurs dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson (*Parmar et al., 2019*). Ces résultats amènent naturellement à questionner les rôles que pourrait avoir la libération phasique de DA dans la régulation de comportements non moteurs, tels que l'apprentissage, la motivation, la mémoire, ou dans le système de la récompense. Nous en discuterons plus en détail dans le chapitre 5 concernant les perspectives à donner à ce projet.

4.3.4. Adaptations neurodéveloppementales chez les souris Syt1 cKO^{DA}

Une autre hypothèse pouvant expliquer la résilience remarquable des souris Syt1 cKO^{DA} vis-à-vis des comportements locomoteurs est la possibilité que durant le développement de ces souris, des adaptations importantes au niveau pré et/ou postsynaptiques ont eu lieu pour compenser la baisse de libération phasique et ainsi conserver des fonctions normales. Nous avons ainsi mené une caractérisation neuroanatomique, comportementale et biomoléculaire de ces souris, avec une emphase sur les marqueurs dopaminergiques TH, VMAT2, DAT et les récepteurs dopaminergiques D1 et D2.

4.3.4.1. Effet du KO de Syt1 sur le développement et la survie des neurones DA

Une question évidente qui a émergé du constat de la diminution dramatique de la libération phasique de DA chez la souris Syt1 cKO^{DA} était de savoir si celle-ci trouve son origine dans la perte de fonction de Syt1, à savoir la fusion des vésicules synaptiques à la membrane et l'exocytose, ou bien si la délétion de Syt1 pouvait avoir un effet délétère au développement et à la survie des neurones dopaminergiques. Le groupe de Kaeser avait déjà exploré la question en réalisant des études en microscopie à super-résolution dans le striatum de souris Syt1 KO et n'avait pas constaté de différences majeures dans la longueur et la densité des processus TH-positifs ou dans la proportion des sites de libération, suggérant un développement axonal normal (*Banerjee et al., 2020*). Nous avons étendu ces observations en réalisant une étude neuroanatomique sur tranche de striatum et également dans des cultures primaires de neurones dopaminergiques. Nos résultats montrent sans équivoque que la délétion de Syt1 et les fortes déficiences de libération de DA sont sans effet sur la survie des neurones DA, aussi bien *in vitro* (comptages des neurones à 14 jours *in vitro*) que *in vivo* (comptage stéréologique). Le développement et la connectivité de base des

neurones en culture (longueurs des prolongement axonaux et dendritiques) sont apparus également normaux dans nos cultures primaires à P14. En revanche, dans notre étude en microscopie confocale sur tranche de striatum, nous avons constaté chez les souris cKO une augmentation significative de la surface et de l'intensité des immunomarquages TH et VMAT2, suggérant des adaptations. En particulier, la plus grande surface couverte par ces signaux, aussi bien dans le striatum dorsal que ventral, est une indication d'une plus grande arborisation axonale. Ce résultat divergerait ainsi avec l'étude de Kaeser en super-résolution. Cette différence pourrait possiblement s'expliquer par un échantillonnage insuffisant à révéler les augmentations globales que nous avons observées. Dans notre étude nous avons procédé à des acquisitions et mesures dans de multiples sites du striatum antérieur à postérieur, s'étalant de bregma +0.98 mm à -1.06 mm. Il faut noter que l'augmentation de la surface du signal TH et VMAT2 était observable dans chaque région, à l'exception de bregma +0.5 mm pour TH et de bregma +0.5 à -0.46 mm pour VMAT2. Le groupe de Kaeser en revanche a simplement précisé avoir fait leurs acquisitions dans le striatum dorso-latéral, sans plus de précision. Une plus grande arborisation axonale *in vivo* serait également compatible avec le fait que la libération de DA, à travers l'activation des autorécepteurs D2, est connue pour être un régulateur clé de la croissance axonale des neurones dopaminergiques (*Parish et al., 2002; Tripanichkul et al., 2003; Fasano et al., 2008, 2010*). Notre groupe a ainsi récemment montré que le KO conditionnel des récepteurs présynaptiques D2 conduisait à une plus grande arborisation axonale des neurones dopaminergiques *in vivo* (*Giguère et al., 2019*). Ainsi, dans le contexte d'une diminution importante de la libération de DA chez les souris Syt1 cKO^{DA}, on pourrait s'attendre à ce que les récepteurs D2 soient chroniquement sous-stimulés, levant ainsi un frein à la croissance axonale et donc à une densité de terminaisons TH augmentée dans les striatum. Cette propriété d'autorégulation de la croissance axonale des neurones DA n'expliquerait pas en revanche l'absence d'effet de Syt1 sur le développement en culture. Il est également possible que ces propriétés dépendent également de l'intégration des neurones DA à la circuiterie des ganglions de la base. Ainsi, il apparaît nécessaire de démontrer plus directement l'expansion de l'arborisation axonale des souris Syt1 KO, en procédant par exemple à un marquage unitaire de neurones DA de la SNc et VTA suivi d'une reconstruction de leurs arborisations (*Matsuda et al., 2009*).

4.3.4.2. Effet du KO de Syt1 sur la synthèse et le stockage de la DA

Notre étude pose également la question de l'impact d'une libération de DA altérée sur le métabolisme de la DA. Comme vu précédemment, une augmentation de la surface et de l'intensité des signaux TH et VMAT2 dans le striatum pourrait être indicatif d'adaptations du système dopaminergique de façon à augmenter la synthèse et le stockage de la DA, afin de favoriser une relâche par les mécanismes subsistants (libération tonique et phasique non dépendante de Syt1). D'un point de vue mécanistique, cette adaptation pourrait une fois encore passer par l'autorécepteur D2, dont l'activation est connue pour influencer le métabolisme de la DA (Ford, 2014). En effet, l'activation des récepteurs D2 présynaptiques conduit à une inhibition de l'adénylate cyclase et ainsi à une diminution de la phosphorylation de TH par la PKA réduisant son activité et à terme son expression (O'Hara et al., 1996; Lindgren et al., 2001; Anzalone et al., 2012). La diminution de synthèse de DA qui en résulte conduit à une réduction du remplissage vésiculaire (Pothos et al., 1998) et altère également l'expression et la distribution du transporteur vésiculaire VMAT2 (Truong et al., 2004). Ainsi, si l'on se place encore dans le contexte d'une hypothétique sous stimulation chronique des autorécepteurs D2, nous pouvons nous attendre à une augmentation de la synthèse et du stockage de la DA chez les Syt1 KO. Cette hypothèse serait confortée par notre caractérisation en IHC avec les marqueurs TH et VMAT2, mais également, dans une certaine mesure, par nos résultats en qRT-PCR et immunobuvardage. En revanche, elle ne l'est pas dans nos quantifications des niveaux tissulaires de DA par HPLC, qui n'ont pas montré de différence, ainsi que par le ratio DOPAC/DA inchangé chez les KO, suggérant un turnover de la DA comparable aux souris témoins. Il est donc possible que malgré une augmentation de l'expression de TH et de VMAT2 chez les KO, un seuil dans la quantité maximale de DA (vésiculaire, cytoplasmique et extracellulaire) ne puisse pas être dépassé. Nos résultats d'autoradiographie des récepteurs D2 indiquent également que la sous-stimulation chronique de ces récepteurs pourrait être compensée par une augmentation de leur densité dans certaines régions du striatum, en particulier dans la région ventro-latérale.

4.3.4.3. Effet du KO de Syt1 sur la recapture de la dopamine

L'impact du KO de Syt1 pourrait également venir influencer sur les capacités de recapture de la DA. Les expériences menées en chambre d'actimétrie (*open field*) ont révélé des différences émergentes avec l'utilisation de drogues agissant sur le DAT. La cocaïne et l'amphétamine sont

toutes deux connues pour augmenter sensiblement la locomotion des souris aux doses sélectionnées dans l'étude (*Itzhak and Martin, 1999; Steinkellner et al., 2014*). De façon intéressante, les souris Syt1 cKO sous traitement à la cocaïne ont augmenté leur locomotion de façon comparable aux souris témoins, mais celles ayant reçu une injection d'amphétamine ont vu leur locomotion augmentée de manière significative. Ce résultat suggère que (1) le stock de DA mobilisable n'est pas altéré chez les souris KO, comme démontré dans nos quantifications des niveaux tissulaires de DA, (2) que des adaptations pré et/ou postsynaptiques surviennent après délétion de Syt1.

Il est vraisemblable que les différences de réponses observées entre les traitements à la cocaïne et l'amphétamine trouvent leur origine dans leurs mécanismes d'action. La cocaïne est connue pour augmenter la locomotion des animaux par une élévation des niveaux extracellulaires de DA trouvant son origine dans le blocage du transporteur de la DA. Cette élévation est donc toujours dépendante de l'activité électrique des neurones et de l'exocytose de la DA. Ainsi, dans le contexte de la quasi-abolition de la libération phasique de DA chez les Syt1 cKO, il est vraisemblable que l'élévation des niveaux extracellulaires de DA soit due à une combinaison de libération phasique subsistante (observée dans nos données de voltammétrie) et de libération tonique spontanée, dont les mécanismes ne sont pas encore connus, mais ne dépendraient pas de Syt1. L'absence de différence d'effet en comparaison avec les souris témoins indique que ces formes de libération subsistantes sont soit suffisantes à réguler les fonctions locomotrices chez la souris et/ou que le système régulateur de la locomotion s'est adapté chez les Syt1 cKO de façon à répondre à de moins grandes quantités de DA libérées. Cette dernière hypothèse est probable si l'on tient compte des résultats avec l'amphétamine, qui augmente également la locomotion par une élévation des niveaux extracellulaires de DA, mais d'une façon plus complexe et qui n'est pas dépendante de l'activité électrique des neurones DA. Son action passe notamment par le transporteur vésiculaire de la DA (VMAT2), conduisant à une déplétion des stocks de DA et une inversion du DAT (*Sulzer et al., 2005*). Ainsi, l'augmentation plus importante de la locomotion des souris Syt1 KO en comparaison des souris témoins pourrait indiquer une plus grande action au niveau du VMAT2, celui-ci trouvant d'ailleurs son expression augmentée chez les souris KO, ainsi que des adaptations au niveau postsynaptique (voir section suivante).

Un effet important du blocage du DAT chez les souris KO a également été constaté en voltammétrie, avec un effet relatif de la nomifensine sur la libération évoquée de DA

significativement plus élevé que chez les témoins, démontrant une activité du DAT préservée. L'augmentation est tout de même surprenante compte tenu du fait que l'exocytose était provoquée par des stimulations électriques en train, qui en soient ne sont pas efficace à provoquer plus de libération de DA dans un contexte où Syt1 est supprimé. Bien que spéculatif, cet effet pourrait possiblement être dû à l'activité électrogénique du DAT qui permet de moduler le potentiel des membranes plasmiques axonales (Carvelli et al., 2004). Il pourrait également venir d'adaptations visant à promouvoir les mécanismes de libération de la DA indépendants de Syt1. De précédents travaux ont par exemple montré que le blocage du DAT, avec des drogues telles que la cocaïne ou la nomifensine, pouvait augmenter la libération exocytotique de DA par un mécanisme qui n'est pas encore clairement défini, mais pouvant impliquer la synapsine et le pool de vésicules de réserve qui lui est associé (Carboni et al., 1989; Venton et al., 2006; Aragona et al., 2008).

Ces effets importants des drogues bloquant le DAT chez les Syt1 cKO^{DA}, observés en comportement et en voltammétrie, sont néanmoins étonnants si on considère notre caractérisation en IHC montrant à la fois une diminution de la surface et de l'intensité du signal DAT dans les tranches de striatum. Ce résultat pourrait indiquer une capacité de recapture diminuée chez les souris KO. Une pareille adaptation serait logique, car elle contribuerait à maintenir plus longtemps la DA dans l'espace extracellulaire, permettant possiblement d'atteindre des niveaux suffisants à l'activation des récepteurs dopaminergiques. Cependant, la diminution de l'immunoréactivité du DAT n'est pas corroborée par notre analyse d'expression en RT-qPCR ou la quantification des niveaux de protéines par immunobuvardage. Ces différences pourraient venir de limitations techniques. Par exemple différents pools de DAT (cytoplasmique et/ou membranaire) pourraient être détectés différemment selon que le tissu ait été fixé versus frais. La technique de voltammétrie peut être utilisée afin d'évaluer les capacités de recapture du DAT, via les paramètres cinétiques de la phase descendante des pics de DA libérée. Malheureusement nos données de voltammétrie non pas pu être exploitées à cette fin, car les très petites réponses restantes chez les souris KO, bien que détectables, ont empêché une analyse fiable des cinétiques de recapture. La quantification de la fonction DAT dans des préparations de synaptosomes striataux pourraient aider à résoudre ce problème et conclure quant à la fonction du DAT chez les souris Syt1 cKO^{DA}. Il pourrait aussi être envisageable d'évaluer par immunobuvardage la quantité de DAT présent uniquement à la membrane plasmique, par l'utilisation d'un protocole de biotinylation du DAT en surface, sur des tranches de striatum (Rickhag et al., 2013).

4.3.4.4. Effet du KO de Syt1 sur la neurotransmission de la dopamine

Finalement, nous nous sommes aussi questionnés sur l'impact que pouvait avoir la délétion de Syt1 sur les récepteurs de la DA. Comme vu précédemment, les résultats de locomotion après blocage du DAT pouvaient être interprétés dans un contexte où la signalisation des récepteurs dopaminergiques était modifiée chez les souris KO, afin de garantir un contrôle normal de l'activité des ganglions de la base par le système dopaminergique, et ce, même si la libération phasique de DA se trouve dramatiquement altérée. Ce résultat nous a ainsi poussés à étudier de possibles adaptations au niveau des récepteurs dopaminergiques.

Nos résultats comportementaux et nos résultats d'autoradiographie ont ainsi démontré que les récepteurs D2 sont les plus affectés, avec une réponse accrue à l'agoniste D2 quinpirole et une réponse réduite à l'antagoniste D2 raclopride, ainsi qu'une liaison accrue au récepteur D2 dans le striatum ventro-latéral. Nos résultats de voltammétrie avec l'antagoniste sulpiride vont également dans le sens d'une augmentation de l'activité des récepteurs D2, particulièrement dans le striatum ventral. Le système de neurotransmission impliquant le récepteur D1 est apparu en revanche inchangé chez les animaux KO, car aucune différence n'est apparue pour la locomotion induite par l'agoniste D1 SCH23390, ni pour la liaison d'un radioligand sur le D1.

De façon intéressante, dans le modèle de souris présentant une perte massive des neurones dopaminergiques à la suite de l'expression durant le neurodéveloppement de la toxine diphtérique, les auteurs ont observé une réponse exagérée à la L-DOPA (précurseur de la synthèse de DA) et à l'halopéridol (antagonistes des récepteurs D2) chez les souris mutantes adultes. Ils ont ainsi émis l'hypothèse que la préservation des fonctions locomotrices de ces souris pouvait impliquer une sensibilisation des récepteurs dopaminergiques dans le striatum. Nos résultats présentant des fonctions motrices normales, une réponse exagérée à l'amphétamine et des adaptations au niveau des récepteurs D2 conforterait ainsi cette hypothèse.

Il convient néanmoins de noter que la méthodologie employée dans notre étude ne permet pas de conclure si les changements observés au niveau des récepteurs D2 proviennent d'adaptations pré- ou postsynaptiques. Comme nous en avons discuté précédemment, nos données évaluant le développement des neurones DA orienteraient plus dans le sens d'une sous-stimulation chronique des récepteurs D2 présynaptiques (autorécepteurs). Les réponses comportementales et l'augmentation de la densité des récepteurs D2 que nous avons observées dans notre étude

proviendraient alors essentiellement des récepteurs postsynaptiques présents notamment sur les neurones MSNs du striatum (voie de signalisation dopaminergique dite indirecte). Cette distinction pourrait néanmoins être étudiée plus spécifiquement à l'avenir, par exemple, via l'utilisation de différentes doses d'agonistes et antagonistes des récepteurs D2. En effet, des études ont montré qu'on pouvait activer sélectivement les autorécepteurs D2 *in vivo*; un effet supposé dû à une affinité de ces récepteurs pour la DA plus élevée que le D2 postsynaptique, bien que ce postulat n'ait pas encore vraiment été quantifié (*Ford, 2014*). Néanmoins, l'effet de la composante présynaptique a pu être évalué précédemment, notamment en chambre d'actimétrie, par l'emploi de faibles doses d'agonistes D2, (*Eilam and Szechtman, 1989; Gilbert et al., 2006*). Un protocole similaire pourrait ainsi aider à déterminer si les adaptations au niveau du récepteur D2 surviennent dans l'une ou l'autre (ou les deux) composante.

Chapitre 5 – Perspectives

Dans l'ensemble, les travaux menés au cours de mon doctorat ont permis d'améliorer nos connaissances des mécanismes de libération de la DA, aussi bien au compartiment axonal que somatodendritique. Comprendre ces mécanismes ouvre la porte à la possibilité de perturber, voir bloquer l'une ou l'autre de ces formes de libération en vue d'en étudier plus spécifiquement leurs fonctions ; ce que nous avons fait dans une certaine mesure dans le cas de la libération phasique de DA. Dans les prochaines sections, nous discuterons plus en détail des perspectives de recherches s'ouvrant sur ces découvertes, que ce soit en physiologie ou en pathologie.

5.1. Étude fonctionnelle du rôle de la libération phasique de dopamine

Dans notre étude, l'absence d'impact du KO de Syt1 sur les fonctions locomotrices pousse naturellement à questionner sur le rôle de la libération phasique de DA dans le comportement des animaux. Nos travaux sur Syt1 peuvent ainsi dessiner différentes hypothèses pouvant servir de base à de futurs travaux de recherche :

- (1) La très faible libération phasique de DA qui subsiste après la délétion de Syt1 pourrait être suffisante dans un système adapté à assurer des fonctions normales. Ainsi, identifier le senseur calcique impliqué dans cette libération subsistante permettrait possiblement de développer un modèle où la libération phasique est abolie en vue d'en étudier ses fonctions.
- (2) La libération phasique de DA pourrait ne pas être nécessaire à assurer le contrôle locomoteur, celui-ci serait assuré par des processus ne requérant pas une activation synchrone des neurones DA et la participation de Syt1. Il conviendrait alors d'orienter les travaux de recherche vers l'étude des mécanismes de la libération tonique de DA, afin de mieux comprendre sa fonction dans le contrôle du mouvement.
- (3) La libération phasique est nécessaire à d'autres fonctions dopamino-dépendantes telles que l'apprentissage, la mémoire, la motivation et les comportements conditionnés. Notre modèle Syt1 cKO^{DA} pourrait être ainsi utilisé pour tester ces fonctions.

Dans chacune de ces trois hypothèses, les adaptations importantes que nous avons observées durant le développement des souris Syt1 cKO^{DA} peuvent venir impacter les conclusions concernant la fonction de la libération phasique de DA dans le cerveau. Il apparaît ainsi pertinent à l'avenir de mieux caractériser un modèle où la délétion de Syt1 surviendrait à l'âge adulte, ce que nous avons initié, dans une certaine mesure, avec l'utilisation d'AAV-TH-Cre. On pourrait ainsi recourir à des stratégies plus efficaces et spécifiques, par exemple l'utilisation de souris DAT-iCreER qui expriment une cre recombinase inductible au tamoxifène, sous le contrôle du promoteur du DAT. Une stratégie virale sous réserve de trouver un promoteur TH plus spécifique pourrait s'avérer également très intéressante, car elle permettrait de dissocier plus facilement le rôle de la libération phasique de DA dans certaines populations de neurones dopaminergiques. On pourrait par exemple considérer injecter le virus dans des souris Syt1-floxées adultes de manière restreinte à la VTA et d'évaluer dans un second temps les conséquences de la perte de libération phasique pour les comportements d'appétences ou motivationnels. L'injection du virus en ne ciblant que la SNc pourrait quant à elle permettre d'évaluer les conséquences de la perte de libération phasique de DA sur l'apprentissage et le contrôle des comportements moteurs de la souris à l'âge adulte.

L'étude d'autres fonctions dépendantes de la DA semble une suite évidente à donner à notre projet. De façon intéressante, l'étude de la souris NMDA cKO^{DA} par Zweifel et coll. (2009), où la libération phasique de DA est partiellement altérée, oriente vers les potentiels comportements qui pourraient se retrouver impactés dans notre modèle Syt1 cKO^{DA}. Ceux-ci sont indiqués dans le **tableau 5**. Une interprétation globale de leurs résultats pourrait être que les décharges en rafales des neurones DA en réponse à des événements, apportent des signaux de saillance généralisée, qui focalisent l'attention des animaux et favorisent l'apprentissage des associations d'indices environnementaux (*cues*) avec ces mêmes événements. L'augmentation tonique de DA, telle qu'on peut la mesurer en microdialyse, est quant à elle indépendante du déclenchement en rafale et fournit un niveau basal de DA qui est en soi suffisant à engager la majorité des comportements.

La motivation pourrait être également une composante intéressante à étudier. Des études précédentes ont démontré que les souris hyper et hypodopaminergiques peuvent apprendre diverses tâches, mais que leur motivation à s'engager dans les tâches est considérablement modifiée. Par exemple, les souris déficientes en DA semblent être démotivées et ne s'engageront pas dans la plupart des tâches (Palmiter, 2008), tandis que les souris hyperdopaminergiques effectuent

certaines tâches plus rapidement avec moins de difficultés, suggérant une motivation accrue (Cagniard et al., 2006). Ces données suggèrent donc que la DA aurait un rôle dans les processus de récompense, en jouant plutôt sur la motivation pour une chose appétente (le « *wanting* »), que sur l'apprentissage de cette chose (Berridge, 2007).

Ainsi, étudier les processus de motivation, d'attention et d'apprentissage chez les souris Syt1 cKO^{DA} dont la libération phasique de DA est déficiente apparaît comme une suite intéressante à donner à ce projet.

Tableau 5. – Résumé des comportements analysés chez la souris NMDA cKO^{DA} présentant une libération phasique de DA altérée.

Consommation alimentaire (<i>ad libidum</i>)	↔
Latence pour s'alimenter (<i>free access</i>)	↔
Poids corporel	↔
Rotarod	↔
Latence pour trouver la plateforme (<i>morris water maze</i>)	↔
Mémoire de travail	↔
Reconnaissance d'un nouvel objet	↔
Sociabilité	↔
Test de la nage forcée	↔
Labyrinthe en croix surélevé (<i>elevated plus maze</i>)	↔
Prepulse inhibition (<i>PPI</i>)	↔
Activité locomotrice à la nouveauté	↔
Activité locomotrice avec drogues d'abus	↔
Sensibilisation à la cocaïne :	
Acquisition	↔
Retrait	↓
Préférence de place conditionnée (cocaïne) :	
Extinction	↔
Rétablissement	↓
Préférence de place conditionnée (nourriture)	↓
Labyrinthe aquatique (<i>cued water maze</i>) :	
Acquisition	↓
Rappel	↔
Labyrinthe en T (T-maze)	↓
Réflexe acoustique potentialisé par la peur (<i>fear-potentiated acoustic startle, FPS</i>)	↓
Conditionnement opérant	↓

Augmentation (↑, $P < 0.05$), diminution (↓, $P < 0.05$), ou pas de changement par rapport aux contrôles (↔). Adapté de Zweifel et al., 2009, et voir aussi Engblom et al., 2008 et Zweifel et al., 2008.

Concernant plus spécifiquement la fonction de la libération phasique dans le mésencéphale ventral, celle-ci apparaît plus difficile à aborder, car nous avons démontré qu'elle était vraisemblablement constituée d'un mélange de libération phasique axonale et somatodendritique. Notre première étude a néanmoins confirmé un rôle de Syt4 et Syt7 dans ce processus. Nous n'avons pas fait de tests comportementaux chez les souris KO, mais celles-ci ont été par le passé rapporté comme étant viable et ne présentant pas de déficits comportementaux notables, à l'exception de Syt4, avec un défaut dans les processus de mémoire et dans la coordination sensori-motrice (*Ferguson et al., 2000*). Cela dit, une limitation majeure de ces modèles est la délétion constitutive de ces isoformes, qui sont très largement exprimées dans le SNC. Ainsi, il apparaît nécessaire à de futures études de générer des modèles de KO conditionnels et si possible inductibles, de ces isoformes, afin d'explorer plus en détail la fonction de la libération somatodendritique de DA. Ces études devront également se faire en tenant compte du fait de l'existence d'une libération axonale de DA, contribuant possiblement aux deux tiers à la libération phasique dans cette région du cerveau, et possiblement d'une libération tonique, dont les mécanismes ne sont pas encore connus, mais qui devrait également contribuer à l'activation des récepteurs DA du mésencéphale.

5.2. Étude des mécanismes et rôles de la libération asynchrone et spontanée de dopamine

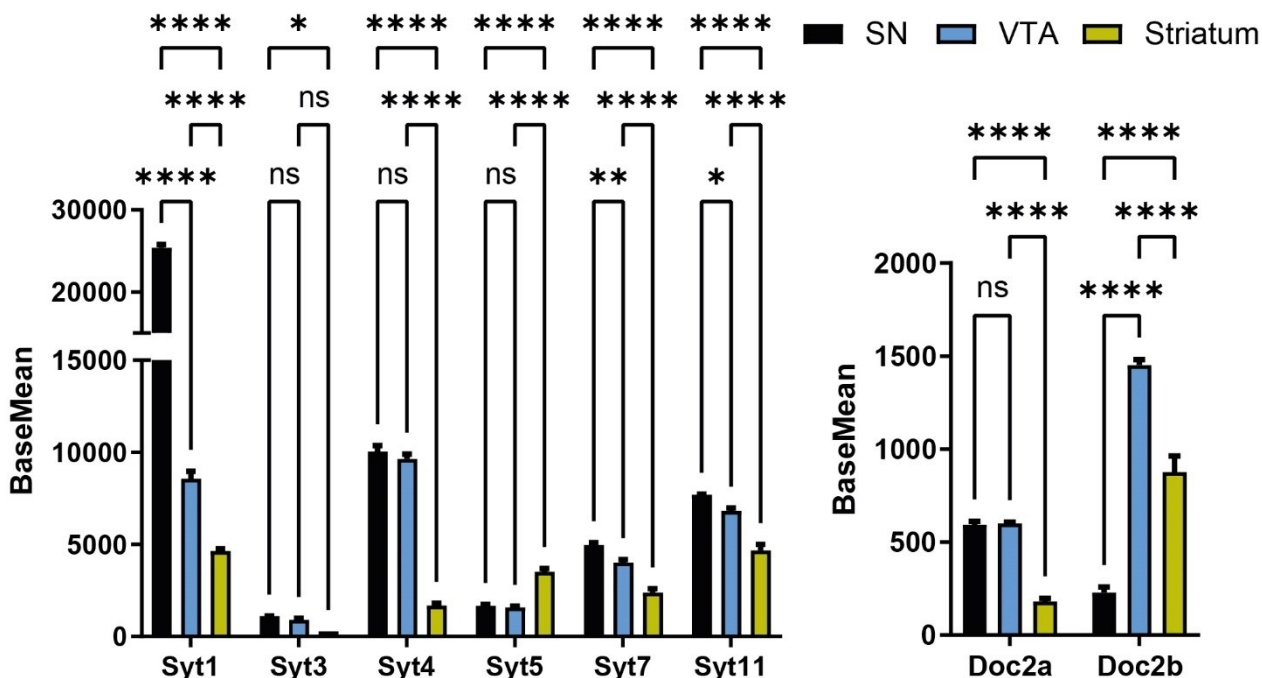
L'orientation de futurs projets de recherche pourrait aussi se faire en explorant plus en détail les autres mécanismes de libération de la DA. Comme nous en avons discuté précédemment, il existe trois modes principaux de libération des neurotransmetteurs : la libération synchrone, qui se produit quelques millisecondes après qu'un potentiel d'action ait envahi une terminaison, la libération asynchrone, qui persiste pendant des dizaines de millisecondes à des dizaines de secondes après un potentiel d'action ou une série de potentiels d'action, et enfin la libération spontanée de neurotransmetteurs, qui se produit en l'absence de dépolarisation présynaptique. Nos études ont exploré le rôle des senseurs calciques Syt1, 4 et 7, principalement en lien avec la libération synchrone de DA.

Ainsi, il apparaît pertinent à l'avenir d'étudier les mécanismes des autres formes de libération de la DA. Notre étude sur Syt1 oriente notamment sur l'existence d'un autre mécanisme dépendant de l'activité électrique des neurones DA. Parmi les candidats possibles à la régulation de cette

forme de libération, on retrouve Syt7 comme discuté précédemment, mais également les senseurs calciques de la famille Doc2. Ces derniers ont démontré leur fonction dans la libération asynchrone de neurotransmetteurs (*Groffen et al., 2010; Pang et al., 2011; Yao et al., 2011*). Le rôle qu'ils pourraient jouer dans le système DA est cependant inconnu à ce jour, leurs expression et localisation subcellulaire n'ayant pas été étudiées. Il est intéressant de souligner que les résultats (non publié) de séquençage des ARNm des neurones DA (*RNAseq*) de notre laboratoire indiquent que les deux isoformes connues de la famille Doc2 se retrouvent au niveau des neurones DA de la SNc et de la VTA (**figure 1**). Par ailleurs Doc2b se trouve environ 6 fois plus exprimé dans les neurones DA de la VTA que de la SNc. Ce résultat est intéressant, car dans notre modèle Syt1 cKO^{DA} nous avons constaté que la libération phasique subsistante dans le striatum ventral (terminaisons des neurones de la VTA) était environ deux fois plus importante que celle survenant dans le striatum dorsal (terminaisons des neurones de la SNc). Ce résultat pourrait indiquer que la libération phasique qui ne dépend pas de Syt1 serait contrôlée, au moins en partie, par l'activité du senseur calcique Doc2b. Le rôle de Syt7 et des protéines Doc2 pourrait être démontré dans le futur par des stratégies de knock-out ou de diminution de leurs expressions dans des souris Syt1 cKO^{DA}. Cette stratégie pourrait également s'envisager pour les autres senseurs calciques de la famille des Syts que l'on sait exprimés dans le système DA (Syt4, 5 et 11).

L'étude des mécanismes de libération spontanée, indépendante du calcium et de l'activité électrique des neurones, était jusqu'à récemment rendue difficile, car la microdialyse qui était la technique de choix à son étude présente une résolution temporelle bien trop faible pour bien rendre compte de ce processus. Néanmoins, les nouvelles techniques de détection de la DA au moyen de senseurs encodés génétiquement comme dLight (*Patriarchi et al., 2018*) ou GRAB_{DA} (*Sun et al., 2018*) présentent une résolution spatio-temporelle compatible à l'étude de la libération spontanée de DA (*J. E. Robinson et al., 2019; Foo et al., 2021*). Utiliser cette approche permettra à l'avenir de mieux caractériser ses mécanismes et fonctions.

Figure 1. – Résultat de l'analyse de transcriptome présentant les principaux senseurs calciques exprimés dans des neurones purifiés du striatum, SNc et VTA, provenant de souris nouveau-nées (P0) C57BL/6-JTH-GFP+.



BaseMean : moyenne des comptes d'expression génique (read) normalisée pour tous les échantillons ($n = 3$ souris). Les barres d'erreurs représentent la S.E.M. et l'analyse statistique a été conduite par ANOVA à deux voies suivies par des tests de Tukey (ns, non significative; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Par ailleurs, il convient de noter que les découvertes à venir concernant les mécanismes de libération de la DA pourraient être également étendues aux autres systèmes neuromodulateurs comme le système sérotoninergique ou noradrénergique. Ces derniers présentent en effet des caractéristiques communes au système DA telles qu'une arborisation axonale majoritairement asynaptique (Descarries et al., 1975; Séguéla et al., 1990) ou bien une libération à leur compartiment somatodendritique (Pudovkina et al., 2001; Huang et al., 2007; Trueta and De-Miguel, 2012). Cela pourrait également concerner certaines population de neurones peptidergiques, comme les neurones de l'hypothalamus libérant de l'ocytocine ou de la vasopressine, qui ont montré également une forme de libération dendritique (Ludwig, 2005; Bergquist et Ludwig, 2008).

5.3. Étude des mécanismes de trafic intracellulaire et de fusion des tubulovésicules contenant la dopamine

Malgré les découvertes faites au cours de ma thèse concernant le rôle de Syt1, 4 et 7 dans la libération phasique de dopamine, il convient de noter que le mécanisme de libération somatodendritique de DA reste encore mystérieux; notamment les publications qui suggèrent que la DA est contenue dans les vésicules tubulaires sont assez anciennes. Comme mentionné dans l'introduction, il semble que la zone de stockage principale de la DA au niveau STD serait au niveau de saccules du réticulum endoplasmique lisse exprimant le VMAT2, aussi appelés « tubulovésicules », bien que de petites vésicules à fond clair ou de larges vésicules à cœur dense aient été également observé sporadiquement (*Melissa J. Nirenberg et al., 1996*). VMAT2 a aussi été observé sur les membranes limitantes de corps multivésiculaires qui pourraient être impliqués dans le recyclage de protéines membranaires. Toutefois à l'heure actuelle on ne sait toujours pas comment ces tubulovésicules pourraient hypothétiquement fusionner à la membrane en vue de libérer de la DA (et quel rôle pourrait jouer les Syts dans ce processus). L'utilisation de la réserpine pour inhiber le VMAT2 (*Rice et al., 1994; Heeringa and Abercrombie, 1995; Beckstead et al., 2004*) constitue en effet une preuve de son rôle dans le stockage de la DA dans cette région, mais pas dans l'exocytose *per se*.

Compte tenu du fait de l'existence d'une libération de nature exocytotique au niveau du soma et dendrites des neurones dopaminergiques et du rôle joué par les Syts 1, 4 et 7, un autre projet de recherche pourrait se focaliser spécifiquement sur les mécanismes de fusion des vésicules à la membrane plasmique du compartiment STD. À l'heure actuelle, une des meilleures approches pour étudier cette question reposerait sur des études de microscopie avec utilisation de synapto-pHluorines. Il s'agit de senseurs encodés génétiquement reposant sur l'utilisation de variantes de la GFP rendues sensibles aux variations de pH (*Miesenböck et al., 1998*). Ces sondes sont conçues de telle sorte qu'au pH acide de l'intérieur des vésicules synaptiques (environ 5.5-5.6), la synapto-pHluorine est non fluorescente (éteinte). Lorsque les vésicules fusionnent à la membrane, la synapto-pHluorine est alors exposée à l'espace extracellulaire neutre (7.4) et la terminaison présynaptique devient alors vivement fluorescente. À la suite de l'endocytose des vésicules, celles-ci se réacidifient, la fluorescence s'éteint et le cycle peut recommencer. Coupler l'utilisation des

pHluorine avec des techniques de microscopie en directe (*live-imaging*) permet ainsi d'avoir une approche permettant d'explorer la localisation et le trafic subcellulaire de certaines protéines clés du cycle de vie d'une vésicule synaptique (*Fox-Loe et al., 2017*).

Les pHluorines peuvent ainsi être couplées à la partie luminale de certaines protéines comme les v-SNAREs qui sont typiquement associées aux vésicules synaptiques (telles que certaines Syts). Cette approche a notamment été utilisée par le groupe de Edwin Chapman dans des neurones de l'hippocampe en couplant 13 des 17 membres de la famille des Syts à des pHluorins afin de déterminer si (1) elles se recyclent après dépolarisation des neurones (2) elles subissent une exo/endocytose dans les axones, les dendrites ou les deux et (3) leurs caractéristiques de recyclage suggèrent une localisation dans les vésicules synaptiques ou dans d'autres sous-types de vésicules (*Dean et al., 2012*). Ils ont ainsi constaté que cinq Syts (1, 2, 5, 7 et 17) ont subi une exocytose exclusivement au niveau des axones, mais seuls Syt1 et 2 présentaient des caractéristiques de recyclage indiquant une localisation dans les vésicules synaptiques, tandis que Syt5, 7 et 17 présentaient une cinétique de recyclage unique suggérant une localisation dans des sous-types distincts de vésicules. Deux Syts (3 et 11) ont été recyclées exclusivement dans les dendrites, et quatre (4, 6, 9 et 12) à la fois dans les axones et les dendrites.

Une approche comparable pourrait être réalisée plus spécifiquement dans les neurones dopaminergiques, puisque des différences d'expressions et de localisations subcellulaires peuvent exister dépendamment du système considéré. Par exemple, Syt3 qui a démontré un recyclage au compartiment STD des neurones de l'hippocampe n'a cependant jamais été étudié dans le système DA. Nos résultats de RNAséq de souris à P0 indiquent une expression modeste de Syt3 dans les neurones DA (figure 1). Par ailleurs, Syt4 a présenté dans cette étude un trafic intracellulaire aux deux compartiments alors que nous avons démontré sa localisation strictement somatodendritique dans le système DA. Ces différences pourraient ainsi être analysées spécifiquement dans le système dopaminergique à l'avenir.

Il convient également de noter que cette approche ne marcherait que si les vésicules tubulaires contenant la DA présentent une acidification analogue à celle rencontrée dans les vésicules synaptiques (pH de 5.5-5.6). Cela apparaît probable, car la dopamine doit être protégée de l'oxydation et l'enzyme v-ATPase nécessaire à l'acidification de certains organites intracellulaires a été rapportée présente en immunohistochimie au niveau des somas des neurones dopaminergiques

de la SNc (*Witkovsky et al., 2009*). En revanche cette étude a montré que cette enzyme est absente des dendrites suggérant que le remplissage et le stockage de la DA en vue de sa libération diffèrent dans les dendrites de la SNr. L'étude du trafic intracellulaire du site de stockage primaire de la DA que serait hypothétiquement le réticulum endoplasmique (pH 7.2) jusqu'à la membrane plasmique devrait ainsi tenir compte du gradient de pH qui existe le long du trans Golgi network (pH 6-6.7) et dans les différents compartiments subcellulaires (*Casey et al., 2010; Reifenrath and Boles, 2018; Deschamps et al., 2020*).

5.4. Implications dans un contexte pathologique : cas de la maladie de Parkinson

Dans notre seconde étude, nous avons montré les nombreuses adaptations survenant chez la souris Syt1 cKO^{DA}. De façon intéressante, celles-ci sont similaires à celles observées dans les stades présymptomatiques de la maladie de Parkinson. La surprenante résilience des fonctions motrices dans notre modèle est en effet une caractéristique importante du Parkinson. Dans celle-ci, la perte de l'innervation dopaminergique survient graduellement, avec des dysfonctionnements moteurs n'apparaissant qu'après une perte étendue des terminaisons dopaminergiques dans le striatum (*Halliday et al., 1990*). Cette résilience a été supposée être due à des compensations progressives du système DA, incluant une synthèse accrue de DA dans les axones restants et une régulation à la hausse des récepteurs D2, observés aussi bien dans les tissus humains et les modèles animaux (*Bezard et al., 2003; Mercuri and Bernardi, 2005; Golden et al., 2013*).

Compte tenu de ces similarités, notre modèle Syt1 cKO^{DA} pourrait représenter un nouveau modèle pour étudier les mécanismes compensatoires et la sensibilité dans la maladie de Parkinson. En particulier nos travaux soulèvent l'hypothèse qu'au fur et à mesure que la perte des terminaisons DAergiques progresse dans la maladie de Parkinson, même si la libération phasique de DA est fortement altérée, tant qu'un tonus suffisant de DA extracellulaire est maintenu, de nombreuses fonctions motrices de base seront alors préservées. Cette idée est notamment à la base des thérapies visant à l'implantation de cellules sécrétant de la DA dans le striatum (*Parmar et al., 2019*). Développer de nouveaux modèles où 100% de la libération phasique serait abolie durant le développement ou à différents stades adultes, ou des modèles où la libération tonique serait impactée, constituerait certainement une avancée dans notre compréhension des phénomènes de compensation survenant dans la maladie de Parkinson.

Par ailleurs, dans notre étude sur Syt1, nous nous sommes principalement intéressés aux adaptations survenant au niveau des terminaisons du striatum, mais pas à celles survenant au sein du compartiment somatodendritique. Quelle soit d'origine axonale ou en provenance du soma et des dendrites, il y a bel et bien de la DA libérée dans le mésencéphale ventral. Bien que l'on sache que celle-ci soit nécessaire aux contrôles du comportement locomoteur (*Robertson et Robertson, 1989; Timmerman et Abercrombie, 1996; Crocker, 1997; Bergquist et al., 2003; Andersson et al., 2006; Schoffemeer et al., 2011; Mebel et al., 2012*), le rôle qu'elle pourrait jouer dans le tableau clinique de la maladie de Parkinson est encore inconnu. Les symptômes parkinsoniens classiques peuvent être liés à un déséquilibre de l'activité des noyaux gris centraux, principalement dû à la perte des neurones DA dans la substance noire. Depuis des décennies, l'intérêt s'est alors porté sur la perte de la libération terminale de DA dans le striatum et sur les tentatives de restaurer des niveaux de DA dans cette région, que ce soit par traitement à la L-DOPA (*Fahn, 2015*) ou par transplantation de tissus mésencéphaliques (*Parmar et al., 2019*). Étonnamment, la contribution de la libération STD de DA à la perturbation du fonctionnement des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson a reçu peu d'attention jusqu'à présent. Cela pourrait être en partie dû au fait que peu de choses sont présentement connu sur ces mécanismes. Nos travaux sur la participation de Syt4 et Syt7 à la libération STD et de Syt1 à la libération axonale au niveau du mésencéphale pourraient ainsi contribuer à la création de nouveaux modèles permettant l'étude de cette fonction.

Il existe par ailleurs des indices de l'existence de mécanismes d'adaptations analogues à ceux que nous avons observés aux terminaisons au niveau du mésencéphale ventral. Des travaux antérieurs en microdialyse ont en effet montré que la libération STD de DA est conservée plus longtemps que la libération des terminaisons axonales dans le striatum après des lésions à la 6-hydroxydopamine (*Hoffman et al., 1997; Sarre et al., 2004*) et que Syt4 et Syt7 sont par ailleurs régulées à la hausse suite à de telles lésions (*Glavan et Zivin, 2005*).

Dans une série d'expériences non publiée, nous avons cherché à voir comment la libération STD de DA pouvait être affectée dans un modèle de lésion. Nous nous sommes basés sur un protocole de Stott et Barker (*2014*) qui ont utilisé de fortes doses de 6-OHDA (10 µg) et évalué la cinétique de dégénérescence des neurones DA au compartiment axonale et STD. Nous avons ainsi adapté ce protocole pour évaluer l'impact d'une lésion unilatérale du striatum sur la libération évoquée STD de DA, 1 jour après la lésion, où une perte précoce des terminaisons axonales se

produit, et 14 jours après la lésion, à un moment où le soma et les dendrites des neurones DA commencent à être sévèrement impactés. Nous avons fait l'hypothèse de possibles adaptations de la libération STD, en lien avec les études de microdialyse démontrant une résilience de cette forme de libération dans ce genre de modèle, et également en lien avec l'hypothèse de dégénérescence axonale rétrograde (« *dying-back* ») dans la maladie de Parkinson (Tagliaferro et Burke, 2016).

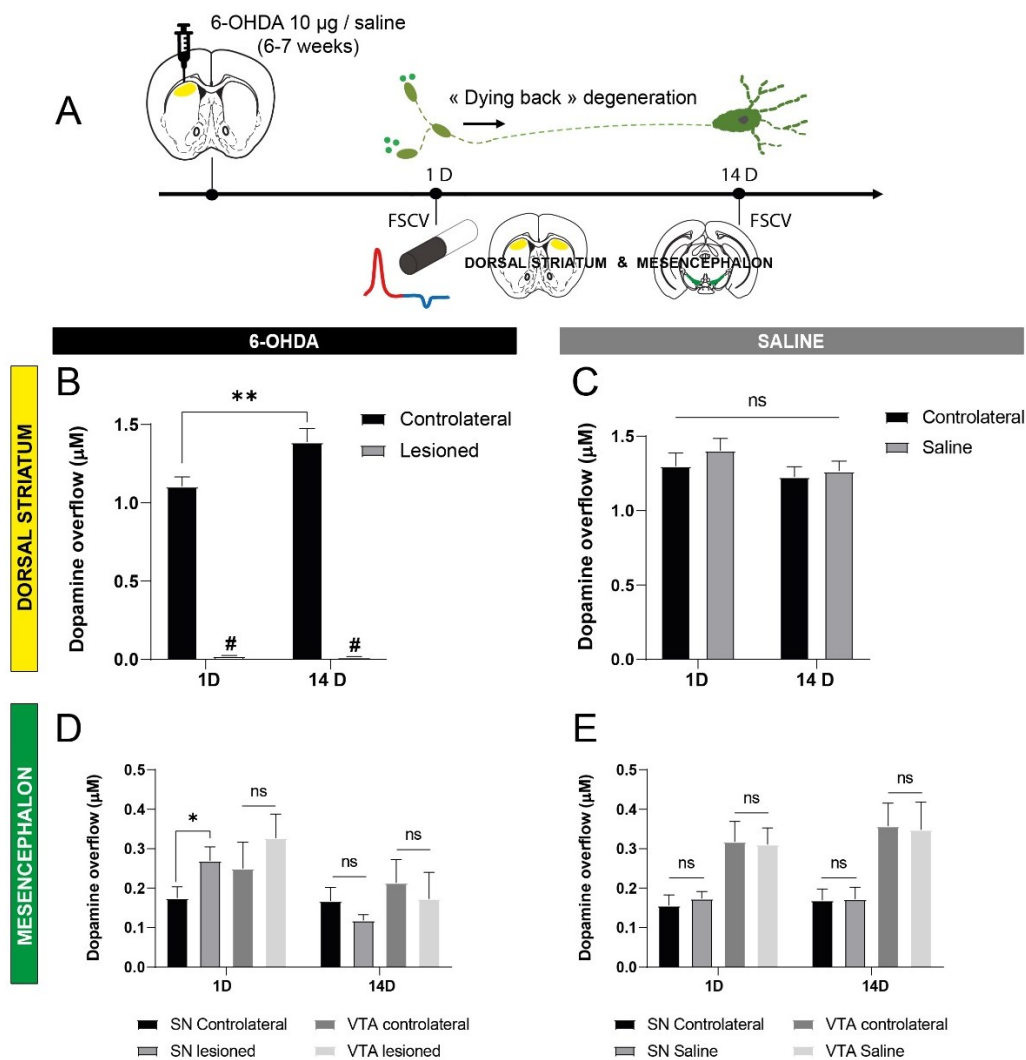
Méthode : des injections stéréotaxiques ont été réalisées dans le striatum dorsal de souris Ai9 ; DAT^{IRESc^{re}} de 6-7 semaines (The Jackson lab, stock 007909 et 006660), exprimant le rapporteur tdTomato dans les neurones DA (coordonnées : AP +1.0 mm; ML +1.5 mm; DV -2.8 mm). Les injections ont été faites unilatéralement avec de la solution saline ou de la 6-hydroxydopamine (Sigma, Canada), à la dose de 5 µg/µL pour 2 µL au total (10 µg), au rythme de 0.5 µL/min. Stott et Barker (2014) ont observé un impact de la 6-OHDA à cette dose sur les terminaisons TH-positives du striatum seulement quelques heures après l'injection, et également un impact sur le compartiment STD, mais retardé de plusieurs jours après injection, avec une dégénérescence des neurones DA de la SNc de l'ordre de 50% après 12 jours. Nous avons ainsi procédé à des enregistrements sur tranche de striatum et de mésencéphale par voltammétrie cyclique, 24 heures ou 14 jours après les injections (**Figure 2A**). La libération axonale de DA a été évaluée au moyen de pulse unique (1ms à 400 µA) et la libération STD par train de stimulation (30 pulses à 10 Hz) en présence de 5 µM de nomifensine et sulpiride.

Résultats : nous avons constaté à 1 jour post-injection une diminution >99% de la libération de DA évoquée électriquement dans le striatum dorsal, confirmant l'effet robuste et aigu de la 6-OHDA sur les terminaisons axonales DA [n = 12 tranches/6 souris] (**Figure 2B**). Cette abolition de la libération axonale de DA s'est également maintenue après 14 jours [n= 10 tranches/5 souris]. Curieusement, une petite diminution de la libération axonale de DA a également été détectée dans le striatum controlatéral au jour 1 (1,1 µM +/- 0,06 µM vs 1,39 µM +/- 0,08 µM à 14 jours), ce qui n'a pas été constaté chez les souris contrôles injectées à la saline (1,3 µM +/- 0,09 µM vs 1,28 µM +/- 0,07 µM à 14 jours). Comme prévu, il n'y avait par ailleurs aucun impact des injections elles-mêmes sur la libération de DA, comme démontré chez les animaux traités avec une solution saline [n = 12 tranches/6 souris pour chaque période évaluée] (**Figure 2C et E**).

En revanche, nous avons constaté que 1 jour après l'injection de 6-OHDA, la libération de STD DA au niveau de la SNc n'était pas réduite, mais significativement plus élevée dans l'hémisphère

lésé ($0,27 \mu\text{M} \pm 0,03 \mu\text{M}$, [n = 13 coupes /6 souris]) en comparaison du côté controlatéral ($0,18 \mu\text{M} \pm 0,03$) (test t non apparié, $p = 0,0467$) (**Figure 2D**). A 14 jours, stade auquel on s'attend à ce que la neurodégénérescence ait atteint le compartiment STD et qu'environ la moitié des neurones DA de la SNc ait dégénéré (*Stott and Barker, 2014*), seule une tendance non significative (test t non apparié, $p = 0,1973$) à une diminution de la libération de DA dans la SNc lésée ($0,12 \mu\text{M} \pm 0,015$, [n = 10 tranches/5 souris]) a été observée par rapport au côté controlatéral ($0,17 \mu\text{M} \pm 0,034 \mu\text{M}$). Par ailleurs, il n'y avait pas de changements significatifs dans la libération STD de DA dans la région de la VTA à 1 ou 14 jours après 6-OHDA.

Figure 2. – La libération STD de DA est plus résistante que la libération axonale dans un modèle de lésion à la 6-OHDA.



(A) Protocole utilisé pour les expériences de lésions et de voltammétrie. (B-C) Moyennes des pics de DA libérée (μM) par stimulation unitaire ($400 \mu\text{A}$, 1ms , dans 3 sites/hémisphère) obtenue dans le striatum dorsal de souris traitées à la 6-OHDA (B) et solution saline (C). (D-E) Moyennes des pics de DA libérée (μM) obtenus dans le mésencéphale ventral par stimulation en train (30 stimuli, 10 Hz , avec aCSF + $5 \mu\text{M}$ de nomifensine/sulpiride) de souris traitées à la 6-OHDA (D) et solution saline (E). Les barres d'erreur représentent \pm E.S.M. L'analyse statistique a été réalisée par *t*-test (côté controlatéral vs ipsilatéral) (ns, non significatif; ***, $p < 0,001$; #, $p < 0,0001$).

Dans l'ensemble, ces données indiquent que si la libération axonale est extrêmement sensible aux effets toxiques d'une unique injection de 6-OHDA, la libération STD est, quant à elle, étonnamment plus résistante ce qui confirme certaines observations précédentes ayant mesuré les niveaux extracellulaires de DA dans le mésencéphale de rat traités à la 6-OHDA (Sarre et al., 2004). Cette observation irait également dans le sens d'une étude récente du groupe de Surmeier ayant généré un nouveau modèle murin avec une perturbation partielle de la fonction du complexe I mitochondrial et qui présente un parkinsonisme progressif, débutant à l'axone, sensible à la lévodopa, mais qui n'a émergé qu'après la perte ultérieure de la libération de dopamine dans la substance noire (González-Rodríguez et al., 2021).

Une limitation de notre approche préliminaire serait un possible bourgeonnement compensatoire des neurones sérotoninergiques après la lésion. Il a été rapporté précédemment que la 5-HT contribue aux signaux en FSCV évoqués par stimulation électrique dans la SNc des rongeurs (Cragg et al., 1997). Bien que nous ne puissions pas complètement exclure une petite contribution de la 5-HT au signal que nous avons détecté, les voltamogrammes obtenus sur les sites d'enregistrement ont montré des pics d'oxydation et de réduction uniques, à des potentiels compatibles avec l'oxydation et la réduction de DA. Cependant, il serait intéressant de confirmer nos résultats au moyen des nouvelles approches d'optogénétiques que nous avons développées, afin d'obtenir une stimulation sélective des neurones DA. La plasticité des fibres 5-HT est également peu susceptible d'expliquer notre découverte d'une augmentation de la libération de STD DA dans le SNc seulement 1 jour après la lésion. Cette observation suggère plutôt qu'aux premiers stades de la physiopathologie de la maladie de Parkinson, la perte de la signalisation axonale dopaminergique dans le striatum dorsal pourrait constituer un signal aux neurones de la SNc. Ceux-ci verraient leur libération STD de DA augmentée, ce qui pourrait constituer un mécanisme

compensatoire possible afin de maintenir des fonctions normales. Bien que cette hypothèse soit spéculative et nécessitera d'autres expériences pour clarifier l'évolution dans le temps et les mécanismes impliqués, ces résultats invitent à explorer plus en détail le rôle et la plasticité de la libération STD de DA dans des modèles plus pertinents de la maladie de Parkinson. Il serait également intéressant de démêler les contributions possibles entre libération STD et axonale de DA survenant dans la VTA après des lésions partielles, en raison de l'apparition possible de fibres axonales compensatrices dans le mésencéphale de tels modèles (*Fernandes Xavier et al., 1994*). Des quantifications des neurones DA par stéréologie à différents stades seront également nécessaires pour évaluer l'étendue des lésions dans le mésencéphale ventral.

Conclusions

Mon projet de thèse s'est inscrit dans une démarche de recherche fondamentale visant à mieux comprendre les mécanismes de libération de la DA dans le cerveau. Ce neurotransmetteur est étudié de manière intensive depuis des décennies, en lien avec son rôle dans diverses maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques, mais force est de constater que les connaissances de ces mécanismes de base sont encore déficientes, en comparaison avec d'autres systèmes neuronaux. La contribution de mon projet à ces connaissances s'est portée sur l'étude des senseurs calciques Syt1, Syt4 et Syt7 dont je démontre l'importance pour le contrôle de la libération phasique de DA, aussi bien dans le compartiment axonal, que dans le compartiment somatodendritique. Ces travaux ont débouché sur la génération de nouveaux modèles et approches, permettant d'étudier plus spécifiquement l'une ou l'autre de ces formes de libération.

Ces données ouvrent la porte dans un futur proche à une meilleure compréhension du rôle de la libération phasique et synchrone de la DA en comparaison de la libération asynchrone et spontanée. Par ailleurs, nous avons montré que les adaptations survenant chez les souris dont la libération de DA est altérée miment certains aspects neuropathologiques que l'on retrouve dans la maladie de Parkinson. Ainsi, la poursuite de ces recherches devrait certainement conduire à la génération de nouveaux modèles à l'étude de cette maladie. De manière plus générale, les mécanismes découverts au sein du système dopaminergique au cours de ma thèse peuvent également être étendus à tous les autres systèmes neuromodulateurs, offrant des pistes de recherche et des implications multiples.

Bibliographie

- Agnati, L.F., Bjelke, B., Fuxe, K., 1992. Volume Transmission in the Brain. *American Scientist* 80, 362–373.
- Agnati, L.F., Zoli, M., Strömberg, I., Fuxe, K., 1995. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69, 711–726. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00308-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00308-6)
- Ahras, M., Otto, G.P., Tooze, S.A., 2006. Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 173, 241–251. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506163>
- Aizman, O., Brismar, H., Uhlén, P., Zettergren, E., Levey, A.I., Forsberg, 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. <https://doi.org/10.1038/72929>
- Alvarez de Toledo, G., Fernández-Chacón, R., Fernández, J.M., 1993. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363, 554–558. <https://doi.org/10.1038/363554a0>
- Alvarez, J.C., Bothua, D., Collignon, I., Advenier, C., Spreux-Varoquaux, O., 1999. Simultaneous measurement of dopamine, serotonin, their metabolites and tryptophan in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with dual coulometric detection. *Biomed. Chromatogr.* 13, 293–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0801\(199906\)13:4<293::AID-BMC863>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0801(199906)13:4<293::AID-BMC863>3.0.CO;2-R)
- Anderegg, A., Poulin, J.-F., Awatramani, R., 2015. Molecular Heterogeneity of Midbrain Dopaminergic Neurons – Moving Toward Single Cell Resolution. *FEBS Lett* 589, 3714–3726. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.022>
- Andersson, D.R., Nissbrandt, H., Bergquist, F., 2006. Partial depletion of dopamine in substantia nigra impairs motor performance without altering striatal dopamine neurotransmission. *European Journal of Neuroscience* 24, 617–624. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04953.x>
- Andersson, M., Blomstrand, F., Hanse, E., 2007. Astrocytes play a critical role in transient heterosynaptic depression in the rat hippocampal CA1 region. *J Physiol* 585, 843–852. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142737>
- Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Chrapak, S., Audinat, E., 2004. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24, 6920–6927. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-04.2004>
- Anzalone, A., Lizardi-Ortiz, J.E., Ramos, M., Mei, C.D., Hopf, F.W., Iaccarino, C., Halbout, B., Jacobsen, J., Kinoshita, C., Welter, M., Caron, M.G., Bonci, A., Sulzer, D., Borrelli, E., 2012. Dual Control of Dopamine Synthesis and Release by Presynaptic and Postsynaptic Dopamine D2 Receptors. *J. Neurosci.* 32, 9023–9034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0918-12.2012>
- Aperia, A.C., 2000. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 621–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.621>

- Ara, J., Przedborski, S., Naini, A.B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R.R., Horwitz, J., Ischiropoulos, H., 1998. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7659–7663.
- Aragona, B.J., Cleaveland, N.A., Stuber, G.D., Day, J.J., Carelli, R.M., Wightman, R.M., 2008. Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus accumbens shell by cocaine is attributable to a direct increase in phasic dopamine release events. *J Neurosci* 28, 8821–8831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2225-08.2008>
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., Haydon, P.G., 1998. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18, 6822–6829.
- Arbuthnott, G.W., Wickens, J., 2007. Space, time and dopamine. *Trends in Neurosciences* 30, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.12.003>
- Archibald, J.T., White, T.D., 1974. Rapid reversal of internal Na⁺ and K⁺ contents of synaptosomes by ouabain. *Nature* 252, 595–596. <https://doi.org/10.1038/252595a0>
- Arenas, E., Denham, M., Villaescusa, J.C., 2015. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* 142, 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>
- Arthur, C.P., Dean, C., Pagratis, M., Chapman, E.R., Stowell, M.H.B., 2010. Loss of synaptotagmin IV results in a reduction in synaptic vesicles and a distortion of the Golgi structure in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.056>
- Aubert, I., Ghorayeb, I., Normand, E., Bloch, B., 2000. Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum. *J Comp Neurol* 418, 22–32.
- Augustine, G.J., Charlton, M.P., Smith, S.J., 1985. Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J. Physiol. (Lond.)* 367, 163–181. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015819>
- Avshalumov, M.V., Chen, B.T., Koós, T., Tepper, J.M., Rice, M.E., 2005. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J. Neurosci.* 25, 4222–4231. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4701-04.2005>
- Avshalumov, M.V., Chen, B.T., Marshall, S.P., Peña, D.M., Rice, M.E., 2003. Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. *J. Neurosci.* 23, 2744–2750.
- Babity, J.M., Armstrong, J.N., Plumier, J.-C.L., Currie, R.W., Robertson, H.A., 1997. A novel seizure-induced synaptotagmin gene identified by differential display. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 2638–2641. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2638>
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., Malenka, R.C., Südhof, T.C., 2013. Synaptotagmin-1 and Synaptotagmin-7 Trigger Synchronous and Asynchronous Phases of Neurotransmitter Release. *Neuron* 80, 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.026>
- Bach, A.W., Lan, N.C., Johnson, D.L., Abell, C.W., Bembenek, M.E., Kwan, S.W., Seeburg, P.H., Shih, J.C., 1988. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4934–4938. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4934>

- Baker, H., Joh, T.H., Reis, D.J., 1980. Genetic control of number of midbrain dopaminergic neurons in inbred strains of mice: relationship to size and neuronal density of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4369–4373.
- Banerjee, A., Lee, J., Nemcova, P., Liu, C., Kaeser, P.S., 2020. Synaptotagmin-1 is the Ca²⁺ sensor for fast striatal dopamine release. *eLife* 9, e58359. <https://doi.org/10.7554/eLife.58359>
- Barnea, G., Strapps, W., Herrada, G., Berman, Y., Ong, J., Kloss, B., Axel, R., Lee, K.J., 2008. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 64–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710487105>
- Basu, S., Dasgupta, P.S., 2000. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *Journal of Neuroimmunology* 102, 113–124. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00176-9](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00176-9)
- Bayer, V.E., Pickel, V.M., 1990. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *J. Neurosci.* 10, 2996–3013.
- Beart, P.M., McDonald, D., 1980. Neurochemical Studies of the Mesolimbic Dopaminergic Pathway: Somatodendritic Mechanisms and GABAergic Neurones in the Rat Ventral Tegmentum. *Journal of Neurochemistry* 34, 1622–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb11253.x>
- Beaudet, A., Descarries, L., 1978. The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* 3, 851–860. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(78\)90115-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(78)90115-x)
- Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., 2011. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* 63, 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Beaulieu, J.-M., Tirota, E., Sotnikova, T.D., Masri, B., Salahpour, A., Gainetdinov, R.R., Borrelli, E., Caron, M.G., 2007. Regulation of Akt Signaling by D2 and D3 Dopamine Receptors In Vivo. *J. Neurosci.* 27, 881–885. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5074-06.2007>
- Beckstead, M.J., Ford, C.P., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2007. Presynaptic regulation of dendrodendritic dopamine transmission. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1479–1488. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05775.x>
- Beckstead, M.J., Grandy, D.K., Wickman, K., Williams, J.T., 2004. Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron* 42, 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.019>
- Beckstead, M.J., Williams, J.T., 2007. Long-term depression of a dopamine IPSC. *J. Neurosci.* 27, 2074–2080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3251-06.2007>
- Benoit-Marand, M., Borrelli, E., Gonon, F., 2001. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J. Neurosci.* 21, 9134–9141.
- Ben-Shachar, D., Zuk, R., Gazawi, H., Ljubuncic, P., 2004. Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochemical Pharmacology* 67, 1965–1974. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.02.015>
- Bentivoglio, M., Morelli, M., 2005. Chapter I The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain, in: Dunnett, S.B., Bentivoglio, M., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Dopamine*. Elsevier, pp. 1–107. [https://doi.org/10.1016/S0924-8196\(05\)80005-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8196(05)80005-3)

- Benuck, M., Reith, M.E.A., 1992. Dopamine releasing effect of phenylbiguanide in rat striatal slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345, 666–672. <https://doi.org/10.1007/BF00164581>
- Bergquist, F., Jonason, J., Pileblad, E., Nissbrandt, H., 1998. Effects of local administration of L-, N-, and P/Q-type calcium channel blockers on spontaneous dopamine release in the striatum and the substantia nigra: a microdialysis study in rat. *J. Neurochem.* 70, 1532–1540. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70041532.x>
- Bergquist, F., Ludwig, M., 2008. Dendritic Transmitter Release: A Comparison of Two Model Systems. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 677–686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01714.x>
- Bergquist, F., Niazi, H.S., Nissbrandt, H., 2002. Evidence for different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. *Brain Res.* 950, 245–253. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03047-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03047-0)
- Bergquist, F., Nissbrandt, H., 2003. Influence of r-type (Cav2.3) and t-type (Cav3.1–3.3) antagonists on nigral somatodendritic dopamine release measured by microdialysis. *Neuroscience* 120, 757–764. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00385-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00385-3)
- Bergquist, F., Shahabi, H.N., Nissbrandt, H., 2003. Somatodendritic dopamine release in rat substantia nigra influences motor performance on the accelerating rod. *Brain Research* 973, 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02555-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02555-1)
- Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J.F., Pappy, M., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., 1995. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J. Neurosci.* 15, 7821–7836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-12-07821.1995>
- Berridge, K.C., 2007. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 191, 391–431. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0578-x>
- Bertler, A., Rosengren, E., 1959. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15, 10–11.
- Berton, F., Iborra, C., Boudier, J.-A., Seagar, M.J., Marquèze, B., 1997. Developmental Regulation of Synaptotagmin I, II, III, and IV mRNAs in the Rat CNS. *J. Neurosci.* 17, 1206–1216. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-04-01206.1997>
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Hervé, D., Valjent, E., Girault, J.-A., 2008. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28, 5671–5685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008>
- Bérubé-Carrière, N., Guay, G., Fortin, G.M., Kullander, K., Olson, L., Wallén-Mackenzie, Å., Trudeau, L.-E., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.07992.x>
- Beuming, T., Kniazeff, J., Bergmann, M.L., Shi, L., Gracia, L., Raniszewska, K., Newman, A.H., Javitch, J.A., Weinstein, H., Gether, U., Loland, C.J., 2008. The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat. Neurosci.* 11, 780–789. <https://doi.org/10.1038/nn.2146>
- Bevilaqua, L.R.M., Cammarota, M., Dickson, P.W., Sim, A.T.R., Dunkley, P.R., 2003. Role of protein phosphatase 2C from bovine adrenal chromaffin cells in the dephosphorylation of phospho-serine 40 tyrosine hydroxylase. *Journal of Neurochemistry* 85, 1368–1373. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01792.x>

- Bezard, E., Gross, C.E., Brotchie, J.M., 2003. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends in Neurosciences* 26, 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00038-9)
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., Volterra, A., 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7, 613–620. <https://doi.org/10.1038/nn1246>
- Binotti, B., Jahn, R., Chua, J.J.E., 2016. Functions of Rab Proteins at Presynaptic Sites. *Cells* 5. <https://doi.org/10.3390/cells5010007>
- Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., 1961. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien. Klin. Wochenschr.* 73, 787–788.
- Björklund, A., Lindvall, O., 1975. Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Research* 83, 531–537. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90849-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90849-5)
- Björklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences, Fifty years of dopamine research* 30, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>
- Björklund, A., Lindvall, O., Svensson, L.-Å., 1972. Mechanisms of fluorophore formation in the histochemical glyoxylic acid method for monoamines. *Histochemie* 32, 113–131. <https://doi.org/10.1007/BF00303727>
- Blaschko, H., 1957. Metabolism and storage of biogenic amines. *Experientia* 13, 9–13.
- Blaschko, H., 1942. The activity of l(—)-dopa decarboxylase. *The Journal of Physiology* 101, 337–349. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1942.sp003988>
- Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T.C., Niemann, H., Jahn, R., 1993a. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365, 160–163. <https://doi.org/10.1038/365160a0>
- Blasi, J., Chapman, E.R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R., 1993b. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12, 4821–4828.
- Bodei, S., Arrighi, N., Spano, P., Sigala, S., 2009. Should we be cautious on the use of commercially available antibodies to dopamine receptors? *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 379, 413–415. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0384-6>
- Bolam, J.P., Pissadaki, E.K., 2012. Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. *Mov Disord* 27, 1478–1483. <https://doi.org/10.1002/mds.25135>
- Bolam, J.P., Smith, Y., 1990. The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res.* 529, 57–78. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90811-o](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90811-o)
- Bolam, J.P., Wainer, B.H., Smith, A.D., 1984. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12, 711–718. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90165-9)
- Bolan, E.A., Kivell, B., Jaligam, V., Oz, M., Jayanthi, L.D., Han, Y., Sen, N., Urizar, E., Gomes, I., Devi, L.A., Ramamoorthy, S., Javitch, J.A., Zapata, A., Shippenberg, T.S., 2007. D2 Receptors Regulate Dopamine Transporter Function via an Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2-Dependent and Phosphoinositide 3 Kinase-Independent Mechanism. *Mol Pharmacol* 71, 1222–1232. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027763>
- Bowery, B., Rothwell, L.A., Seabrook, G.R., 1994. Comparison between the pharmacology of dopamine receptors mediating the inhibition of cell firing in rat brain slices through the

- substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Br J Pharmacol* 112, 873–880. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb13161.x>
- Bradberry, C.W., Roth, R.H., 1989. Cocaine increases extracellular dopamine in rat nucleus accumbens and ventral tegmental area as shown by in vivo microdialysis. *Neurosci. Lett.* 103, 97–102. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90492-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90492-8)
- Braun, M., 1960. RESERPINE AS A THERAPEUTIC AGENT IN SCHIZOPHRENIA. *AJP* 116, 744–745. <https://doi.org/10.1176/ajp.116.8.744>
- Brichta, L., Greengard, P., 2014. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front. Neuroanat.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00152>
- Brimblecombe, K.R., Gracie, C.J., Platt, N.J., Cragg, S.J., 2015. Gating of dopamine transmission by calcium and axonal N-, Q-, T- and L-type voltage-gated calcium channels differs between striatal domains. *J Physiol* 593, 929–946. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.285890>
- Bromek, E., Haduch, A., Daniel, W.A., 2010. The ability of cytochrome P450 2D isoforms to synthesize dopamine in the brain: An in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.* 626, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.062>
- Bromek, E., Haduch, A., Gołombiowska, K., Daniel, W.A., 2011. Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. *J. Neurochem.* 118, 806–815. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07339.x>
- Bruns, D., Jahn, R., 1995. Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377, 62–65. <https://doi.org/10.1038/377062a0>
- Bull, D.R., Palij, P., Sheehan, M.J., Millar, J., Stamford, J.A., Kruk, Z.L., Humphrey, P.P., 1990. Application of fast cyclic voltammetry to measurement of electrically evoked dopamine overflow from brain slices in vitro. *J. Neurosci. Methods* 32, 37–44.
- Burgess, T.L., Kelly, R.B., 1987. Constitutive and Regulated Secretion of Proteins. *Annual Review of Cell Biology* 3, 243–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.03.110187.001331>
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., Südhof, T.C., 2010. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>
- Burrell, M.H., Atcherley, C.W., Heien, M.L., Lipski, J., 2015. A Novel Electrochemical Approach for Prolonged Measurement of Absolute Levels of Extracellular Dopamine in Brain Slices. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1802–1812. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00120>
- Butz, S., Fernandez-Chacon, R., Schmitz, F., Jahn, R., Südhof, T.C., 1999. The Subcellular Localizations of Atypical Synaptotagmins III and VI: SYNAPTOTAGMIN III IS ENRICHED IN SYNAPSES AND SYNAPTIC PLASMA MEMBRANES BUT NOT IN SYNAPTIC VESICLES. *J. Biol. Chem.* 274, 18290–18296. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18290>
- Cagniard, B., Beeler, J.A., Britt, J.P., McGehee, D.S., Marinelli, M., Zhuang, X., 2006. Dopamine scales performance in the absence of new learning. *Neuron* 51, 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.026>
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., Barres, B.A., 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28, 264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>

- Cameron, D.L., Williams, J.T., 1993. Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366, 344–347. <https://doi.org/10.1038/366344a0>
- Campbell, A.D., Kohl, R.R., McBride, W.J., 1996. Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated somatodendritic dopamine release. *Alcohol* 13, 569–574. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(96\)00069-9](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(96)00069-9)
- Cao, P., Maximov, A., Südhof, T.C., 2011. Activity-Dependent IGF-1 Exocytosis Is Controlled by the Ca²⁺-Sensor Synaptotagmin-10. *Cell* 145, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.034>
- Carboni, E., Imperato, A., Perezzi, L., Di Chiara, G., 1989. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28, 653–661. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90012-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90012-2)
- Carlsson, A., 2001. A Paradigm Shift in Brain Research. *Science* 294, 1021–1024. <https://doi.org/10.1126/science.1066969>
- 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, N.A., 1962. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand Suppl* 56, 1–28.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200. <https://doi.org/10.1038/1801200a0>
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., Waldeck, B., 1958. On the Presence of 3-Hydroxytyramine in Brain. *Science* 127, 471–471. <https://doi.org/10.1126/science.127.3296.471>
- Carneiro, A.M., Ingram, S.L., Beaulieu, J.-M., Sweeney, A., Amara, S.G., Thomas, S.M., Caron, M.G., Torres, G.E., 2002. The multiple LIM domain-containing adaptor protein Hic-5 synaptically colocalizes and interacts with the dopamine transporter. *J. Neurosci.* 22, 7045–7054. <https://doi.org/20026740>
- Cartier, E.A., Parra, L.A., Baust, T.B., Quiroz, M., Salazar, G., Faundez, V., Egaña, L., Torres, G.E., 2010. A biochemical and functional protein complex involving dopamine synthesis and transport into synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 285, 1957–1966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054510>
- Carvelli, L., McDonald, P.W., Blakely, R.D., DeFelice, L.J., 2004. Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. *PNAS* 101, 16046–16051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403299101>
- Casey, J.R., Grinstein, S., Orlowski, J., 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 50–61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>
- Cavalcanti, J.R.L.P., Soares, J.G., Oliveira, F.G., Guzen, F.P., Pontes, A.L.B., Sousa, T.B., Cavalcante, J.S., Nascimento, E.S., Cavalcante, J.C., Costa, M.S.M.O., 2014. A cytoarchitectonic and TH-immunohistochemistry characterization of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral field in the rock cavy (*Kerodon rupestris*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 55, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.01.002>
- Cechetto, D.F., Saper, C.B., 1988. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 272, 579–604. <https://doi.org/10.1002/cne.902720410>

- Chakrabarti, S., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., Marks, C.B., Miyake, K., Liston, D.R., Fowler, K.T., Gorelick, F.S., Andrews, N.W., 2003. Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* 162, 543–549. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305131>
- Charara, A., Smith, Y., Parent, A., 1996. Glutamatergic inputs from the pedunculopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *Journal of Comparative Neurology* 364, 254–266. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960108\)364:2<254::AID-CNE5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960108)364:2<254::AID-CNE5>3.0.CO;2-4)
- Chaudhry, F.A., Edwards, R.H., Fonnum, F., 2008. Vesicular Neurotransmitter Transporters as Targets for Endogenous and Exogenous Toxic Substances. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48, 277–301. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141146>
- Chefer, V.I., Thompson, A.C., Zapata, A., Shippenberg, T.S., 2009. Overview of Brain Microdialysis. *Current Protocols in Neuroscience* 47, 7.1.1-7.1.28. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0701s47>
- Chen, B.T., Avshalumov, M.V., Rice, M.E., 2002. Modulation of somatodendritic dopamine release by endogenous H₂O₂: susceptibility in substantia nigra but resistance in VTA. *J. Neurophysiol.* 87, 1155–1158. <https://doi.org/10.1152/jn.00629.2001>
- Chen, B.T., Moran, K.A., Avshalumov, M.V., Rice, M.E., 2006. Limited regulation of somatodendritic dopamine release by voltage-sensitive Ca²⁺ channels contrasted with strong regulation of axonal dopamine release. *Journal of Neurochemistry* 96, 645–655. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03519.x>
- Chen, B.T., Patel, J.C., Moran, K.A., Rice, M.E., 2011. Differential calcium dependence of axonal versus somatodendritic dopamine release, with characteristics of both in the ventral tegmental area. *Front Syst Neurosci* 5, 39. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00039>
- Chen, B.T., Rice, M.E., 2002. Synaptic regulation of somatodendritic dopamine release by glutamate and GABA differs between substantia nigra and ventral tegmental area: Synaptic regulation of somatodendritic DA release. *Journal of Neurochemistry* 81, 158–169. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00811.x>
- Chen, B.T., Rice, M.E., 2001. Novel Ca²⁺ Dependence and Time Course of Somatodendritic Dopamine Release: Substantia Nigra versus Striatum. *J. Neurosci.* 21, 7841–7847. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07841.2001>
- Chen, C., Jonas, P., 2017. Synaptotagmins: That's Why So Many. *Neuron* 94, 694–696. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.011>
- Chen, G., Ewing, A.G., 1995. Multiple classes of catecholamine vesicles observed during exocytosis from the Planorbis cell body. *Brain Res.* 701, 167–174. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00989-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00989-9)
- Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chédotal, A., Tessier-Lavigne, M., 2000. Neuropilin-2 Regulates the Development of Select Cranial and Sensory Nerves and Hippocampal Mossy Fiber Projections. *Neuron* 25, 43–56. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80870-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80870-3)
- Chen, K.C., 2005. Evidence on extracellular dopamine level in rat striatum: implications for the validity of quantitative microdialysis. *J. Neurochem.* 92, 46–58. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02848.x>

- Chen, N.-H., Reith, M.E.A., Quick, M.W., 2004. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* 447, 519–531. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1064-5>
- Chen, R., Daining, C.P., Sun, H., Fraser, R., Stokes, S.L., Leitges, M., Gnegy, M.E., 2013. Protein kinase C β is a modulator of the dopamine D2 autoreceptor-activated trafficking of the dopamine transporter. *Journal of Neurochemistry* 125, 663–672. <https://doi.org/10.1111/jnc.12229>
- Chen, T.K., Luo, G., Ewing, A.G., 1994. Amperometric monitoring of stimulated catecholamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells at the zeptomole level. *Anal. Chem.* 66, 3031–3035. <https://doi.org/10.1021/ac00091a007>
- Cheramy, A., Leviel, V., Glowinski, J., 1981. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289, 537–543. <https://doi.org/10.1038/289537a0>
- Chiodo, L.A., 1992. Dopamine autoreceptor signal transduction in the DA cell body: a “current view.” *Neurochem. Int.* 20 Suppl, 81S-84S.
- Chiodo, L.A., Bannon, M.J., Grace, A.A., Roth, R.H., Bunney, B.S., 1984. Evidence for the absence of impulse-regulating somatodendritic and synthesis-modulating nerve terminal autoreceptors on subpopulations of mesocortical dopamine neurons. *Neuroscience* 12, 1–16. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90133-7)
- Cho, J.R., Chen, X., Kahan, A., Robinson, J.E., Wagenaar, D.A., Gradinaru, V., 2021. Dorsal Raphe Dopamine Neurons Signal Motivational Salience Dependent on Internal State, Expectation, and Behavioral Context. *J. Neurosci.* 41, 2645–2655. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2690-20.2021>
- Cho, J.R., Treweek, J.B., Robinson, J.E., Xiao, C., Bremner, L.R., Greenbaum, A., Gradinaru, V., 2017. Dorsal Raphe Dopamine Neurons Modulate Arousal and Promote Wakefulness by Salient Stimuli. *Neuron* 94, 1205-1219.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.020>
- Choi, Y.M., Kim, S.H., Chung, S., Uhm, D.Y., Park, M.K., 2006. Regional interaction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signals between soma and dendrites through rapid luminal Ca²⁺ diffusion. *J. Neurosci.* 26, 12127–12136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3158-06.2006>
- Chu, Y., Kompoliti, K., Cochran, E.J., Mufson, E.J., Kordower, J.H., 2002. Age-related decreases in Nurr1 immunoreactivity in the human substantia nigra. *Journal of Comparative Neurology* 450, 203–214. <https://doi.org/10.1002/cne.10261>
- Chung, C.Y., Seo, H., Sonntag, K.C., Brooks, A., Lin, L., Isacson, O., 2005. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet* 14, 1709–1725. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi178>
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., Verderio, C., 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278, 1354–1362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209454200>
- Collier, T.J., Lipton, J., Daley, B.F., Palfi, S., Chu, Y., Sortwell, C., Bakay, R.A.E., Sladek, J.R., Kordower, J.H., 2007. Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: Diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism. *Neurobiology of Disease* 26, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.11.013>
- Collingridge, G.L., James, T.A., MacLeod, N.K., 1979. Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra [proceedings]. *J Physiol* 290, 44P.

- Collins, A.L., Wolff, A.R., Saunders, B.T., 2019. Ring of Power: A Band of Peptidergic Midbrain Neurons that Binds Motivation. *Neuron* 103, 364–366. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.022>
- Copeland, B.J., Vogelsberg, V., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1996. Protein kinase C activators decrease dopamine uptake into striatal synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 1527–1532.
- Corkrum, M., Araque, A., 2021. Astrocyte-neuron signaling in the mesolimbic dopamine system: the hidden stars of dopamine signaling. *Neuropsychopharmacol.* 46, 1864–1872. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01090-7>
- Corkrum, M., Covelo, A., Lines, J., Bellocchio, L., Pisansky, M., Loke, K., Quintana, R., Rothwell, P.E., Lujan, R., Marsicano, G., Martin, E.D., Thomas, M.J., Kofuji, P., Araque, A., 2020. Dopamine-Evoked Synaptic Regulation in the Nucleus Accumbens Requires Astrocyte Activity. *Neuron* 105, 1036–1047.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.12.026>
- Cornish, J.L., Nakamura, M., Kalivas, P.W., 2001. Dopamine-Independent Locomotion Following Blockade of N-Methyl-d-aspartate Receptors in the Ventral Tegmental Area. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 226–233.
- Corvaja, N., Doucet, G., Bolam, J.P., 1993. Ultrastructure and synaptic targets of the raphe-nigral projection in the rat. *Neuroscience* 55, 417–427. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90510-m](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90510-m)
- Cotzias, G.C., Van Woert, M.H., Schiffer, L.M., 1967. Aromatic Amino Acids and Modification of Parkinsonism. *New England Journal of Medicine* 276, 374–379. <https://doi.org/10.1056/NEJM196702162760703>
- Courtney, N.A., Mamaligas, A.A., Ford, C.P., 2012. Species Differences in Somatodendritic Dopamine Transmission Determine D2-Autoreceptor-Mediated Inhibition of Ventral Tegmental Area Neuron Firing. *J. Neurosci.* 32, 13520–13528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2745-12.2012>
- Cragg, S., Rice, M.E., Greenfield, S.A., 1997. Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J. Neurophysiol.* 77, 863–873. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.863>
- Cragg, S.J., Greenfield, S.A., 1997. Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J. Neurosci.* 17, 5738–5746.
- Cragg, S.J., Hawkey, C.R., Greenfield, S.A., 1997. Comparison of serotonin and dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area: region and species differences. *J. Neurochem.* 69, 2378–2386. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062378.x>
- Cragg, S.J., Nicholson, C., Kume-Kick, J., Tao, L., Rice, M.E., 2001. Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *J. Neurophysiol.* 85, 1761–1771. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.4.1761>
- Cragg, S.J., Rice, M.E., 2004. DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends in Neurosciences* 27, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.011>
- Craxton, M., Goedert, M., 1995. Synaptotagmin V: a novel synaptotagmin isoform expressed in rat brain. *FEBS Lett.* 361, 196–200. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00176-a](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00176-a)
- Crocker, A.D., 1997. The regulation of motor control: an evaluation of the role of dopamine receptors in the substantia nigra. *Rev Neurosci* 8, 55–76.
- Cuello, A.C., Kelly, J.S., 1977. Electron microscopic autoradiographic localization of [3H]-dopamine in the dendrites of the dopaminergic neurones of the rat substantia nigra in vivo [proceedings]. *Br J Pharmacol* 59, 527P–528P.

- Cumming, P., Ase, A., Laliberté, C., Kuwabara, H., Gjedde, A., 1997. In vivo regulation of DOPA decarboxylase by dopamine receptors in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 1254–1260. <https://doi.org/10.1097/00004647-199711000-00014>
- Curtis, L.B., Doneske, B., Liu, X., Thaller, C., McNew, J.A., Janz, R., 2008. Syntaxin 3b is a t-SNARE specific for ribbon synapses of the retina. *J. Comp. Neurol.* 510, 550–559. <https://doi.org/10.1002/cne.21806>
- Czibener, C., Sherer, N.M., Becker, S.M., Pypaert, M., Hui, E., Chapman, E.R., Mothes, W., Andrews, N.W., 2006. Ca²⁺ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *The Journal of Cell Biology* 174, 997–1007. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605004>
- Dahlstroem, A., Fuxe, K., 1964a. A METHOD FOR THE DEMONSTRATION OF MONOAMINE-CONTAINING NERVE FIBRES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Acta Physiol. Scand.* 60, 293–294. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1964.tb02891.x>
- Dahlstroem, A., Fuxe, K., 1964b. 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*:1-55.
- Dai, H., Shin, O.-H., Machius, M., Tomchick, D.R., Südhof, T.C., Rizo, J., 2004. Structural basis for the evolutionary inactivation of Ca²⁺ binding to synaptotagmin 4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 844–849. <https://doi.org/10.1038/nsmb817>
- Dai, M., Tepper, J.M., 1998. Do silent dopaminergic neurons exist in rat substantia nigra in vivo? *Neuroscience* 85, 1089–1099. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00615-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00615-5)
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., Graybiel, A.M., 1999a. The substantia nigra of the human brainI. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D28K immunohistochemistry. *Brain* 122, 1421–1436. <https://doi.org/10.1093/brain/122.8.1421>
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., Graybiel, A.M., 1999b. The substantia nigra of the human brainII. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson’s disease. *Brain* 122, 1437–1448. <https://doi.org/10.1093/brain/122.8.1437>
- D’Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D.F., Auberson, Y.P., Moss, S.J., Haydon, P.G., 2007. mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1995–2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609408104>
- Daubner, S.C., Le, T., Wang, S., 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
- David Smith, A., Paul Bolam, J., 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends in Neurosciences* 13, 259–265. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90106-K](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90106-K)
- Davletov, B.A., Südhof, T.C., 1993. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J. Biol. Chem.* 268, 26386–26390.
- De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., Borrelli, E., 2009. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.002>
- Dean, C., Dunning, F.M., Liu, H., Bomba-Warczak, E., Martens, H., Bharat, V., Ahmed, S., Chapman, E.R., 2012. Axonal and dendritic synaptotagmin isoforms revealed by a

- pHluorin-syt functional screen. *Mol Biol Cell* 23, 1715–1727. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0707>
- Dean, C., Liu, H., Dunning, F.M., Chang, P.Y., Jackson, M.B., Chapman, E.R., 2009. Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release. *Nat. Neurosci.* 12, 767–776. <https://doi.org/10.1038/nn.2315>
- Dearry, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T., Bates, M.D., Caron, M.G., 1990. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347, 72–76. <https://doi.org/10.1038/347072a0>
- Delignat-Lavaud, B., Ducrot, C., Kouwenhoven, W., Feller, N., Trudeau, L.-É., 2021. Implication of synaptotagmins 4 and 7 in activity-dependent somatodendritic dopamine release. *bioRxiv* 2021.01.25.427983. <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.427983>
- Deng, L., Kaeser, P.S., Xu, W., Südhof, T.C., 2011. RIM Proteins Activate Vesicle Priming by Reversing Autoinhibitory Homodimerization of Munc13. *Neuron* 69, 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.005>
- Descarries, L., Beaudet, A., Watkins, K.C., 1975. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100, 563–588. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90158-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90158-4)
- Descarries, L., Berthelet, F., Garcia, S., Beaudet, A., 1986. Dopaminergic projection from nucleus raphe dorsalis to neostriatum in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 249, 511–520. <https://doi.org/10.1002/cne.902490407>
- Descarries, L., Bosler, O., Berthelet, F., Des Rosiers, M.H., 1980. Dopaminergic nerve endings visualised by high-resolution autoradiography in adult rat neostriatum. *Nature* 284, 620–622. <https://doi.org/10.1038/284620a0>
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Bosler, O., Doucet, G., 1996. Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 375, 167–186. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961111\)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
- Deschamps, A., Colinet, A.-S., Zimmermannova, O., Sychrova, H., Morsomme, P., 2020. A new pH sensor localized in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae* reveals unexpected roles of Vph1p and Stv1p isoforms. *Sci Rep* 10, 1881. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58795-w>
- Deurwaerdère, P.D., Bonhomme, N., Moal, M.L., Spampinato, U., 1995. d-Fenfluramine Increases Striatal Extracellular Dopamine In Vivo Independently of Serotonergic Terminals or Dopamine Uptake Sites. *Journal of Neurochemistry* 65, 1100–1108. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65031100.x>
- Deutch, A.Y., Goldstein, M., Baldino, F., Roth, R.H., 1988. Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 537, 27–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb42095.x>
- Di Chiara, G., Bassareo, V., 2007. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.11.003>
- Diao, J., Su, Z., Lu, X., Yoon, T.-Y., Shin, Y.-K., Ha, T., 2010. Single-Vesicle Fusion Assay Reveals Munc18-1 Binding to the SNARE Core Is Sufficient for Stimulating Membrane Fusion. *ACS Chem Neurosci* 1, 168–174. <https://doi.org/10.1021/cn900034p>
- Diliberto, P.A., Jeffs, R.A., Cubeddu, L.X., 1989. Effects of low extracellular chloride on dopamine release and the dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 248, 644–653.
- Do, C.B., Tung, J.Y., Dorfman, E., Kiefer, A.K., Drabant, E.M., Francke, U., Mountain, J.L., Goldman, S.M., Tanner, C.M., Langston, J.W., Wojcicki, A., Eriksson, N., 2011. Web-Based Genome-Wide Association Study Identifies Two Novel Loci and a Substantial

- Genetic Component for Parkinson's Disease. *PLoS Genet* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002141>
- Dougalis, A.G., Matthews, G.A.C., Bishop, M.W., Brischoux, F., Kobayashi, K., Ungless, M.A., 2012. Functional properties of dopamine neurons and co-expression of vasoactive intestinal polypeptide in the dorsal raphe nucleus and ventro-lateral periaqueductal grey. *European Journal of Neuroscience* 36, 3322–3332. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08255.x>
- Du, C., Wang, Y., Zhang, F., Yan, S., Guan, Y., Gong, X., Zhang, T., Cui, X., Wang, X., Zhang, C.X., 2017. Synaptotagmin-11 inhibits cytokine secretion and phagocytosis in microglia. *Glia* 65, 1656–1667. <https://doi.org/10.1002/glia.23186>
- Duchemin, A.M., Berry, M.D., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2000. Phosphorylation and activation of brain aromatic L-amino acid decarboxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* 75, 725–731. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750725.x>
- Ducrot, C., Bourque, M.-J., Delmas, C.V.L., Racine, A.-S., Bello, D.G., Delignat-Lavaud, B., Lycas, M.D., Fallon, A., Michaud-Tardif, C., Nanni, S.B., Herborg, F., Gether, U., Nanci, A., Takahashi, H., Parent, M., Trudeau, L.-E., 2021. Dopaminergic neurons establish a distinctive axonal arbor with a majority of non-synaptic terminals. *The FASEB Journal* 35, e21791. <https://doi.org/10.1096/fj.202100201RR>
- Dufour, M.A., Woodhouse, A., Goillard, J.-M., 2014. Somatodendritic ion channel expression in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons across postnatal development. *J Neurosci Res* 92, 981–999. <https://doi.org/10.1002/jnr.23382>
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Südhof, T.C., Rizo, J., 2005. A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J.* 24, 2839–2850. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600753>
- Dunkley, P.R., Bobrovskaya, L., Graham, M.E., von Nagy-Felsobuki, E.I., Dickson, P.W., 2004. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J. Neurochem.* 91, 1025–1043. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02797.x>
- Dunn, A.R., Stout, K.A., Ozawa, M., Lohr, K.M., Hoffman, C.A., Bernstein, A.I., Li, Y., Wang, M., Sgobio, C., Sastry, N., Cai, H., Caudle, W.M., Miller, G.W., 2017. Synaptic vesicle glycoprotein 2C (SV2C) modulates dopamine release and is disrupted in Parkinson disease. *PNAS* 114, E2253–E2262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616892114>
- 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.
- Eiden, L.E., Schäfer, M.K.-H., Weihe, E., Schütz, B., 2004. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch.* 447, 636–640. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1100-5>
- Eilam, D., Szechtman, H., 1989. Biphasic effect of D-2 agonist quinpirole on locomotion and movements. *European Journal of Pharmacology* 161, 151–157. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90837-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90837-6)
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, Å., Fortin, G.M., Descarries, L., Trudeau, L.-E., 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience* 12, 204–216. <https://doi.org/10.1038/nrn2969>
- Elverfors, A., Jonason, J., Jonason, G., Nissbrandt, H., 1997. Effects of drugs interfering with sodium channels and calcium channels on the release of endogenous dopamine from

- superfused substantia nigra slices. *Synapse* 26, 359–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199708\)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199708)26:4<359::AID-SYN4>3.0.CO;2-5)
- Elverfors, A., Nissbrandt, H., 1992. Effects of d-amphetamine on dopaminergic neurotransmission; a comparison between the substantia nigra and the striatum. *Neuropharmacology* 31, 661–670. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(92\)90144-e](https://doi.org/10.1016/0028-3908(92)90144-e)
- Elverfors, A., Nissbrandt, H., 1991. Reserpine-insensitive dopamine release in the substantia nigra? *Brain Res.* 557, 5–12. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90109-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90109-9)
- Emborg, M.E., Ma, S.Y., Mufson, E.J., Levey, A.I., Taylor, M.D., Brown, W.D., Holden, J.E., Kordower, J.H., 1998. Age-related declines in nigral neuronal function correlate with motor impairments in rhesus monkeys. *Journal of Comparative Neurology* 401, 253–265. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19981116\)401:2<253::AID-CNE7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981116)401:2<253::AID-CNE7>3.0.CO;2-X)
- Engblom, D., Bilbao, A., Sanchis-Segura, C., Dahan, L., Perreau-Lenz, S., Baland, B., Parkitna, J.R., Luján, R., Halbout, B., Mameli, M., Parlato, R., Sprengel, R., Lüscher, C., Schütz, G., Spanagel, R., 2008. Glutamate Receptors on Dopamine Neurons Control the Persistence of Cocaine Seeking. *Neuron* 59, 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.010>
- Erickson, J.D., Schafer, M.K., Bonner, T.I., Eiden, L.E., Weihe, E., 1996. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5166–5171. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.5166>
- Eriksen, J., Jørgensen, T.N., Gether, U., 2010. Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *Journal of Neurochemistry* 113, 27–41. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06599.x>
- Fahn, S., 2015. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Mov. Disord.* 30, 4–18. <https://doi.org/10.1002/mds.26102>
- FALCK, B., HILLARP, N.-Å., THIEME, G., TORP, A., 1962. FLUORESCENCE OF CATECHOL AMINES AND RELATED COMPOUNDS CONDENSED WITH FORMALDEHYDE. *J Histochem Cytochem.* 10, 348–354. <https://doi.org/10.1177/10.3.348>
- Falkenburger, B.H., Barstow, K.L., Mintz, I.M., 2001. Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293, 2465–2470. <https://doi.org/10.1126/science.1060645>
- Fasano, C., Kortleven, C., Trudeau, L.-E., 2010. Chronic activation of the D2 autoreceptor inhibits both glutamate and dopamine synapse formation and alters the intrinsic properties of mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 32, 1433–1441. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07397.x>
- Fasano, C., Poirier, A., DesGroseillers, L., Trudeau, L.-E., 2008. Chronic activation of the D2 dopamine autoreceptor inhibits synaptogenesis in mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 28, 1480–1490. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06450.x>
- Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R.T., Gordon, J.I., Tessier-Lavigne, M., Weinberg, R.A., 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dec) gene. *Nature* 386, 796–804. <https://doi.org/10.1038/386796a0>
- Fdez, E., Hilfiker, S., 2006. Vesicle pools and synapsins: New insights into old enigmas. *Brain Cell Bio* 35, 107–115. <https://doi.org/10.1007/s11068-007-9013-4>
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., Carmignoto, G., 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.011>

- Ferguson, G.D., Anagnostaras, S.G., Silva, A.J., Herschman, H.R., 2000. Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5598–5603. <https://doi.org/10.1073/pnas.100104597>
- Ferguson, G.D., Wang, H., Herschman, H.R., Storm, D.R., 2004. Altered hippocampal short-term plasticity and associative memory in synaptotagmin IV (–/–) mice. *Hippocampus* 14, 964–974. <https://doi.org/10.1002/hipo.20013>
- Fernandes Xavier, F.G., Doucet, G., Geffard, M., Descarries, L., 1994. Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 59, 77–87. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90100-7)
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S.H., García, J., Matos, M.F., Stevens, C.F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., Südhof, T.C., 2001. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410, 41–49. <https://doi.org/10.1038/35065004>
- Ferreira, J.G.P., Del-Fava, F., Hasue, R.H., Shammah-Lagnado, S.J., 2008. Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area–nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153, 196–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.003>
- Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2004. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24, 722–732. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2859-03.2004>
- Fiorillo, C.D., Williams, J.T., 1998. Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* 394, 78–82. <https://doi.org/10.1038/27919>
- Fitzgerald, P., Dinan, T.G., 2008. Prolactin and dopamine: What is the connection? A Review Article. *J Psychopharmacol* 22, 12–19. <https://doi.org/10.1177/0269216307087148>
- Floresco, S.B., West, A.R., Ash, B., Moore, H., Grace, A.A., 2003. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience* 6, 968. <https://doi.org/10.1038/nn1103>
- Foo, C., Lozada, A., Aljadeff, J., Li, Y., Wang, J.W., Slesinger, P.A., Kleinfeld, D., 2021. Reinforcement learning links spontaneous cortical dopamine impulses to reward. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.069>
- Ford, C.P., 2014. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience* 282, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.025>
- Ford, C.P., Gantz, S.C., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2010. Control of extracellular dopamine at dendrite and axon terminals. *J. Neurosci.* 30, 6975–6983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1020-10.2010>
- Ford, C.P., Phillips, P.E.M., Williams, J.T., 2009. The Time Course of Dopamine Transmission in the Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 29, 13344–13352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3546-09.2009>
- Fortin, G.D., Desrosiers, C.C., Yamaguchi, N., Trudeau, L.E., 2006. Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *J Neurochem* 96, 1740–1749. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03699.x>
- Fox-Loe, A.M., Henderson, B.J., Richards, C.I., 2017. Utilizing pHluorin-tagged Receptors to Monitor Subcellular Localization and Trafficking. *J Vis Exp* 55466. <https://doi.org/10.3791/55466>
- Freneau, R.T., Duncan, G.E., Fornaretto, M.G., Dearry, A., Gingrich, J.A., Breese, G.R., Caron, M.G., 1991. Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in

- cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *PNAS* 88, 3772–3776. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3772>
- Freund, T.F., Powell, J.F., Smith, A.D., 1984. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13, 1189–1215. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90294-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90294-x)
- Fu, Y., Yuan, Y., Halliday, G., Rusznák, Z., Watson, C., Paxinos, G., 2012. A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse. *Brain Struct Funct* 217, 591–612. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0349-2>
- Fukuda, J., Kameyama, M., 1980. Tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in tissue-cultured spinal ganglion neurons from adult mammals. *Brain Research* 182, 191–197. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90844-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90844-6)
- Fukuda, M., 2013. *The Role of Synaptotagmin and Synaptotagmin-Like Protein (Slp) in Regulated Exocytosis*. Landes Bioscience.
- Fukuda, M., 2003a. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of a Novel Class of Synaptotagmin (Syt XIV) Conserved from *Drosophila* to Humans. *J Biochem* 133, 641–649. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg082>
- Fukuda, M., 2003b. Molecular cloning and characterization of human, rat, and mouse synaptotagmin XV. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, 64–71. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00911-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00911-2)
- Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., Saegusa, C., Kim, T., Loh, Y.P., Yamamoto, A., 2003. Nerve growth factor-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 3220–3226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208323200>
- Fukuda, M., Kanno, E., Satoh, M., Saegusa, C., Yamamoto, A., 2004. Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 52677–52684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409241200>
- Fukuda, M., Kojima, T., Mikoshiba, K., 1996. Phospholipid composition dependence of Ca²⁺-dependent phospholipid binding to the C2A domain of synaptotagmin IV. *J. Biol. Chem.* 271, 8430–8434. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8430>
- Fukuda, M., Mikoshiba, K., 2001. The N-terminal cysteine cluster is essential for membrane targeting of B/K protein. *Biochem. J.* 360, 441–448. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600441>
- Fukuda, M., Mikoshiba, K., 1999. A Novel Alternatively Spliced Variant of Synaptotagmin VI Lacking a Transmembrane Domain IMPLICATIONS FOR DISTINCT FUNCTIONS OF THE TWO ISOFORMS. *J. Biol. Chem.* 274, 31428–31434. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31428>
- Fukuda, M., Ogata, Y., Saegusa, C., Kanno, E., Mikoshiba, K., 2002. Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human. *Biochem. J.* 365, 173–180. <https://doi.org/10.1042/BJ20011877>
- Fumagalli, F., Gainetdinov, R.R., Valenzano, K.J., Caron, M.G., 1998. Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J. Neurosci.* 18, 4861–4869.
- Fuxe, K., 1965a. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. 3. THE MONOAMINE NERVE TERMINAL. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 65, 573–596.

- Fuxe, K., 1965b. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. IV. DISTRIBUTION OF MONOAMINE NERVE TERMINALS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL* 247:37+.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Marcoli, M., Borroto-Escuela, D.O., 2015. Volume Transmission in Central Dopamine and Noradrenaline Neurons and Its Astroglial Targets. *Neurochem Res* 40, 2600–2614. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1574-5>
- Gangarossa, G., Espallergues, J., Maily, P., De Bundel, D., de Kerchove d'Exaerde, A., Hervé, D., Girault, J.-A., Valjent, E., Krieger, P., 2013. Spatial distribution of D1R- and D2R-expressing medium-sized spiny neurons differs along the rostro-caudal axis of the mouse dorsal striatum. *Front Neural Circuits* 7, 124. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00124>
- Gantz, S.C., Bunzow, J.R., Williams, J.T., 2013. Spontaneous inhibitory synaptic currents mediated by a G protein-coupled receptor. *Neuron* 78, 807–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.013>
- Gauthier, J., Parent, M., Lévesque, M., Parent, A., 1999. The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Research* 834, 228–232. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01573-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01573-5)
- Geffen, L.B., Jessell, T.M., Cuello, A.C., Iversen, L.L., 1976. Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260, 258. <https://doi.org/10.1038/260258a0>
- Gentet, L.J., Williams, S.R., 2007. Dopamine Gates Action Potential Backpropagation in Midbrain Dopaminergic Neurons. *J. Neurosci.* 27, 1892–1901. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5234-06.2007>
- Gerfen, C.R., Herkenham, M., Thibault, J., 1987. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J. Neurosci.* 7, 3915–3934. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-12-03915.1987>
- Gerhardt, G.A., Cass, W.A., Yi, A., Zhang, Z., Gash, D.M., 2002. Changes in somatodendritic but not terminal dopamine regulation in aged rhesus monkeys. *J Neurochem* 80, 168–177. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00684.x>
- German, D.C., Manaye, K.F., 1993. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): Three-dimensional reconstruction in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 331, 297–309. <https://doi.org/10.1002/cne.903310302>
- German, D.C., Schlusselberg, D.S., Woodward, D.J., 1983. Three-dimensional computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: From mouse to man. *J. Neural Transmission* 57, 243–254. <https://doi.org/10.1007/BF01248996>
- Giger, R.J., Cloutier, J.-F., Sahay, A., Prinjha, R.K., Levensgood, D.V., Moore, S.E., Pickering, S., Simmons, D., Rastan, S., Walsh, F.S., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., Geppert, M., 2000. Neuropilin-2 Is Required In Vivo for Selective Axon Guidance Responses to Secreted Semaphorins. *Neuron* 25, 29–41. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80869-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80869-7)
- Giguère, N., Delignat-Lavaud, B., Herborg, F., Voisin, A., Li, Y., Jacquemet, V., Anand-Srivastava, M., Gether, U., Giros, B., Trudeau, L.-É., 2019. Increased vulnerability of nigral dopamine neurons after expansion of their axonal arborization size through D2 dopamine receptor conditional knockout. *PLOS Genetics* 15, e1008352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008352>
- Gilbert, F., Morissette, M., St-Hilaire, M., Paquet, B., Rouillard, C., Di Paolo, T., Lévesque, D., 2006. Nur77 Gene Knockout Alters Dopamine Neuron Biochemical Activity and Dopamine Turnover. *Biol Psychiatry* 60, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.04.023>

- Giorguieff, M.F., Kemel, M.L., Glowinski, J., 1977. Presynaptic effect of L-glutamic acid on the release of dopamine in rat striatal slices. *Neuroscience Letters* 6, 73–77. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(77\)90068-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(77)90068-4)
- Giros, B., el Mestikawy, S., Bertrand, L., Caron, M.G., 1991. Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett.* 295, 149–154. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81406-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81406-x)
- Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379, 606. <https://doi.org/10.1038/379606a0>
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J., Schwartz, J.C., 1989. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342, 923–926. <https://doi.org/10.1038/342923a0>
- Glavan, G., Zivin, M., 2005. Differential expression of striatal synaptotagmin mRNA isoforms in hemiparkinsonian rats. *Neuroscience* 135, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.050>
- Golden, J.P., Demaro, J.A., Knoten, A., Hoshi, M., Pehek, E., Johnson, E.M., Gereau, R.W., Jain, S., 2013. Dopamine-dependent compensation maintains motor behavior in mice with developmental ablation of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 33, 17095–17107. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0890-13.2013>
- Goldman-Rakic, P.S., Castner, S.A., Svensson, T.H., Siever, L.J., Williams, G.V., 2004. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl.)* 174, 3–16. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1793-y>
- Gonon, F., Buda, M., Cespuglio, R., Jouvét, M., Pujol, J.-F., 1980. In vivo electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats: dopamine or DOPAC? *Nature* 286, 902. <https://doi.org/10.1038/286902a0>
- Gonon, F., Cespuglio, R., Ponchon, J.L., Buda, M., Jouvét, M., Adams, R.N., Pujol, J.F., 1978. [In vivo continuous electrochemical determination of dopamine release in rat neostriatum]. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.* 286, 1203–1206.
- Gonon, Frangols, Cespuglio, R., Ponchon, J.L., Buda, M., Jouvét, M., Adams, R.N., Pujol, J.F., 1978. Mesure électrochimique continue de la libération de dopamine réalisée in vivo dans le néostriatum du rat. *CR Acad. Sci. Paris* 286, 1203–1206.
- González-Rodríguez, P., Zampese, E., Stout, K.A., Guzman, J.N., Ilijic, E., Yang, B., Tkatch, T., Stavarache, M.A., Wokosin, D.L., Gao, L., Kaplitt, M.G., López-Barneo, J., Schumacker, P.T., Surmeier, D.J., 2021. Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature* 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04059-0>
- Goodwill, K.E., Sabatier, C., Stevens, R.C., 1998. Crystal structure of tyrosine hydroxylase with bound cofactor analogue and iron at 2.3 Å resolution: self-hydroxylation of Phe300 and the pterin-binding site. *Biochemistry* 37, 13437–13445. <https://doi.org/10.1021/bi981462g>
- Gorelova, N., Mulholland, P.J., Chandler, L.J., Seamans, J.K., 2012. The Glutamatergic Component of the Mesocortical Pathway Emanating from Different Subregions of the Ventral Midbrain. *Cereb Cortex* 22, 327–336. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr107>
- Grace, A.A., 2016. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nature Reviews Neuroscience* 17, 524–532. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.57>
- Grace, A.A., 1990. Evidence for the functional compartmentalization of spike generating regions of rat midbrain dopamine neurons recorded in vitro. *Brain Res.* 524, 31–41. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90488-w](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90488-w)

- Grace, A.A., Bunney, B.S., 1995. Electrophysiological properties of midbrain dopamine neurons. *Psychopharmacology* 163–177.
- Grace, A.A., Bunney, B.S., 1984a. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J. Neurosci.* 4, 2877–2890. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-11-02877.1984>
- Grace, A.A., Bunney, B.S., 1984b. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J. Neurosci.* 4, 2866–2876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-11-02866.1984>
- Greene, J.G., Dingledine, R., Greenamyre, J.T., 2005. Gene expression profiling of rat midbrain dopamine neurons: implications for selective vulnerability in parkinsonism. *Neurobiology of Disease* 18, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.003>
- Grimm, J., Mueller, A., Hefti, F., Rosenthal, A., 2004. Molecular basis for catecholaminergic neuron diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13891–13896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405340101>
- Groessl, F., Munsch, T., Meis, S., Griessner, J., Kaczanowska, J., Pliota, P., Kargl, D., Badurek, S., Kraitsy, K., Rassoulpour, A., Zuber, J., Lessmann, V., Haubensak, W., 2018. Dorsal tegmental dopamine neurons gate associative learning of fear. *Nat Neurosci* 21, 952–962. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0174-5>
- Groffen, A.J., Martens, S., Arazola, R.D., Cornelisse, L.N., Lozovaya, N., Jong, A.P.H. de, Goriounova, N.A., Habets, R.L.P., Takai, Y., Borst, J.G., Brose, N., McMahon, H.T., Verhage, M., 2010. Doc2b Is a High-Affinity Ca²⁺ Sensor for Spontaneous Neurotransmitter Release. *Science* 327, 1614–1618. <https://doi.org/10.1126/science.1183765>
- Groves, P.M., Linder, J.C., 1983. Dendro-dendritic synapses in substantia nigra: descriptions based on analysis of serial sections. *Exp Brain Res* 49, 209–217. <https://doi.org/10.1007/bf00238581>
- Gundelfinger, E.D., Reissner, C., Garner, C.C., 2016. Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front Synaptic Neurosci* 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2015.00019>
- Gustavsson, N., Lao, Y., Maximov, A., Chuang, J.-C., Kostromina, E., Repa, J.J., Li, C., Radda, G.K., Südhof, T.C., Han, W., 2008. Impaired insulin secretion and glucose intolerance in synaptotagmin-7 null mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3992–3997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711700105>
- Gustavsson, N., Wei, S.-H., Hoang, D.N., Lao, Y., Zhang, Q., Radda, G.K., Rorsman, P., Südhof, T.C., Han, W., 2009. Synaptotagmin-7 is a principal Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-induced glucagon exocytosis in pancreas. *J Physiol* 587, 1169–1178. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.168005>
- Hadjiconstantinou, M., Neff, N.H., 2008. Enhancing aromatic L-amino acid decarboxylase activity: implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* 14, 340–351. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00058.x>
- Hadjiconstantinou, M., Wemlinger, T.A., Sylvania, C.P., Hubble, J.P., Neff, N.H., 1993. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of mouse striatum is modulated via dopamine receptors. *J. Neurochem.* 60, 2175–2180. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03503.x>
- Hajdu, F., Hassler, R., Bak, I.J., 1973. Electron microscopic study of the substantia nigra and the strio-nigral projection in the rat. *Z.Zellforsch* 146, 207–221. <https://doi.org/10.1007/BF00307347>

- Halliday, G.M., Li, Y.W., Blumbergs, P.C., Joh, T.H., Cotton, R.G.H., Howe, P.R.C., Blessing, W.W., Geffen, L.B., 1990. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 27, 373–385. <https://doi.org/10.1002/ana.410270405>
- Hallman, H., Jonsson, G., 1984. Neurochemical studies on central dopamine neurons--regional characterization of dopamine turnover. *Med. Biol.* 62, 198–209.
- Hamilton, N.B., Attwell, D., 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11, 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrn2803>
- Hattori, T., McGeer, P.L., McGeer, E.G., 1979. Dendro axonic neurotransmission. II. Morphological sites for the synthesis, binding and release of neurotransmitters in dopaminergic dendrites in the substantia nigra and cholinergic dendrites in the neostriatum. *Brain Res.* 170, 71–83. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90941-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90941-7)
- Haycock, J.W., 2002. Species differences in the expression of multiple tyrosine hydroxylase protein isoforms. *J. Neurochem.* 81, 947–953. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00881.x>
- Heeringa, M.J., Abercrombie, E.D., 1995. Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *J. Neurochem.* 65, 192–200. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65010192.x>
- Hegarty, S.V., Sullivan, A.M., O'Keefe, G.W., 2013. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology* 379, 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014>
- Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T., Klein, R., 1996. Nuk Controls Pathfinding of Commissural Axons in the Mammalian Central Nervous System. *Cell* 86, 35–46. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80075-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80075-6)
- Henry, J.P., Sagné, C., Bedet, C., Gasnier, B., 1998. The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem. Int.* 32, 227–246.
- Hepp, R., Perraut, M., Chasserot-Golaz, S., Galli, T., Aunis, D., Langley, K., Grant, N.J., 1999. Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia* 27, 181–187. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199908\)27:2<181::aid-glia8>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199908)27:2<181::aid-glia8>3.0.co;2-9)
- Hervé, D., Lévi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J.P., Glowinski, J., Girault, J.A., 1993. G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J. Neurosci.* 13, 2237–2248.
- Hervé, D., Pickel, V.M., Joh, T.H., Beaudet, A., 1987. Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Research* 435, 71–83. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91588-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91588-5)
- Hikima, T., Lee, C.R., Witkovsky, P., Chesler, J., Ichtchenko, K., Rice, M.E., 2021. Activity-dependent somatodendritic dopamine release in the substantia nigra autoinhibits the releasing neuron. *Cell Rep* 35, 108951. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108951>
- Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y., 1998. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 838–843. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9232>
- Hirokawa, N., Niwa, S., Tanaka, Y., 2010. Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron* 68, 610–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.039>
- Hirsch, E., Graybiel, A.M., Agid, Y.A., 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345. <https://doi.org/10.1038/334345a0>

- Hoffman, A.F., Gerhardt, G.A., 1999. Differences in pharmacological properties of dopamine release between the substantia nigra and striatum: an in vivo electrochemical study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 455–463.
- Hoffman, A.F., Lupica, C.R., Gerhardt, G.A., 1998. Dopamine Transporter Activity in the Substantia Nigra and Striatum Assessed by High-Speed Chronoamperometric Recordings in Brain Slices. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 487–496.
- Hoffman, A.F., van Horne, C.G., Eken, S., Hoffer, B.J., Gerhardt, G.A., 1997. In vivo microdialysis studies on somatodendritic dopamine release in the rat substantia nigra: effects of unilateral 6-OHDA lesions and GDNF. *Exp. Neurol.* 147, 130–141. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6571>
- Hökfelt, T., Johansson, O., Fuxe, K., Goldstein, M., Park, D., 1977. Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain II. Tyrosine hydroxylase in the telencephalon. *Med. Biol.* 55, 21–40.
- Hökfelt, T., Johansson, O., Fuxe, K., Goldstein, M., Park, D., 1976. Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon. *Med. Biol.* 54, 427–453.
- Hökfelt, T., Johansson, O., Goldstein, M., 1984. Chemical anatomy of the brain. *Science* 225, 1326–1334. <https://doi.org/10.1126/science.6147896>
- Hook, P.W., McClymont, S.A., Cannon, G.H., Law, W.D., Morton, A.J., Goff, L.A., McCallion, A.S., 2018. Single-Cell RNA-Seq of Mouse Dopaminergic Neurons Informs Candidate Gene Selection for Sporadic Parkinson Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 102, 427–446. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.001>
- Hosaka, M., Hammer, R.E., Südhof, T.C., 1999. A Phospho-Switch Controls the Dynamic Association of Synapsins with Synaptic Vesicles. *Neuron* 24, 377–387. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80851-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80851-X)
- Howe, M.W., Dombeck, D.A., 2016. Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. *Nature* 535, 505–510. <https://doi.org/10.1038/nature18942>
- Hows, M.E.P., Lacroix, L., Heidbreder, C., Organ, A.J., Shah, A.J., 2004. High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological samples. *J. Neurosci. Methods* 138, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.03.021>
- Hu, Z.-T., Chen, M.-R., Ping, Z., Dong, Y.-M., Zhang, R.-Y., Xu, T., Wu, Z.-X., 2008. Synaptotagmin IV regulates dense core vesicle (DCV) release in LβT2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371, 781–786. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.174>
- Huang, H.-P., Wang, S.-R., Yao, W., Zhang, C., Zhou, Y., Chen, X.-W., Zhang, B., Xiong, W., Wang, L.-Y., Zheng, L.-H., Landry, M., Hökfelt, T., Xu, Z.-Q.D., Zhou, Z., 2007. Long latency of evoked quantal transmitter release from somata of locus coeruleus neurons in rat pontine slices. *PNAS* 104, 1401–1406. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608897104>
- Huang, Q., Zhou, D., Chase, K., Gusella, J.F., Aronin, N., DiFiglia, M., 1992. Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11988–11992. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11988>
- Hui, E., Bai, J., Wang, P., Sugimori, M., Llinas, R.R., Chapman, E.R., 2005. Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5210–5214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500941102>

- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J., Poulain, B., 2000. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release**This paper is dedicated to the memory of Heiner Niemann. *Biochimie* 82, 427–446. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)00216-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)00216-9)
- Huntley, G.W., Morrison, J.H., Prikhozhan, A., Sealfon, S.C., 1992. Localization of multiple dopamine receptor subtype mRNAs in human and monkey motor cortex and striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 15, 181–188.
- Hurd, Y.L., Pristupa, Z.B., Herman, M.M., Niznik, H.B., Kleinman, J.E., 1994. The dopamine transporter and dopamine D2 receptor messenger RNAs are differentially expressed in limbic- and motor-related subpopulations of human mesencephalic neurons. *Neuroscience* 63, 357–362. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90535-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90535-5)
- Hurd, Y.L., Ungerstedt, U., 1989. Influence of a carrier transport process on in vivo release and metabolism of dopamine: Dependence of extracellular Na⁺. *Life Sciences* 45, 283–293. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90137-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90137-9)
- Huynh, D.P., Scoles, D.R., Nguyen, D., Pulst, S.M., 2003. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2587–2597. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg269>
- Ibata, K., Fukuda, M., Hamada, T., Kabayama, H., Mikoshiba, K., 2000. Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites. *J. Neurochem.* 74, 518–526. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740518.x>
- Ibata, K., Hashikawa, T., Tsuboi, T., Terakawa, S., Liang, F., Mizutani, A., Fukuda, M., Mikoshiba, K., 2002. Non-polarized distribution of synaptotagmin IV in neurons: evidence that synaptotagmin IV is not a synaptic vesicle protein. *Neuroscience Research* 43, 401–406. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00066-4)
- Ikemoto, S., 2007. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56, 27–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.004>
- Inagaki, H.K., Ben-Tabou de-Leon, S., Wong, A.M., Jagadish, S., Ishimoto, H., Barnea, G., Kitamoto, T., Axel, R., Anderson, D.J., 2012. Visualizing Neuromodulation In Vivo: TANGO-Mapping of Dopamine Signaling Reveals Appetite Control of Sugar Sensing. *Cell* 148, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.022>
- Inoue, S., Imamura, A., Okazaki, Y., Yokota, H., Arai, M., Hayashi, N., Furukawa, A., Itokawa, M., Oishi, M., 2007. Synaptotagmin XI as a candidate gene for susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144B, 332–340. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30465>
- International Parkinson Disease Genomics Consortium, Nalls, M.A., Plagnol, V., Hernandez, D.G., Sharma, M., Sheerin, U.-M., Saad, M., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Lesage, S., Sveinbjörnsdóttir, S., Stefánsson, K., Martinez, M., Hardy, J., Heutink, P., Brice, A., Gasser, T., Singleton, A.B., Wood, N.W., 2011. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson’s disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377, 641–649. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62345-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62345-8)
- Iravani, M.M., Muscat, R., Kruk, Z.L., 1996. Comparison of somatodendritic and axon terminal dopamine release in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Neuroscience* 70, 1025–1037. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00396-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00396-7)
- Ischiropoulos, H., 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, 776–783. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00814-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00814-3)

- Islam, S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., Tanaka, H., 2009. Draxin, a Repulsive Guidance Protein for Spinal Cord and Forebrain Commissures. *Science* 323, 388–393. <https://doi.org/10.1126/science.1165187>
- Ito, A., Shinmyo, Y., Abe, T., Oshima, N., Tanaka, H., Ohta, K., 2010. Tsukushi is required for anterior commissure formation in mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402, 813–818. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.127>
- Itzhak, Y., Martin, J.L., 1999. Effects of cocaine, nicotine, dizocipiline and alcohol on mice locomotor activity: cocaine–alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. *Brain Research* 818, 204–211. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01260-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01260-8)
- Iversen, S.D., Iversen, L.L., 2007. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.002>
- Jackman, S.L., Turecek, J., Belinsky, J.E., Regehr, W.G., 2016. The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature* 529, 88–91. <https://doi.org/10.1038/nature16507>
- Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2007. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nature Protocols* 2, 141–151. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.342>
- Jacocks, H.M., Cox, B.M., 1992. Serotonin-stimulated release of [3H]dopamine via reversal of the dopamine transporter in rat striatum and nucleus accumbens: a comparison with release elicited by potassium, N-methyl-D-aspartic acid, glutamic acid and D-amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 262, 356–364.
- Jaffe, E.H., Marty, A., Schulte, A., Chow, R.H., 1998. Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J. Neurosci.* 18, 3548–3553.
- Jaiswal, J.K., Chakrabarti, S., Andrews, N.W., Simon, S.M., 2004. Synaptotagmin VII Restricts Fusion Pore Expansion during Lysosomal Exocytosis. *PLoS Biol* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020233>
- John, C.E., Budygin, E.A., Mateo, Y., Jones, S.R., 2006. Neurochemical characterization of the release and uptake of dopamine in ventral tegmental area and serotonin in substantia nigra of the mouse. *Journal of Neurochemistry* 96, 267–282. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03557.x>
- Johnson, S.L., Franz, C., Kuhn, S., Furness, D.N., Rüttiger, L., Münkner, S., Rivolta, M.N., Seward, E.P., Herschman, H.R., Engel, J., Knipper, M., Marcotti, W., 2010. Synaptotagmin IV determines the linear Ca²⁺ dependence of vesicle fusion at auditory ribbon synapses. *Nat. Neurosci.* 13, 45–52. <https://doi.org/10.1038/nn.2456>
- Jomphe, C., Tiberi, M., Trudeau, L.-E., 2006. Expression of D2 receptor isoforms in cultured neurons reveals equipotent autoreceptor function. *Neuropharmacology* 50, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.11.010>
- Jones, B.E., Moore, R.Y., 1977. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Research* 127, 23–53. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90378-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90378-X)
- Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1998. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J. Neurosci.* 18, 1979–1986.
- Jorquera, R.A., Huntwork-Rodriguez, S., Akbergenova, Y., Cho, R.W., Littleton, J.T., 2012. Complexin controls spontaneous and evoked neurotransmitter release by regulating the

- timing and properties of synaptotagmin activity. *J. Neurosci.* 32, 18234–18245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3212-12.2012>
- Joseph, J.D., Wang, Y.-M., Miles, P.R., Budygin, E.A., Picetti, R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Wightman, R.M., 2002. Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D3 receptors. *Neuroscience* 112, 39–49. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00067-2)
- Joshua, M., Adler, A., Bergman, H., 2009. The dynamics of dopamine in control of motor behavior. *Current Opinion in Neurobiology, Motor systems • Neurology of behaviour* 19, 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.10.001>
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., Volterra, A., 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10, 331–339. <https://doi.org/10.1038/nn1849>
- Juraska, J.M., Wilson, C.J., Groves, P.M., 1977. The substantia nigra of the rat: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 172, 585–600. <https://doi.org/10.1002/cne.901720403>
- Kabayama, H., Tokushige, N., Takeuchi, M., Kabayama, M., Fukuda, M., Mikoshiba, K., 2017. Parkin promotes proteasomal degradation of synaptotagmin IV by accelerating polyubiquitination. *Molecular and Cellular Neuroscience* 80, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.02.006>
- Kaesler, P.S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J., Südhof, T.C., 2011. RIM proteins tether Ca²⁺-channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144, 282–295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.029>
- Kalivas, P.W., Bourdelais, A., Abhold, R., Abbott, L., 1989. Somatodendritic release of endogenous dopamine: in vivo dialysis in the A10 dopamine region. *Neurosci. Lett.* 100, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90687-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90687-3)
- Kalivas, P.W., Duffy, P., 1991. A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *J. Neurochem.* 56, 961–967. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02015.x>
- Kalivas, P.W., Widerlöv, E., Stanley, D., Breese, G., Prange, A.J., 1983. Enkephalin action on the mesolimbic system: a dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 227, 229–237.
- Kanaan, N.M., Kordower, J.H., Collier, T.J., 2007. Age-related accumulation of Marinesco bodies and lipofuscin in rhesus monkey midbrain dopamine neurons: Relevance to selective neuronal vulnerability. *Journal of Comparative Neurology* 502, 683–700. <https://doi.org/10.1002/cne.21333>
- KATZ, B., 1969. The release of neural transmitter substances. Liverpool University Press 5–39.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences* 18, 527–535. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98374-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98374-8)
- Kebabian, J.W., Calne, D.B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93–96. <https://doi.org/10.1038/277093a0>
- Keefe, K.A., Zigmond, M.J., Abercrombie, E.D., 1993. In vivo regulation of extracellular dopamine in the neostriatum: influence of impulse activity and local excitatory amino acids. *J. Neural Transmission* 91, 223–240. <https://doi.org/10.1007/BF01245233>
- Kelly, E., Jenner, P., Marsden, C.D., 1985. Evidence that [³H]Dopamine Is Taken Up and Released from Nondopaminergic Nerve Terminals in the Rat Substantia Nigra In Vitro. *Journal of Neurochemistry* 45, 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb05485.x>

- Kemp Janet M., Powell Thomas Philip Stroud, Harris Geoffrey Wingfield, 1971. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 262, 383–401. <https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0102>
- Kerr, A.M., Reisinger, E., Jonas, P., 2008. Differential dependence of phasic transmitter release on synaptotagmin 1 at GABAergic and glutamatergic hippocampal synapses. *PNAS* 105, 15581–15586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800621105>
- Kim, J.-I., Ganesan, S., Luo, S.X., Wu, Y.-W., Park, E., Huang, E.J., Chen, L., Ding, J.B., 2015. Aldehyde Dehydrogenase 1a1 Mediates a GABA Synthesis Pathway in Midbrain Dopaminergic Neurons. *Science* 350, 102–106. <https://doi.org/10.1126/science.aac4690>
- Kim, Y., Park, M.K., Chung, S., 2008. Voltage-operated Ca²⁺ channels regulate dopamine release from somata of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.099>
- Kissiwaa, S.A., Lebowitz, J.J., Engeln, K.A., Bowman, A.M., Williams, J.T., Jackman, S.L., 2021. Synaptotagmin-7 enhances phasic dopamine release. <https://doi.org/10.1101/2021.10.17.464710>
- Klein, M.O., Battagello, D.S., Cardoso, A.R., Hauser, D.N., Bittencourt, J.C., Correa, R.G., 2019. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol* 39, 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
- Klingler, E., Martin, P.-M., Garcia, M., Moreau-Fauvarque, C., Falk, J., Chareyre, F., Giovannini, M., Chédotal, A., Girault, J.-A., Goutebroze, L., 2015. The cytoskeleton-associated protein SCHIP1 is involved in axon guidance, and is required for piriform cortex and anterior commissure development. *Development* 142, 2026–2036. <https://doi.org/10.1242/dev.119248>
- Kobayashi, K., Kaneda, N., Ichinose, H., Kishi, F., Nakazawa, A., Kurosawa, Y., Fujita, K., Nagatsu, T., 1988. Structure of the human tyrosine hydroxylase gene: alternative splicing from a single gene accounts for generation of four mRNA types. *J. Biochem.* 103, 907–912. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122386>
- Koga, E., Momiyama, T., 2000. Presynaptic dopamine D2-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 523 Pt 1, 163–173. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00163.x>
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Krashia, P., Martini, A., Nobili, A., Aversa, D., D'Amelio, M., Berretta, N., Guatteo, E., Mercuri, N.B., 2017. On the properties of identified dopaminergic neurons in the mouse substantia nigra and ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 45, 92–105. <https://doi.org/10.1111/ejn.13364>
- Kullander, K., Croll, S.D., Zimmer, M., Pan, L., McClain, J., Hughes, V., Zabski, S., DeChiara, T.M., Klein, R., Yancopoulos, G.D., Gale, N.W., 2001. Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev.* 15, 877–888. <https://doi.org/10.1101/gad.868901>
- Kumar, G.K., Kim, D.-K., Lee, M.-S., Ramachandran, R., Prabhakar, N.R., 2003. Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: involvement of serine phosphorylation. *J. Appl. Physiol.* 95, 536–544. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00186.2003>
- Kumer, S.C., Vrana, K.E., 1996. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochem.* 67, 443–462. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67020443.x>

- Kwon, O.J., Gainer, H., Wray, S., Chin, H., 1996. Identification of a novel protein containing two C2 domains selectively expressed in the rat brain and kidney. *FEBS Lett.* 378, 135–139. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01430-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01430-6)
- Lacey, M.G., Mercuri, N.B., North, R.A., 1988. On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 401, 437–453. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017171>
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., Roeper, J., 2008. Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron* 57, 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.022>
- Lammel, S., Ion, D.I., Roeper, J., Malenka, R.C., 2011. Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* 70, 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.025>
- Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K., Deisseroth, K., Malenka, R.C., 2012. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Lavoie, B., Parent, A., 1990. Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 299, 1–16. <https://doi.org/10.1002/cne.902990102>
- Le Moine, C., Bloch, B., 1995. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 355, 418–426. <https://doi.org/10.1002/cne.903550308>
- Lebowitz, J.J., Trinkle, M., Bunzow, J.R., Balcita-Pedicino, J.J., Hetelekides, S., Robinson, B., De La Torre, S., Aicher, S.A., Sesack, S.R., Williams, J.T., 2021. Subcellular localization of D2 receptors in the murine substantia nigra. *Brain Struct Funct.* <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02432-3>
- Lee, D., Creed, M., Jung, K., Stefanelli, T., Wendler, D.J., Oh, W.C., Mignocchi, N.L., Lüscher, C., Kwon, H.-B., 2017. Temporally precise labeling and control of neuromodulatory circuits in the mammalian brain. *Nat. Methods* 14, 495–503. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4234>
- Lee, F.J., Liu, F., Pristupa, Z.B., Niznik, H.B., 2001. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J.* 15, 916–926. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0334com>
- Lee, F.J., Pei, L., Moczynska, A., Vukusic, B., Fletcher, P.J., Liu, F., 2007. Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *The EMBO Journal* 26, 2127–2136. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601656>
- Lerner, T.N., Shilyansky, C., Davidson, T.J., Evans, K.E., Beier, K.T., Zalocusky, K.A., Crow, A.K., Malenka, R.C., Luo, L., Tomer, R., Deisseroth, K., 2015. Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell* 162, 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.014>
- Lester, J., Fink, S., Aronin, N., DiFiglia, M., 1993. Colocalization of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in striatal neurons. *Brain Res* 621, 106–110. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90303-5)
- Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Near, J.A., Wightman, R.M., 1990. Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *J. Biol. Chem.* 265, 14736–14737.

- Levey, A.I., Hersch, S.M., Rye, D.B., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., Kitt, C.A., Price, D.L., Maggio, R., Brann, M.R., Ciliax, B.J., 1993. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8861–8865. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8861>
- Leviel, V., 2001. The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem. Int.* 38, 83–106.
- Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S., 1965. Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 148, 1–8.
- Lewis, D.A., Melchitzky, D.S., Haycock, J.W., 1993. Four isoforms of tyrosine hydroxylase are expressed in human brain. *Neuroscience* 54, 477–492.
- Lewis, D.A., Sesack, S.R., Levey, A.I., Rosenberg, D.R., 1998. Dopamine axons in primate prefrontal cortex: specificity of distribution, synaptic targets, and development. *Adv. Pharmacol.* 42, 703–706.
- L'hirondel, M., Chéramy, A., Godeheu, G., Artaud, F., Saiardi, A., Borrelli, E., Glowinski, J., 1998. Lack of autoreceptor-mediated inhibitory control of dopamine release in striatal synaptosomes of D2 receptor-deficient mice. *Brain Res* 792, 253–262. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00146-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00146-2)
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J.Z., Anderson, R.G., Brose, N., Südhof, T.C., 1995. Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375, 594–599. <https://doi.org/10.1038/375594a0>
- Li, J., Xiao, Y., Zhou, W., Wu, Z., Zhang, R., Xu, T., 2009. Silence of Synaptotagmin VII inhibits release of dense core vesicles in PC12 cells. *Sci. China, C, Life Sci.* 52, 1156–1163. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0160-y>
- Li, Y.C., Chanaday, N.L., Xu, W., Kavalali, E.T., 2017. Synaptotagmin-1- and Synaptotagmin-7-Dependent Fusion Mechanisms Target Synaptic Vesicles to Kinetically Distinct Endocytic Pathways. *Neuron* 93, 616-631.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.010>
- Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E., Gershon, M.D., 2006. Physiological Modulation of Intestinal Motility by Enteric Dopaminergic Neurons and the D2 Receptor: Analysis of Dopamine Receptor Expression, Location, Development, and Function in Wild-Type and Knock-Out Mice. *J. Neurosci.* 26, 2798–2807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4720-05.2006>
- Liang, C.L., Sinton, C.M., Sonsalla, P.K., German, D.C., 1996. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D28k exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration. *Neurodegeneration* 5, 313–318.
- Lin, R., Liang, J., Wang, R., Yan, T., Zhou, Y., Liu, Y., Feng, Q., Sun, F., Li, Y., Li, A., Gong, H., Luo, M., 2020. The Raphe Dopamine System Controls the Expression of Incentive Memory. *Neuron* 106, 498-514.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.009>
- Lindgren, N., Xu, Z.-Q.D., Herrera-Marschitz, M., Haycock, J., Hökfelt, T., Fisone, G., 2001. Dopamine D2 receptors regulate tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser40 in rat striatum. *European Journal of Neuroscience* 13, 773–780. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2000.01443.x>
- Lindvall, O., Björklund, A., 1974. The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl* 412, 1–48.

- Littleton, J.T., Serano, T.L., Rubin, G.M., Ganetzky, B., Chapman, E.R., 1999. Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV. *Nature* 400, 757–760. <https://doi.org/10.1038/23462>
- Liu, C., Kaeser, P.S., 2019. Mechanisms and regulation of dopamine release. *Current Opinion in Neurobiology* 57, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.01.001>
- Liu, C., Kershberg, L., Wang, J., Schneeberger, S., Kaeser, P.S., 2018. Dopamine Secretion Is Mediated by Sparse Active Zone-like Release Sites. *Cell* 172, 706–718.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.008>
- Liu, H., Bai, H., Hui, E., Yang, L., Evans, C.S., Wang, Z., Kwon, S.E., Chapman, E.R., 2014. Synaptotagmin 7 functions as a Ca²⁺-sensor for synaptic vesicle replenishment. *eLife* 3, e01524. <https://doi.org/10.7554/eLife.01524>
- Liu, W., Thielen, R.J., Rodd, Z.A., McBride, W.J., 2006. Activation of serotonin-3 receptors increases dopamine release within the ventral tegmental area of Wistar and alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* 40, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2007.01.001>
- Liu, Y., Schweitzer, E.S., Nirenberg, M.J., Pickel, V.M., Evans, C.J., Edwards, R.H., 1994. Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells. *The Journal of Cell Biology* 127, 1419–1433. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.5.1419>
- Llinás, R., Greenfield, S.A., Jahnsen, H., 1984. Electrophysiology of pars compacta cells in the in vitro substantia nigra—a possible mechanism for dendritic release. *Brain Research* 294, 127–132. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91316-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91316-7)
- Lonart, G., Zigmond, M.J., 1991. High glutamate concentrations evoke Ca(++)-independent dopamine release from striatal slices: a possible role of reverse dopamine transport. *J Pharmacol Exp Ther* 256, 1132–1138.
- Ludwig, M. (Ed.), 2005. *Dendritic neurotransmitter release*. Springer, New York, NY.
- Ludwig, M., Sabatier, N., Bull, P.M., Landgraf, R., Dayanithi, G., Leng, G., 2002. Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* 418, 85–89. <https://doi.org/10.1038/nature00822>
- Luo, F., Südhof, T.C., 2017. Synaptotagmin-7-Mediated Asynchronous Release Boosts High-Fidelity Synchronous Transmission at a Central Synapse. *Neuron* 94, 826–839.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.020>
- Lynd-Balta, E., Haber, S.N., 1994. The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: Sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience* 59, 625–640. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90182-1)
- MacDougall, D.D., Lin, Z., Chon, N.L., Jackman, S.L., Lin, H., Knight, J.D., Anantharam, A., 2018. The high-affinity calcium sensor synaptotagmin-7 serves multiple roles in regulated exocytosis. *The Journal of General Physiology* 150, 783–807. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711944>
- Machado, H.B., Liu, W., Vician, L.J., Herschman, H.R., 2004. Synaptotagmin IV overexpression inhibits depolarization-induced exocytosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 76, 334–341. <https://doi.org/10.1002/jnr.20072>
- Maienschein, V., Marxen, M., Volknandt, W., Zimmermann, H., 1999. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* 26, 233–244. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199905\)26:3<233::aid-glia5>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199905)26:3<233::aid-glia5>3.0.co;2-2)
- Marcott, P.F., Mamaligas, A.A., Ford, C.P., 2014a. Phasic Dopamine Release Drives Rapid Activation of Striatal D2-Receptors. *Neuron* 84, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.058>

- Marcott, P.F., Mamaligas, A.A., Ford, C.P., 2014b. Phasic Dopamine Release Drives Rapid Activation of Striatal D2-Receptors. *Neuron* 84, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.058>
- Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K., Andrews, N.W., 2000. Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 148, 1141–1149. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.6.1141>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K.C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., Kaneko, T., 2009. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *J. Neurosci.* 29, 444–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>
- Matsumoto, M., Hikosaka, O., 2009. How do dopamine neurons represent positive and negative motivational events? *Nature* 459, 837–841. <https://doi.org/10.1038/nature08028>
- Maximov, A., Lao, Y., Li, H., Chen, X., Rizo, J., Sørensen, J.B., Südhof, T.C., 2008. Genetic analysis of synaptotagmin-7 function in synaptic vesicle exocytosis. *PNAS* 105, 3986–3991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712372105>
- Maximov, A., Shin, O.-H., Liu, X., Südhof, T.C., 2007. Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release. *J Cell Biol* 176, 113–124. <https://doi.org/10.1083/jcb.200607021>
- McCormack, A.L., Monte, D.A.D., Delfani, K., Irwin, I., DeLanney, L.E., Langston, W.J., Janson, A.M., 2004. Aging of the nigrostriatal system in the squirrel monkey. *Journal of Comparative Neurology* 471, 387–395. <https://doi.org/10.1002/cne.20036>
- McRitchie, D.A., Cartwright, H., Pond, S.M., van der Schyf, C.J., Castagnoli, N., van der Nest, D.G., Halliday, G.M., 1998. The midbrain dopaminergic cell groups in the baboon *papio ursinus*. *Brain Research Bulletin* 47, 611–623. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(98\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(98)00128-2)
- McRitchie, D.A., Cartwright, H.R., Halliday, G.M., 1997. Specific A10 Dopaminergic Nuclei in the Midbrain Degenerate in Parkinson's Disease. *Experimental Neurology* 144, 202–213. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6418>
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Grandy, D.K., Damask, S.P., Civelli, O., Watson, S.J., 1992. Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci. Lett.* 145, 209–212. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90024-2)
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Healy, D.J., Kuehn, R., Zhou, Q.Y., Bunzow, J.R., Akil, H., Civelli, O., Watson, S.J., 1991. Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5, 231–242.
- Mebel, D.M., Wong, J.C.Y., Dong, Y.J., Borgland, S.L., 2012. Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. *Eur J Neurosci* 36, 2336–2346. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08168.x>
- Meiser, J., Weindl, D., Hiller, K., 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* 11, 34. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-34>
- Mejías-Aponte, C.A., Drouin, C., Aston-Jones, G., 2009. Adrenergic and Noradrenergic Innervation of the Midbrain Ventral Tegmental Area and Retrorubral Field: Prominent Inputs from Medullary Homeostatic Centers. *J Neurosci* 29, 3613–3626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4632-08.2009>
- Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Fasano, C., Kortleven, C., Trudeau, L.-E., 2011. Somatodendritic Dopamine Release Requires Synaptotagmin 4 and 7 and the Participation of Voltage-gated Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* 286, 23928–23937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.218032>

- Mercer, L., del Fiacco, M., Cuello, A.C., 1979. The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurones. *Experientia* 35, 101–103. <https://doi.org/10.1007/bf01917903>
- Mercuri, N.B., Bernardi, G., 2005. The ‘magic’ of l-dopa: why is it the gold standard Parkinson’s disease therapy? *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.05.002>
- Mercuri, N.B., Bonci, A., Calabresi, P., Stefani, A., Bernardi, G., 1995. Properties of the Hyperpolarization-activated Cation Current I_h in Rat Midbrain Dopaminergic Neurons. *European Journal of Neuroscience* 7, 462–469. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00342.x>
- Meyer-Lindenberg, A., Miletich, R.S., Kohn, P.D., Esposito, G., Carson, R.E., Quarantelli, M., Weinberger, D.R., Berman, K.F., 2002. Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nature Neuroscience* 5, 267. <https://doi.org/10.1038/mn804>
- Miesenböck, G., De Angelis, D.A., Rothman, J.E., 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192–195. <https://doi.org/10.1038/28190>
- Mishra, A., Singh, S., Shukla, S., 2018. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson’s disease. *J Exp Neurosci* 12. <https://doi.org/10.1177/1179069518779829>
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 78, 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Mittelsteadt, T., Seifert, G., Álvarez-Barón, E., Steinhäuser, C., Becker, A.J., Schoch, S., 2009. Differential mRNA expression patterns of the synaptotagmin gene family in the rodent brain. *Journal of Comparative Neurology* 512, 514–528. <https://doi.org/10.1002/cne.21908>
- Miyazaki, T., Lacey, M.G., 1998. Presynaptic inhibition by dopamine of a discrete component of GABA release in rat substantia nigra pars reticulata. *J. Physiol. (Lond.)* 513 (Pt 3), 805–817. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.805ba.x>
- Moldrich, R.X., Gobijs, I., Pollak, T., Zhang, J., Ren, T., Brown, L., Mori, S., de Juan, C., Britanova, O., Tarabykin, V., Richards, L.J., 2010. Molecular regulation of the developing commissural plate. *J Comp Neurol* 518, 3645–3661. <https://doi.org/10.1002/cne.22445>
- Montagu, K.A., 1957. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180, 244–245. <https://doi.org/10.1038/180244a0>
- Monterrat, C., Boal, F., Grise, F., Hémar, A., Lang, J., 2006. Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.11.008>
- Mori, Y., Higuchi, M., Hirabayashi, Y., Fukuda, M., Gotoh, Y., 2008. JNK phosphorylates synaptotagmin-4 and enhances Ca²⁺-evoked release. *EMBO J.* 27, 76–87. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601935>
- Morikawa, H., Khodakhah, K., Williams, J.T., 2003. Two intracellular pathways mediate metabotropic glutamate receptor-induced Ca²⁺ mobilization in dopamine neurons. *J. Neurosci.* 23, 149–157.
- Moukhles, H., Bosler, O., Bolam, J.P., Vallée, A., Umbriaco, D., Geffard, M., Doucet, G., 1997. Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin

- terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience* 76, 1159–1171. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00452-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00452-6)
- Muller, A., Joseph, V., Slesinger, P.A., Kleinfeld, D., 2014. Cell-based reporters reveal in vivo dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex. *Nat. Methods* 11, 1245–1252. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3151>
- Muthane, U., Ramsay, K.A., Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., Fernando, S., Ferreira, M., Przedborski, S., 1994. Differences in Nigral Neuron Number and Sensitivity to 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 Mice. *Experimental Neurology* 126, 195–204. <https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1058>
- Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S., 1964. Tyrosine Hydroxylase THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS. *J. Biol. Chem.* 239, 2910–2917.
- Nair, A.G., Gutierrez-Arenas, O., Eriksson, O., Vincent, P., Hellgren Kotaleski, J., 2015. Sensing Positive versus Negative Reward Signals through Adenylyl Cyclase-Coupled GPCRs in Direct and Indirect Pathway Striatal Medium Spiny Neurons. *J Neurosci* 35, 14017–14030. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0730-15.2015>
- Nair-Roberts, R.G., Chatelain-Badie, S.D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J.P., Ungless, M.A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.046>
- Napolitano, A., Cesura, A.M., Da Prada, M., 1995. The role of monoamine oxidase and catechol O-methyltransferase in dopaminergic neurotransmission. *J. Neural Transm. Suppl.* 45, 35–45.
- Nedergaard, S., Bolam, J.P., Greenfield, S.A., 1988. Facilitation of a dendritic calcium conductance by 5-hydroxytryptamine in the substantia nigra. *Nature* 333, 174. <https://doi.org/10.1038/333174a0>
- Nedergaard, S., Webb, C., Greenfield, S.A., 1989. A possible ionic basis for dendritic release of dopamine in the guinea-pig substantia nigra. *Acta Physiologica Scandinavica* 135, 67–68. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1989.tb08552.x>
- Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B., Roeper, J., 2002. I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* 22, 1290–1302.
- Nieoullon, A., Cheramy, A., Glowinski, J., 1978a. Release of dopamine evoked by electrical stimulation of the motor and visual areas of the cerebral cortex in both caudate nuclei and in the substantia nigra in the cat. *Brain Research* 145, 69–83. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90797-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90797-7)
- Nieoullon, A., Cheramy, A., Glowinski, J., 1978b. Release of dopamine in both caudate nuclei and both substantia nigrae in response to unilateral stimulation of cerebellar nuclei in the cat. *Brain Research* 148, 143–152. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90384-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90384-0)
- Nieoullon, A., Cheramy, A., Glowinski, J., 1977. Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. *Nature* 266, 375–377. <https://doi.org/10.1038/266375a0>
- Nirenberg, Melissa J., Chan, J., Liu, Y., Edwards, R.H., Pickel, V.M., 1996. Ultrastructural Localization of the Vesicular Monoamine Transporter-2 in Midbrain Dopaminergic Neurons: Potential Sites for Somatodendritic Storage and Release of Dopamine. *J. Neurosci.* 16, 4135–4145. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-13-04135.1996>
- Nirenberg, Melissa J., Chan, J., Pohorille, A., Vaughan, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., Pickel, V.M., 1997. The Dopamine Transporter: Comparative Ultrastructure of Dopaminergic Axons in

- Limbic and Motor Compartments of the Nucleus Accumbens. *J. Neurosci.* 17, 6899–6907. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-18-06899.1997>
- Nirenberg, M. J., Chan, J., Vaughan, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., Pickel, V.M., 1997. Immunogold localization of the dopamine transporter: an ultrastructural study of the rat ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 17, 5255–5262.
- Nirenberg, M.J., Liu, Y., Peter, D., Edwards, R.H., Pickel, V.M., 1995. The vesicular monoamine transporter 2 is present in small synaptic vesicles and preferentially localizes to large dense core vesicles in rat solitary tract nuclei. *PNAS* 92, 8773–8777. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8773>
- Nirenberg, M. J., Vaughan, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., Pickel, V.M., 1996. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 16, 436–447.
- Nissbrandt, H., Carlsson, A., 1987. Turnover of dopamine and dopamine metabolites in rat brain: comparison between striatum and substantia nigra. *J. Neurochem.* 49, 959–967. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb00987.x>
- Nissbrandt, H., Pileblad, E., Carlsson, A., 1985. Evidence for dopamine release and metabolism beyond the control of nerve impulses and dopamine receptors in rat substantia nigra. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 884–889. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb04994.x>
- O’Hara, C.M., Uhland-Smith, A., O’Malley, K.L., Todd, R.D., 1996. Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 186–192.
- O’Malley, K.L., Harmon, S., Moffat, M., Uhland-Smith, A., Wong, S., 1995. The human aromatic L-amino acid decarboxylase gene can be alternatively spliced to generate unique protein isoforms. *J. Neurochem.* 65, 2409–2416. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65062409.x>
- O’Neill, B., Patel, J.C., Rice, M.E., 2017. Characterization of Optically and Electrically Evoked Dopamine Release in Striatal Slices from Digenic Knock-in Mice with DAT-Driven Expression of Channelrhodopsin. *ACS Chem Neurosci* 8, 310–319. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.6b00300>
- Ovsepian, S.V., Dolly, J.O., 2011. Dendritic SNAREs add a new twist to the old neuron theory. *PNAS* 108, 19113–19120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017235108>
- Paden, C., Wilson, C.J., Groves, P.M., 1976. Amphetamine-induced release of dopamine from the substantia nigra in vitro. *Life Sciences* 19, 1499–1506. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(76\)90094-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(76)90094-1)
- Palmiter, R.D., 2008. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Ann N Y Acad Sci* 1129, 35–46. <https://doi.org/10.1196/annals.1417.003>
- Pan, P.-Y., Ryan, T.A., 2012. Calbindin controls release probability in ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 813–815. <https://doi.org/10.1038/nn.3099>
- Pang, Z.P., Bacaj, T., Yang, X., Zhou, P., Xu, W., Südhof, T.C., 2011. Doc2 supports spontaneous synaptic transmission by a Ca²⁺-independent mechanism. *Neuron* 70, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.011>
- Pang, Z.P., Melicoff, E., Padgett, D., Liu, Y., Teich, A.F., Dickey, B.F., Lin, W., Adachi, R., Südhof, T.C., 2006. Synaptotagmin-2 Is Essential for Survival and Contributes to Ca²⁺ Triggering of Neurotransmitter Release in Central and Neuromuscular Synapses. *J. Neurosci.* 26, 13493–13504. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3519-06.2006>

- Pang, Z.P., Südhof, T.C., 2010. Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Current Opinion in Cell Biology, Membranes and organelles* 22, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.001>
- Pangršič, T., Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Fabbretti, E., Nistri, A., Pryazhnikov, E., Khiroug, L., Giniatullin, R., Zorec, R., 2007. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem* 282, 28749–28758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700290200>
- Parish, C.L., Stanic, D., Drago, J., Borrelli, E., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., 2002. Effects of long-term treatment with dopamine receptor agonists and antagonists on terminal arbor size. *European Journal of Neuroscience* 16, 787–794. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02132.x>
- Parizek, J., Hassler, R., Bak, I.J., 1971. Light and electron microscopic autoradiography of substantia nigra of rat after intraventricular administration of tritium labelled norepinephrine, dopamine, serotonin and the precursors. *Z. Zellforsch.* 115, 137–148. <https://doi.org/10.1007/BF00330222>
- Parmar, M., Torper, O., Drouin-Ouellet, J., 2019. Cell-based therapy for Parkinson’s disease: A journey through decades toward the light side of the Force. *Eur. J. Neurosci.* 49, 463–471. <https://doi.org/10.1111/ejn.14109>
- Parpura, V., Fang, Y., Basarsky, T., Jahn, R., Haydon, P.G., 1995. Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett* 377, 489–492. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01401-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01401-2)
- Parri, H.R., Gould, T.M., Crunelli, V., 2001. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4, 803–812. <https://doi.org/10.1038/90507>
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., Haydon, P.G., 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310, 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1116916>
- Patel, J.C., Witkovsky, P., Avshalumov, M.V., Rice, M.E., 2009. Mobilization of calcium from intracellular stores facilitates somatodendritic dopamine release. *J. Neurosci.* 29, 6568–6579. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0181-09.2009>
- Patriarchi, T., Cho, J.R., Merten, K., Howe, M.W., Marley, A., Xiong, W.-H., Folk, R.W., Broussard, G.J., Liang, R., Jang, M.J., Zhong, H., Dombeck, D., von Zastrow, M., Nimmerjahn, A., Gradinaru, V., Williams, J.T., Tian, L., 2018. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* 360, eaat4422. <https://doi.org/10.1126/science.aat4422>
- Perea, G., Araque, A., 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1144640>
- Perea, G., Araque, A., 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25, 2192–2203. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3965-04.2005>
- Perreault, M.L., Hasbi, A., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2011. The Dopamine D1–D2 Receptor Heteromer in Striatal Medium Spiny Neurons: Evidence for a Third Distinct Neuronal Pathway in Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 5, 31. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00031>
- Perrotti, L.I., Bolaños, C.A., Choi, K.-H., Russo, S.J., Edwards, S., Ulery, P.G., Wallace, D.L., Self, D.W., Nestler, E.J., Barrot, M., 2005. ΔFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant

- treatment. *European Journal of Neuroscience* 21, 2817–2824. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04110.x>
- Pickel, V.M., Beckley, S.C., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981. Ultrastructural immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the neostriatum. *Brain Res.* 225, 373–385. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90843-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90843-x)
- Pickrell, A.M., Youle, R.J., 2015. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson’s disease. *Neuron* 85, 257–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Poser von, C., Südhof, T.C., 2001. Synaptotagmin 13: Structure and expression of a novel synaptotagmin. *European Journal of Cell Biology* 80, 41–47. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00133>
- Pothos, E. N., Davila, V., Sulzer, D., 1998. Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size. *J. Neurosci.* 18, 4106–4118.
- Pothos, Emmanuel N., Przedborski, S., Davila, V., Schmitz, Y., Sulzer, D., 1998. D2-Like Dopamine Autoreceptor Activation Reduces Quantal Size in PC12 Cells. *J. Neurosci.* 18, 5575–5585. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-15-05575.1998>
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C.S., Dombeck, D.A., Deisseroth, K., Awatramani, R., 2018. Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nature Neuroscience* 21, 1260. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0203-4>
- Poulin, J.-F., Tasic, B., Hjerling-Leffler, J., Trimarchi, J.M., Awatramani, R., 2016. Disentangling neural cell diversity using single-cell transcriptomics. *Nature Neuroscience* 19, 1131–1141. <https://doi.org/10.1038/nn.4366>
- Poulin, J.-F., Zou, J., Drouin-Ouellet, J., Kim, K.-Y.A., Cicchetti, F., Awatramani, R.B., 2014. Defining Midbrain Dopaminergic Neuron Diversity by Single-Cell Gene Expression Profiling. *Cell Reports* 9, 930–943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.008>
- Prensa, L., Giménez-Amaya, J.M., Parent, A., Bernácer, J., Cebrián, C., 2009. The nigrostriatal pathway: axonal collateralization and compartmental specificity. *J. Neural Transm. Suppl.* 49–58.
- 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07247.2001>
- Pucak, M.L., Grace, A.A., 1994. Evidence that systemically administered dopamine antagonists activate dopamine neuron firing primarily by blockade of somatodendritic autoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 271, 1181–1192.
- Pudovkina, O.L., Kawahara, Y., de Vries, J., Westerink, B.H.C., 2001. The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dual-probe microdialysis. *Brain Research* 906, 38–45. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02553-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02553-7)
- Quintero-Rivera, F., Chan, A., Donovan, D.J., Gusella, J.F., Ligon, A.H., 2007. Disruption of a synaptotagmin (SYT14) associated with neurodevelopmental abnormalities. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A, 558–563. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31618>
- Radnikow, G., Misgeld, U., 1998. Dopamine D1 receptors facilitate GABAA synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci.* 18, 2009–2016.
- Rappaport, M.S., Sealfon, S.C., Prikhozhan, A., Huntley, G.W., Morrison, J.H., 1993. Heterogeneous distribution of D1, D2 and D5 receptor mRNAs in monkey striatum. *Brain Res.* 616, 242–250. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90215-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90215-9)

- Reifenrath, M., Boles, E., 2018. A superfolder variant of pH-sensitive pHluorin for in vivo pH measurements in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* 8, 11985. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30367-z>
- Reubi, J.C., Sandri, C., 1979. Ultrastructural observations on intercellular contacts of nigral dendrites. *Neurosci. Lett.* 13, 183–188. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(79\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(79)90039-9)
- Rice, M.E., 2000. Distinct regional differences in dopamine-mediated volume transmission. *Prog. Brain Res.* 125, 277–290. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)25017-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)25017-6)
- Rice, M.E., Cragg, S.J., 2008. Dopamine spillover after quantal release: Rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Research Reviews*, Basal Ganglia 58, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.02.004>
- Rice, M.E., Cragg, S.J., Greenfield, S.A., 1997. Characteristics of electrically evoked somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *J. Neurophysiol.* 77, 853–862. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.853>
- Rice, M.E., Patel, J.C., 2015. Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0185>
- Rice, M.E., Patel, J.C., Cragg, S.J., 2011. Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198, 112–137. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.066>
- Rice, M.E., Richards, C.D., Nedergaard, S., Hounsgaard, J., Nicholson, C., Greenfield, S.A., 1994. Direct monitoring of dopamine and 5-HT release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Exp Brain Res* 100, 395–406. <https://doi.org/10.1007/bf02738400>
- Richards, D.A., Guatimosim, C., Betz, W.J., 2000. Two Endocytic Recycling Routes Selectively Fill Two Vesicle Pools in Frog Motor Nerve Terminals. *Neuron* 27, 551–559. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00065-9)
- Rickhag, M., Hansen, F.H., Sørensen, G., Strandfelt, K.N., Andresen, B., Gotfryd, K., Madsen, K.L., Vestergaard-Klewe, I., Ammendrup-Johnsen, I., Eriksen, J., Füchtbauer, E.-M., Gomeza, J., Woldbye, D.P.D., Wörtwein, G., Gether, U., 2013. A C-terminal PDZ domain binding sequence is required for striatal distribution of the dopamine transporter. *Nat Commun* 4, 1580. <https://doi.org/10.1038/ncomms2568>
- Ringstad, N., Abe, N., Horvitz, H.R., 2009. Ligand-gated chloride channels are receptors for biogenic amines in *C. elegans*. *Science* 325, 96–100. <https://doi.org/10.1126/science.1169243>
- Robertson, G.S., Damsma, G., Fibiger, H.C., 1991. Characterization of dopamine release in the substantia nigra by in vivo microdialysis in freely moving rats. *J. Neurosci.* 11, 2209–2216.
- Robertson, G.S., Robertson, H.A., 1989. Evidence that L-dopa-induced rotational behavior is dependent on both striatal and nigral mechanisms. *J. Neurosci.* 9, 3326–3331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-09-03326.1989>
- Robinson, B.G., Cai, X., Wang, J., Bunzow, J.R., Williams, J.T., Kaeser, P.S., 2019. RIM is essential for stimulated but not spontaneous somatodendritic dopamine release in the midbrain. *eLife* 8, e47972. <https://doi.org/10.7554/eLife.47972>
- Robinson, D.L., Hermans, A., Seipel, A.T., Wightman, R.M., 2008. Monitoring rapid chemical communication in the brain. *Chem. Rev.* 108, 2554–2584. <https://doi.org/10.1021/cr068081q>
- Robinson, I.M., Ranjan, R., Schwarz, T.L., 2002. Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca(2+) binding in the C(2)A domain. *Nature* 418, 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature00915>
- Robinson, J.E., Coughlin, G.M., Hori, A.M., Cho, J.R., Mackey, E.D., Turan, Z., Patriarchi, T., Tian, L., Gradinaru, V., 2019. Optical dopamine monitoring with dLight1 reveals

- mesolimbic phenotypes in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *eLife* 8, e48983. <https://doi.org/10.7554/eLife.48983>
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 1993. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews* 18, 247–291. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-P](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-P)
- Roeper, J., 2013. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends in Neurosciences* 36, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.03.003>
- Rondou, P., Haegeman, G., Van Craenenbroeck, K., 2010. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1971–1986. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0293-y>
- Rossetti, Z.L., Silvia, C.P., Krajnc, D., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1990. Aromatic L-amino acid decarboxylase is modulated by D1 dopamine receptors in rat retina. *J Neurochem* 54, 787–791. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02320.x>
- Roth, B.L., Sheffler, D.J., Kroeze, W.K., 2004. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 3, 353–359. <https://doi.org/10.1038/nrd1346>
- Ruhl, D.A., Bomba-Warczak, E., Watson, E.T., Bradberry, M.M., Peterson, T.A., Basu, T., Frelka, A., Evans, C.S., Briguglio, J.S., Basta, T., Stowell, M.H.B., Savas, J.N., Roopra, A., Pearce, R.A., Piper, R.C., Chapman, E.R., 2019. Synaptotagmin 17 controls neurite outgrowth and synaptic physiology via distinct cellular pathways. *Nat Commun* 10, 3532. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11459-4>
- Sahay, A., Molliver, M.E., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L., 2003. Semaphorin 3F Is Critical for Development of Limbic System Circuitry and Is Required in Neurons for Selective CNS Axon Guidance Events. *J. Neurosci.* 23, 6671–6680. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-17-06671.2003>
- Sampaio-Maia, B., Serrão, M.P., Soares-da-Silva, P., 2001. Regulatory pathways and uptake of L-DOPA by capillary cerebral endothelial cells, astrocytes, and neuronal cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 280, C333–342. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.2.C333>
- Sanghera, M.K., Manaye, K.F., Liang, C.L., Lacopino, A.M., Bannon, M.J., German, D.C., 1994. Low dopamine transporter mRNA levels in midbrain regions containing calbindin. *Neuroreport* 5, 1641–1644. <https://doi.org/10.1097/00001756-199408150-00025>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90652-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90652-3)
- Santiago, M., Machado, A., Cano, J., 1992. Fast sodium channel dependency of the somatodendritic release of dopamine in the rat's brain. *Neurosci. Lett.* 148, 145–147. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90825-r](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90825-r)
- Santiago, M., Westerink, B.H., 1992. Simultaneous recording of the release of nigral and striatal dopamine in the awake rat. *Neurochem. Int.* 20 Suppl, 107S–110S.
- Santiago, M., Westerink, B.H., 1991. Characterization and pharmacological responsiveness of dopamine release recorded by microdialysis in the substantia nigra of conscious rats. *J. Neurochem.* 57, 738–747. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08214.x>
- Santiago, M., Westerink, B.H., 1990. Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342, 407–414. <https://doi.org/10.1007/bf00169457>
- Sarre, S., Yuan, H., Jonkers, N., Van Hemelrijck, A., Ebinger, G., Michotte, Y., 2004. In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-

- hydroxydopamine-lesioned rats. *J. Neurochem.* 90, 29–39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02471.x>
- Saunders, C., Ferrer, J.V., Shi, L., Chen, J., Merrill, G., Lamb, M.E., Leeb-Lundberg, L.M., Carvelli, L., Javitch, J.A., Galli, A., 2000. Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: an internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6850–6855. <https://doi.org/10.1073/pnas.110035297>
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R., Montecucco, C., 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832–835. <https://doi.org/10.1038/359832a0>
- Schoffelmeer, A.N.M., Drukarch, B., Vries, T.J.D., Hogenboom, F., Schetters, D., Pattij, T., 2011. Insulin Modulates Cocaine-Sensitive Monoamine Transporter Function and Impulsive Behavior. *J. Neurosci.* 31, 1284–1291. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3779-10.2011>
- Schonn, J.-S., Maximov, A., Lao, Y., Südhof, T.C., Sørensen, J.B., 2008. Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca²⁺ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *PNAS* 105, 3998–4003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712373105>
- Segovia, M., Alés, E., Montes, M.A., Bonifas, I., Jemal, I., Lindau, M., Maximov, A., Südhof, T.C., Alvarez de Toledo, G., 2010. Push-and-pull regulation of the fusion pore by synaptotagmin-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 19032–19037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014070107>
- Séguéla, P., Watkins, K.C., Geffard, M., Descarries, L., 1990. Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience* 35, 249–264. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90079-j](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90079-j)
- Segura-Aguilar, J., Paris, I., 2014. Mechanisms of Dopamine Oxidation and Parkinson's Disease, in: Kostrzewa, R.M. (Ed.), *Handbook of Neurotoxicity*. Springer New York, New York, NY, pp. 865–883. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5836-4_16
- Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., Tessier-Lavigne, M., 1996. Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System. *Cell* 87, 1001–1014. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81795-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81795-X)
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.-C., Robitaille, R., 2006. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci.* 26, 5370–5382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006>
- Sesack, S.R., Aoki, C., Pickel, V.M., 1994. Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J. Neurosci.* 14, 88–106.
- Sesack, S.R., Grace, A.A., 2010. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35, 27–47. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.93>
- Seutin, V., Massotte, L., Renette, M.-F., Dresse, A., 2001. Evidence for a modulatory role of I_h on the firing of a subgroup of midbrain dopamine neurons. *NeuroReport* 12, 255–258.
- Sharma, M., Burré, J., Südhof, T.C., 2011. CSP α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat. Cell Biol.* 13, 30–39. <https://doi.org/10.1038/ncb2131>
- Shetreat, M.E., Lin, L., Wong, A.C., Rayport, S., 1996. Visualization of D1 dopamine receptors on living nucleus accumbens neurons and their colocalization with D2 receptors. *J. Neurochem.* 66, 1475–1482. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66041475.x>

- Shimojo, M., Madara, J., Pankow, S., Liu, X., Yates, J., Südhof, T.C., Maximov, A., 2019. Synaptotagmin-11 mediates a vesicle trafficking pathway that is essential for development and synaptic plasticity. *Genes Dev.* 33, 365–376. <https://doi.org/10.1101/gad.320077.118>
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T., 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305. <https://doi.org/10.1038/77060>
- Shin, O.-H., Rizo, J., Südhof, T.C., 2002. Synaptotagmin function in dense core vesicle exocytosis studied in cracked PC12 cells. *Nat. Neurosci.* 5, 649–656. <https://doi.org/10.1038/nn869>
- Shuen, J.A., Chen, M., Gloss, B., Calakos, N., 2008. Drd1a-tdTomato BAC Transgenic Mice for Simultaneous Visualization of Medium Spiny Neurons in the Direct and Indirect Pathways of the Basal Ganglia. *J. Neurosci.* 28, 2681–2685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5492-07.2008>
- Sibley, D.R., 1999. New Insights into Dopaminergic Receptor Function Using Antisense and Genetically Altered Animals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39, 313–341. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.313>
- Sills, T.L., Greenshaw, A.J., Baker, G.B., Fletcher, P.J., 1999. Acute fluoxetine treatment potentiates amphetamine hyperactivity and amphetamine-induced nucleus accumbens dopamine release: possible pharmacokinetic interaction. *Psychopharmacology* 141, 421–427. <https://doi.org/10.1007/s002130050852>
- Sitges, M., Reyes, A., Chiu, L.M., 1994. Dopamine transporter mediated release of dopamine: role of chloride. *J. Neurosci. Res.* 39, 11–22. <https://doi.org/10.1002/jnr.490390103>
- Skagerberg, G., Lindvall, O., 1985. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Research* 342, 340–351. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91134-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91134-5)
- Smiley, J.F., Levey, A.I., Ciliax, B.J., Goldman-Rakic, P.S., 1994a. D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5720–5724. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5720>
- Smiley, J.F., Levey, A.I., Ciliax, B.J., Goldman-Rakic, P.S., 1994b. D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5720–5724. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5720>
- Smith, Y., Bennett, B.D., Bolam, J.P., Parent, A., Sadikot, A.F., 1994. Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J. Comp. Neurol.* 344, 1–19. <https://doi.org/10.1002/cne.903440102>
- Snyder, S.H., Taylor, K.M., Coyle, J.T., Meyerhoff, J.L., 1970. The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry* 127, 199–207. <https://doi.org/10.1176/ajp.127.2.199>
- Sokoloff, P., Diaz, J., Le Foll, B., Guillin, O., Leriche, L., Bezard, E., Gross, C., 2006. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5, 25–43.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Andrieux, M., Besancon, R., Pilon, C., Bouthenet, M.L., Souil, E., Schwartz, J.C., 1992. Localization and function of the D3 dopamine receptor. *Arzneimittelforschung* 42, 224–230.

- Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., Rothman, J.E., 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409–418. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90376-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90376-2)
- Sreetama, S.C., Takano, T., Nedergaard, M., Simon, S.M., Jaiswal, J.K., 2016. Injured astrocytes are repaired by Synaptotagmin XI-regulated lysosome exocytosis. *Cell Death and Differentiation* 23, 596–607. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.124>
- Stamatakis, A.M., Jennings, J.H., Ung, R.L., Blair, G.A., Weinberg, R.J., Neve, R.L., Boyce, F., Mattis, J., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Stuber, G.D., 2013. A unique population of ventral tegmental area neurons inhibits the lateral habenula to promote reward. *Neuron* 80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.023>
- Steinkellner, T., Mus, L., Eisenrauch, B., Constantinescu, A., Leo, D., Konrad, L., Rickhag, M., Sørensen, G., Efimova, E.V., Kong, E., Willeit, M., Sotnikova, T.D., Kudlacek, O., Gether, U., Freissmuth, M., Pollak, D.D., Gainetdinov, R.R., Sitte, H.H., 2014. In Vivo Amphetamine Action is Contingent on α CaMKII. *Neuropsychopharmacol* 39, 2681–2693. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.124>
- Stojanovic, T., Orlova, M., Sialana, F.J., Höger, H., Stuchlik, S., Milenkovic, I., Aradska, J., Lubec, G., 2017. Validation of dopamine receptor DRD1 and DRD2 antibodies using receptor deficient mice. *Amino Acids* 49, 1101–1109. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2408-3>
- Storch, A., Ludolph, A.C., Schwarz, J., 2004. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J Neural Transm (Vienna)* 111, 1267–1286. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0203-2>
- Stott, S.R.W., Barker, R.A., 2014. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 39, 1042–1056. <https://doi.org/10.1111/ejn.12459>
- Stuber, G.D., Hnasko, T.S., Britt, J.P., Edwards, R.H., Bonci, A., 2010. Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum co-release glutamate. *J Neurosci* 30, 8229–8233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1754-10.2010>
- Studer, L., Csete, M., Lee, S.H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B., McKay, R., 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.* 20, 7377–7383.
- Südhof, Thomas C., 2013. Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* 80, 675–690. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Südhof, Thomas C., 2013. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nature Medicine* 19, 1227–1231. <https://doi.org/10.1038/nm.3338>
- Südhof, T.C., 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Südhof, T.C., 2002. Synaptotagmins: Why So Many? *J. Biol. Chem.* 277, 7629–7632. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100052200>
- Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernández-Chacón, R., Lao, Y., Südhof, T.C., 2001. Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca²⁺ sensor in exocytosis. *Neuron* 30, 459–473.
- Sugita, S., Shin, O.-H., Han, W., Lao, Y., Südhof, T.C., 2002. Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca²⁺ sensors with distinct Ca²⁺ affinities. *The EMBO Journal* 21, 270–280. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.270>

- Su-Jin, Y., Gifford, A.N., Johnson, K.M., 1991. Effect of cocaine and 5-HT₃ receptor antagonists on 5-HT-induced [5H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *European Journal of Pharmacology* 199, 185–189. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90456-Z](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90456-Z)
- Sulzer, D., Chen, T.K., Lau, Y.Y., Kristensen, H., Rayport, S., Ewing, A., 1995. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J. Neurosci.* 15, 4102–4108.
- Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., Galli, A., 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog. Neurobiol.* 75, 406–433. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.003>
- Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S.F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., Yong, Z., Gao, Y., Peng, W., Wang, L., Zhang, S., Du, J., Lin, D., Xu, M., Kreitzer, A.C., Cui, G., Li, Y., 2018. A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice. *Cell* 174, 481–496.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.042>
- Sunahara, R.K., Guan, H.-C., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L.G., Ng, G., George, S.R., Torchia, J., Tol, H.H.M.V., Niznik, H.B., 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* 350, 614. <https://doi.org/10.1038/350614a0>
- Sung Choi, W., Machida, C.A., Ronnekleiv, O.K., 1995. Distribution of dopamine D₁, D₂, and D₅ receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Molecular Brain Research* 31, 86–94. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00038-T](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00038-T)
- Surmeier, D.J., Song, W.J., Yan, Z., 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16, 6579–6591.
- Surmeier, D.J., Yan, Z., Song, W.J., 1998. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *Adv Pharmacol* 42, 1020–1023. [https://doi.org/10.1016/s1054-3589\(08\)60921-7](https://doi.org/10.1016/s1054-3589(08)60921-7)
- Swanson, L.W., Kuypers, H.G.J.M., 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *Journal of Comparative Neurology* 194, 555–570. <https://doi.org/10.1002/cne.901940306>
- Swerdlow, N.R., Koob, G.F., 1987. Dopamine, schizophrenia, mania, and depression: Toward a unified hypothesis of cortico-striatopallido-thalamic function. *Behavioral and Brain Sciences* 10, 197–208. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00047488>
- Tagerud, S.E.O., Cuello, A.C., 1979. Dopamine release from the rat substantia nigra in vitro. Effect of raphe lesions and veratridine stimulation. *Neuroscience* 4, 2021–2029. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90073-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90073-3)
- Tagliaferro, P., Burke, R.E., 2016. Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease. *J Parkinsons Dis* 6, 1–15. <https://doi.org/10.3233/JPD-150769>
- Tang, J., Maximov, A., Shin, O.-H., Dai, H., Rizo, J., Südhof, T.C., 2006. A Complexin/Synaptotagmin 1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cell* 126, 1175–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.030>
- Tawfik, B., Martins, J.S., Houy, S., Imig, C., Pinheiro, P.S., Wojcik, S.M., Brose, N., Cooper, B.H., Sørensen, J.B., 2021. Synaptotagmin-7 places dense-core vesicles at the cell membrane to promote Munc13-2- and Ca²⁺-dependent priming. *eLife* 10, e64527. <https://doi.org/10.7554/eLife.64527>

- Taylor, S.R., Badurek, S., DiLeone, R.J., Nashmi, R., Minichiello, L., Picciotto, M.R., 2014. GABAergic and Glutamatergic Efferents of the Mouse Ventral Tegmental Area. *J Comp Neurol* 522, 3308–3334. <https://doi.org/10.1002/cne.23603>
- Tecuapetla, F., Patel, J.C., Xenias, H., English, D., Tadros, I., Shah, F., Berlin, J., Deisseroth, K., Rice, M.E., Tepper, J.M., Koos, T., 2010. Glutamatergic Signaling by Mesolimbic Dopamine Neurons in the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 30, 7105–7110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0265-10.2010>
- Tenhunen, J., Salminen, M., Lundström, K., Kiviluoto, T., Savolainen, R., Ulmanen, I., 1994. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur. J. Biochem.* 223, 1049–1059. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19083.x>
- Tepper, J.M., Lee, C.R., 2007. GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons, in: Tepper, J.M., Abercrombie, E.D., Bolam, J.P. (Eds.), *Progress in Brain Research, Gaba and the Basal Ganglia*. Elsevier, pp. 189–208. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60011-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60011-3)
- Thibault, D., Loustalot, F., Fortin, G.M., Bourque, M.-J., Trudeau, L.-É., 2013. Evaluation of D1 and D2 dopamine receptor segregation in the developing striatum using BAC transgenic mice. *PLoS One* 8, e67219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067219>
- Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D., Björklund, A., 2005. Identification of Dopaminergic Neurons of Nigral and Ventral Tegmental Area Subtypes in Grafts of Fetal Ventral Mesencephalon Based on Cell Morphology, Protein Expression, and Efferent Projections. *J. Neurosci.* 25, 6467–6477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1676-05.2005>
- Threlfell, S., Cragg, S.J., 2007. Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry to Investigate Somatodendritic Dopamine Release, in: Michael, A.C., Borland, L.M. (Eds.), *Electrochemical Methods for Neuroscience, Frontiers in Neuroengineering*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., Cragg, S.J., 2012. Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* 75, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.038>
- Tiklová, K., Björklund, Å.K., Lahti, L., Fiorenzano, A., Nolbrant, S., Gillberg, L., Volakakis, N., Yokota, C., Hilscher, M.M., Hauling, T., Holmström, F., Joodmardi, E., Nilsson, M., Parmar, M., Perlmann, T., 2019. Single-cell RNA sequencing reveals midbrain dopamine neuron diversity emerging during mouse brain development. *Nature Communications* 10, 581. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08453-1>
- Timmerman, W., Abercrombie, E.D., 1996. Amphetamine-induced release of dendritic dopamine in substantia nigra pars reticulata: D1-mediated behavioral and electrophysiological effects. *Synapse* 23, 280–291. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199608\)23:4<280::AID-SYN6>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199608)23:4<280::AID-SYN6>3.0.CO;2-3)
- Ting, J.T., Kelley, B.G., Sullivan, J.M., 2006. Synaptotagmin IV Does Not Alter Excitatory Fast Synaptic Transmission or Fusion Pore Kinetics in Mammalian CNS Neurons. *J. Neurosci.* 26, 372–380. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3997-05.2006>
- Tobin, V.A., Hurst, G., Norrie, L., Rio, F.P.D., Bull, P.M., Ludwig, M., 2004. Thapsigargin-induced mobilization of dendritic dense-cored vesicles in rat supraoptic neurons. *European Journal of Neuroscience* 19, 2909–2912. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03388.x>
- Tocco, G., Bi, X., Vician, L., Lim, I.K., Herschman, H., Baudry, M., 1996. Two synaptotagmin genes, *Syt1* and *Syt4*, are differentially regulated in adult brain and during postnatal

- development following kainic acid-induced seizures. *Molecular Brain Research* 40, 229–239. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(96\)00055-1](https://doi.org/10.1016/0169-328X(96)00055-1)
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 13–25. <https://doi.org/10.1038/nrn1008>
- Torres, G.E., Yao, W.D., Mohn, A.R., Quan, H., Kim, K.M., Levey, A.I., Staudinger, J., Caron, M.G., 2001. Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 30, 121–134.
- Trevitt, J., Carlson, B., Nowend, K., Salamone, J., 2001. Substantia nigra pars reticulata is a highly potent site of action for the behavioral effects of the D1 antagonist SCH 23390 in the rat. *Psychopharmacology* 156, 32–41. <https://doi.org/10.1007/s002130100708>
- Tripanichkul, W., Stanic, D., Drago, J., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., 2003. D2 Dopamine receptor blockade results in sprouting of DA axons in the intact animal but prevents sprouting following nigral lesions. *Eur J Neurosci* 17, 1033–1045. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02547.x>
- Tritsch, N.X., Ding, J.B., Sabatini, B.L., 2012. Dopaminergic neurons inhibit striatal output via non-canonical release of GABA. *Nature* 490, 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature11466>
- Tritsch, N.X., Granger, A.J., Sabatini, B.L., 2016. Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nature Reviews Neuroscience* 17, 139–145. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.21>
- Trudeau, L.-E., Hnasko, T.S., Wallén-Mackenzie, Å., Morales, M., Rayport, S., Sulzer, D., 2014. The multilingual nature of dopamine neurons. *Prog Brain Res* 211, 141–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63425-2.00006-4>
- Trueta, C., De-Miguel, F.F., 2012. Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. *Front Physiol* 3, 319. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00319>
- Truong, J.G., Newman, A.H., Hanson, G.R., Fleckenstein, A.E., 2004. Dopamine D2 receptor activation increases vesicular dopamine uptake and redistributes vesicular monoamine transporter-2 protein. *European Journal of Pharmacology* 504, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.09.049>
- Tsuboi, T., Fukuda, M., 2007. Synaptotagmin VII modulates the kinetics of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Genes Cells* 12, 511–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01070.x>
- Uemura, M., Takeichi, M., 2006. α N-catenin deficiency causes defects in axon migration and nuclear organization in restricted regions of the mouse brain. *Developmental Dynamics* 235, 2559–2566. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20841>
- Umek, N., Geršak, B., Vintar, N., Šoštarič, M., Mavri, J., 2018. Dopamine Autoxidation Is Controlled by Acidic pH. *Front. Mol. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00467>
- Usiello, A., Baik, J.H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V., Borrelli, E., 2000. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408, 199–203. <https://doi.org/10.1038/35041572>
- Van Bockstaele, E.J., Cestari, D.M., Pickel, V.M., 1994. Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Research* 647, 307–322. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91330-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91330-7)

- Vaughan, R.A., Huff, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., 1997. Protein Kinase C-mediated Phosphorylation and Functional Regulation of Dopamine Transporters in Striatal Synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 272, 15541–15546. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15541>
- Venton, B.J., Seipel, A.T., Phillips, P.E.M., Wetsel, W.C., Gitler, D., Greengard, P., Augustine, G.J., Wightman, R.M., 2006. Cocaine increases dopamine release by mobilization of a synapsin-dependent reserve pool. *J Neurosci* 26, 3206–3209. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4901-04.2006>
- Vergo, S., Johansen, J.L., Leist, M., Lotharius, J., 2007. Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Research* 1185, 18–32. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.028>
- Verkhatsky, A., 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* 85, 201–279. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2004>
- Vician, L., Lim, I.K., Ferguson, G., Tocco, G., Baudry, M., Herschman, H.R., 1995. Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *PNAS* 92, 2164–2168. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.2164>
- Virmani, T., Han, W., Liu, X., Südhof, T.C., Kavalali, E.T., 2003. Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *EMBO J.* 22, 5347–5357. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg514>
- Voglmaier, S.M., Edwards, R.H., 2007. Do different endocytic pathways make different synaptic vesicles? *Current Opinion in Neurobiology, Signalling mechanisms* 17, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.002>
- von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J., Südhof, T.C., 1997. The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca²⁺ binding. *J. Biol. Chem.* 272, 14314–14319. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14314>
- Vrana, K.E., Walker, S.J., Rucker, P., Liu, X., 1994. A carboxyl terminal leucine zipper is required for tyrosine hydroxylase tetramer formation. *J. Neurochem.* 63, 2014–2020. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63062014.x>
- Wang, C., Kang, X., Zhou, L., Chai, Z., Wu, Q., Huang, R., Xu, H., Hu, M., Sun, X., Sun, S., Li, J., Jiao, R., Zuo, P., Zheng, L., Yue, Z., Zhou, Z., 2018. Synaptotagmin-11 is a critical mediator of parkin-linked neurotoxicity and Parkinson’s disease-like pathology. *Nat Commun* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02593-y>
- Wang, C., Wang, Y., Hu, M., Chai, Z., Wu, Q., Huang, R., Han, W., Zhang, C.X., Zhou, Z., 2016. Synaptotagmin-11 inhibits clathrin-mediated and bulk endocytosis. *EMBO reports* 17, 47–63. <https://doi.org/10.15252/embr.201540689>
- Wang, C.T., Grishanin, R., Earles, C.A., Chang, P.Y., Martin, T.F., Chapman, E.R., Jackson, M.B., 2001. Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 294, 1111–1115. <https://doi.org/10.1126/science.1064002>
- Wang, Q.-W., Wang, Y.-H., Wang, B., Chen, Y., Lu, S.-Y., Yao, J., 2021. Synaptotagmin-7-mediated activation of spontaneous NMDAR currents is disrupted in bipolar disorder susceptibility variants. *PLOS Biology* 19, e3001323. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001323>
- Wang, Z., Chapman, E.R., 2010. Rat and Drosophila Synaptotagmin 4 Have Opposite Effects during SNARE-catalyzed Membrane Fusion. *J. Biol. Chem.* 285, 30759–30766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.137745>

- Wassef, M., Berod, A., Sotelo, C., 1981. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience* 6, 2125–2139. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90003-8)
- Weiner, D.M., Levey, A.I., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., O’Dowd, B.F., Seeman, P., Brann, M.R., 1991. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1859–1863. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1859>
- Westerink, B.H., Damsma, G., Rollema, H., De Vries, J.B., Horn, A.S., 1987. Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci.* 41, 1763–1776. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90695-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90695-3)
- Westerink, B.H., De Vries, J.B., 1988. Characterization of in vivo dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantations: methodological aspects. *J. Neurochem.* 51, 683–687. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb01798.x>
- Westerink, B.H.C., de Boer, P., Santiago, M., De Vries, J.B., 1994. Do nerve terminals and cell bodies of nigrostriatal dopaminergic neurons of the rat contain similar receptors? *Neuroscience Letters* 167, 109–112. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)91039-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)91039-1)
- Wichmann, T., DeLong, M.R., 1996. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 751–758. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80024-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80024-9)
- Wightman, R.M., Jankowski, J.A., Kennedy, R.T., Kawagoe, K.T., Schroeder, T.J., Leszczyszyn, D.J., Near, J.A., Diliberto, E.J., Viveros, O.H., 1991. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10754–10758. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10754>
- Wilson, C.J., Groves, P.M., Fifková, E., 1977. Monoaminergic synapses, including dendrodendritic synapses in the rat substantia nigra. *Exp Brain Res* 30, 161–174. <https://doi.org/10.1007/BF00237248>
- Witkovsky, P., 2004. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 108, 17–40.
- Witkovsky, P., Patel, J.C., Lee, C.R., Rice, M.E., 2009. Immunocytochemical identification of proteins involved in dopamine release from the somatodendritic compartment of nigral dopaminergic neurons. *Neuroscience* 164, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.017>
- Woitecki, A.M.H., Müller, J.A., van Loo, K.M.J., Sowade, R.F., Becker, A.J., Schoch, S., 2016. Identification of Synaptotagmin 10 as Effector of NPAS4-Mediated Protection from Excitotoxic Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 36, 2561–2570. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2027-15.2016>
- Wolf, M.E., Roth, R.H., 1990. Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 604, 323–343. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb32003.x>
- Wong, R.K., Prince, D.A., Basbaum, A.I., 1979. Intradendritic recordings from hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 986–990. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.986>
- Wood, P.B., 2008. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Review of Neurotherapeutics* 8, 781–797. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.5.781>
- Xu, J., Mashimo, T., Südhof, T.C., 2007. Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca²⁺ sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 54, 567–581. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.004>
- Xu, J., Pang, Z.P., Shin, O.-H., Südhof, T.C., 2009. Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release. *Nat. Neurosci.* 12, 759–766. <https://doi.org/10.1038/nn.2320>

- Xu, T.-X., Sotnikova, T.D., Liang, C., Zhang, J., Jung, J.U., Spealman, R.D., Gainetdinov, R.R., Yao, W.-D., 2009. Hyperdopaminergic Tone Erodes Prefrontal Long-Term Potential via a D2 Receptor-Operated Protein Phosphatase Gate. *J. Neurosci.* 29, 14086–14099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0974-09.2009>
- Yadid, G., Pacak, K., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 1994. Endogenous serotonin stimulates striatal dopamine release in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 1158–1165.
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C.R., Urakubo, H., Ishii, S., Kasai, H., 2014. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616–1620. <https://doi.org/10.1126/science.1255514>
- Yamada, T., McGeer, P.L., Baimbridge, K.G., McGeer, E.G., 1990. Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Research* 526, 303–307. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91236-A](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91236-A)
- Yamaguchi, T., Qi, J., Wang, H.-L., Zhang, S., Morales, M., 2015. Glutamatergic and Dopaminergic Neurons in the Mouse Ventral Tegmental Area. *Eur J Neurosci* 41, 760–772. <https://doi.org/10.1111/ejn.12818>
- Yamaguchi, T., Sheen, W., Morales, M., 2007. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 25, 106–118. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x>
- Yamaguchi, T., Wang, H.-L., Li, X., Ng, T.H., Morales, M., 2011. Mesocorticolimbic Glutamatergic Pathway. *J. Neurosci.* 31, 8476–8490. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1598-11.2011>
- Yamaguchi, T., Wang, H.-L., Morales, M., 2013. Glutamate neurons in the substantia nigra compacta and retrorubral field. *Eur J Neurosci* 38, 3602–3610. <https://doi.org/10.1111/ejn.12359>
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S., 2003. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15194–15199. <https://doi.org/10.1073/pnas.2431073100>
- Yao, J., Gaffaney, J.D., Kwon, S.E., Chapman, E.R., 2011. Doc2 is a Ca²⁺ sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell* 147, 666–677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.046>
- Yapo, C., Nair, A.G., Clement, L., Castro, L.R., Hellgren Kotaleski, J., Vincent, P., 2017. Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *J Physiol* 595, 7451–7475. <https://doi.org/10.1113/JP274475>
- Yee, A.G., Forbes, B., Cheung, P.-Y., Martini, A., Burrell, M.H., Freestone, P.S., Lipski, J., 2019. Action potential and calcium dependence of tonic somatodendritic dopamine release in the Substantia Nigra pars compacta. *Journal of Neurochemistry* 148, 462–479. <https://doi.org/10.1111/jnc.14587>
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H.N., Reichard, R.A., Zahm, D.S., 2014. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* 282, 23–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.010>
- Yung, K.K., 1998. Localization of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in distinct neuronal elements of the rat substantia nigra. *Neurochem. Int.* 33, 313–326.
- Yung, K.K.L., Bolam, J.P., Smith, A.D., Hersch, S.M., Ciliax, B.J., Levey, A.I., 1995. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: Light and electron microscopy. *Neuroscience* 65, 709–730. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00536-E](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00536-E)

- Zahniser, N.R., Gerhardt, G.A., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., 1997. Voltage-Dependency of the Dopamine Transporter in Rat Brain, in: Goldstein, D.S., Eisenhofer, G., McCarty, R. (Eds.), *Advances in Pharmacology*. Academic Press, pp. 195–198. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60726-7](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60726-7)
- Zanner, R., Gratzl, M., Prinz, C., 2002. Circle of life of secretory vesicles in gastric enterochromaffin-like cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971, 389–396. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04501.x>
- Zhang, G., Bai, H., Zhang, H., Dean, C., Wu, Q., Li, J., Guariglia, S., Meng, Q., Cai, D., 2011. Neuropeptide Exocytosis Involving Synaptotagmin-4 and Oxytocin in Hypothalamic Programming of Body Weight and Energy Balance. *Neuron* 69, 523–535. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.036>
- Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C., Poo, M., Duan, S., 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971–982. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00717-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00717-7)
- Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., Haydon, P.G., 2004. Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9441–9446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401960101>
- Zhang, Z., Bhalla, A., Dean, C., Chapman, E.R., Jackson, M.B., 2009. Synaptotagmin IV: a multifunctional regulator of peptidergic nerve terminals. *Nat. Neurosci.* 12, 163–171. <https://doi.org/10.1038/nn.2252>
- Zhang, Zhenjie, Zhang, Zhen, Jackson, M.B., 2010. Synaptotagmin IV modulation of vesicle size and fusion pores in PC12 cells. *Biophys. J.* 98, 968–978. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.024>
- Zhou, F.-M., Lee, C.R., 2011. Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience* 198, 69–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.061>
- Zhou, F.-W., Jin, Y., Matta, S.G., Xu, M., Zhou, F.-M., 2009. An Ultra-Short Dopamine Pathway Regulates Basal Ganglia Output. *J. Neurosci.* 29, 10424–10435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4402-08.2009>
- Zhou, Z., Misler, S., Chow, R.H., 1996. Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophys. J.* 70, 1543–1552. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79718-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79718-7)
- Zweifel, L.S., Argilli, E., Bonci, A., Palmiter, R.D., 2008. Role of NMDA Receptors in Dopamine Neurons for Plasticity and Addictive Behaviors. *Neuron* 59, 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.028>
- Zweifel, L.S., Parker, J.G., Lobb, C.J., Rainwater, A., Wall, V.Z., Fadok, J.P., Darvas, M., Kim, M.J., Mizumori, S.J.Y., Paladini, C.A., Phillips, P.E.M., Palmiter, R.D., 2009. Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *PNAS* 106, 7281–7288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813415106>