

Université de Montréal

**Étude du système dopaminergique pré- et
postsynaptique: régulation de l'autorécepteur D2 par la
neurotensine et formation des synapses excitatrices dans
le striatum**

par

Dominic Thibault

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Sciences Neurologiques

Août 2012

© Dominic Thibault, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Étude du système dopaminergique pré- et postsynaptique: régulation de l'autorécepteur D2
par la neurotensine et formation des synapses excitatrices dans le striatum

Présentée par :
Dominic Thibault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nicole Leclerc, président-rapporteur
Louis-Éric Trudeau, directeur de recherche
Pierre L. Blanchet, membre du jury
Anne McKinney, examinateur externe
Pierre Rainville, représentant du doyen de la FES

Résumé

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur impliqué dans la modulation de fonctions essentielles du cerveau telles que le contrôle des mouvements volontaires, le système de récompense et certains aspects de la cognition. Depuis sa découverte, la DA a attiré énormément d'attention scientifique en partie à cause des pathologies majeures associées aux dysfonctions du système DAergique, comme la maladie de Parkinson, la schizophrénie et la toxicomanie. On retrouve la majorité des neurones qui synthétisent la DA au niveau du mésencéphale ventral, dans les noyaux de la substance noire compacte (SNc) et de l'aire tegmentaire ventrale (ATV). Ces neurones projettent leurs axones dans un très dense réseau de fibres qui s'organisent en trois voies DAergiques classiques: la voie nigrostriée, la voie mésolimbique et la voie mésocorticale.

La transmission DAergique s'effectue par l'activation de récepteurs de la DA qui font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Les récepteurs de la DA sont abondamment exprimés aussi bien par les neurones DAergiques que par les neurones des régions cibles, ce qui implique que la compréhension de la signalisation et des fonctions particulières des récepteurs de la DA pré- et postsynaptiques représente un enjeu crucial dans l'étude du système DAergique. Cette thèse de doctorat se sépare donc en deux volets distincts: le premier s'intéresse à la régulation du récepteur D2 présynaptique par la neurotensine (NT), un neuropeptide intimement lié à la modulation du système DAergique; le deuxième s'intéresse au côté postsynaptique du système DAergique, plus particulièrement à la ségrégation de l'expression des récepteurs de la DA dans le striatum et aux fonctions de ces récepteurs dans l'établissement des circuits neuronaux excitateurs prenant place dans cette région.

Dans la première partie de cette thèse, nous démontrons que l'activation du récepteur à haute affinité de la NT, le NTR1, provoque une internalisation hétérologue du récepteur D2, avec une amplitude et une cinétique différente selon l'isoforme D2 observé. Cette internalisation hétérologue dépend de la protéine kinase C (PKC), et nous montrons que la surexpression d'un récepteur D2 muté sur des sites de phosphorylation par la PKC

ainsi que l'inhibition de l'expression de β -arrestine1 par ARNs interférents dans des neurones DAergiques bloquent complètement l'interaction fonctionnelle entre le NTR1 et le D2.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous démontrons d'abord que la ségrégation de l'expression des récepteurs D1 et D2 dans le striatum est déjà bien établie dès le 18e jour embryonnaire, bien qu'elle progresse encore significativement aux jours 0 et 14 postnataux. Nos résultats témoignent aussi d'un maintien complet de cette ségrégation lorsque les neurones striataux sont mis en culture aussi bien en présence ou en absence de neurones corticaux et/ou mésencéphaliques. Ensuite, nous montrons que la présence de neurones mésencéphaliques stimule la formation d'épines et de synapses excitatrices sur les neurones striataux épineux exprimant le récepteur D2 (MSN-D2). Le co-phénotype glutamatergique des neurones dopaminergiques semble nécessaire à une grande partie de cet effet. Par ailleurs, le nombre total de terminaisons excitatrices formées sur les MSN-D2 par les neurones corticaux et mésencéphaliques apparaît être régi par un équilibre dynamique. Finalement, nous démontrons que le blocage de la signalisation des récepteurs D1 et D2 de la DA n'est pas nécessaire pour la formation des synapses excitatrices des MSN-D2, alors que l'antagonisme des récepteurs glutamatergiques ionotropes diminue la densité d'épines dendritiques et contrôle de façon opposée le nombre de terminaisons excitatrices corticales et mésencéphaliques. Globalement, ce travail représente une contribution significative pour une meilleure compréhension du fonctionnement normal du système DAergique. Ces découvertes sont susceptibles d'être utiles pour mieux comprendre les dysfonctions de ce système dans le cadre de pathologies du cerveau comme la maladie de Parkinson.

Mots-clés : Dopamine, neurotensine, récepteurs, désensibilisation, internalisation, ségrégation, synaptogénèse.

Abstract

Dopamine (DA) is a neurotransmitter involved in the modulation of essential brain functions such as control of voluntary movements, the reward system and certain aspects of cognition. Since its discovery, DA has attracted a lot of attention, in part because of the severe pathologies associated with dysfunctions in the DAergic system such as Parkinson's disease, schizophrenia and substance abuse. In the brain, the majority of DAergic neurons are found in the substantia nigra pars compacta (SNc) and the ventral tegmental area (VTA), two nuclei of the ventral mesencephalon. These neurons project their axons in a dense network of DAergic fibers that form three major pathways: the nigrostriatal, mesolimbic and mesocortical pathways.

DAergic transmission is accomplished by the activation of DAergic receptors that are part of the G protein-coupled receptor family. These receptors are abundantly expressed by DAergic target neurons and DAergic neurons themselves, which implicates that the comprehension of DAergic signaling and specific receptor function pre- and postsynaptically is a crucial aspect in the study of DA. This thesis is thus divided into two distinct parts: the first part addresses the regulation of presynaptic D2 receptor function by neurotensin, a neuropeptide intimately associated with the modulation of the DAergic system; the second part addresses the postsynaptic influences of DA, looking specifically at the segregation of DAergic receptor expression in the developing striatum and the function of these receptors in the establishment of neuronal excitatory connections in this region.

In the first part of this thesis, we demonstrate that the activation of the high affinity neurotensin receptor, NTR1, induces heterologous D2 receptor internalization, with some particular differences in the amplitude and kinetics between the two D2 isoforms. This internalization is dependent on protein kinase C activity (PKC), and we demonstrate that overexpression of a D2 receptor with mutations on PKC phosphorylation sites and the knockdown of β -arrestin1 by interfering RNAs in cultured DAergic neurons completely abrogates the functional interaction between the NTR1 and the D2.

In the second part of this thesis, we first demonstrate that D1 and D2 DAergic receptor segregation is already well established in the striatum by embryonic day 18, even if it still progresses significantly through postnatal days 0 and 14. Our results also show complete maintenance of this segregation in cultured MSNs either with or without cortical and/or mesencephalic neurons. Next, we demonstrate that the presence of mesencephalic neurons stimulates excitatory synapse formation on D2-expressing striatal medium spiny neurons (D2-MSNs). The conditional genetic deletion of the glutamatergic co-phenotype of DA neurons prevents much of this effect, and thus glutamate corelease by DA neurons seems to play an important role in excitatory synapse formation in the striatum. We also find that the establishment of excitatory terminals by cortical and mesencephalic neurons is regulated by a dynamic equilibrium. Finally, we show that chronic DA receptor blockade is not required for D2-MSN synaptogenesis, but chronic glutamatergic receptor blockade decreases dendritic spine formation and regulates cortical and mesencephalic glutamatergic synapses in an opposite manner. Globally, this work represents a significant contribution to a better understanding of the normal functioning of the DAergic system. These discoveries could prove useful to better understand the dysfunctions of this system in the context of brain pathologies such as Parkinson's disease.

Keywords: Dopamine, neurotensin, receptors, desensitization, internalization, segregation, synaptogenesis.

Table des matières

Partie 1: La dopamine.....	2
1.1 Aspect historique.....	2
1.2 Anatomie des voies DAergiques.....	3
1.3 Biochimie de la DA: de la synthèse à la dégradation.....	4
Partie 2: Récepteurs de la dopamine.....	6
2.1 Aspect historique.....	6
2.2 Expression des récepteurs DAergiques dans le cerveau.....	10
2.3 Signalisation des récepteurs de la dopamine.....	12
2.3.1 Généralités sur les RCPGs.....	12
2.3.2 Adénylate cyclase.....	12
2.3.3 Canaux ioniques.....	14
2.4 Désensibilisation des récepteurs de la dopamine.....	18
2.4.1 Principes généraux de la désensibilisation homologue des RCPGs.....	18
2.4.2 Désensibilisation homologue des récepteurs de la dopamine.....	20
2.4.3 Désensibilisation hétérologue des récepteurs de la dopamine.....	22
Partie 3: La neurotensine.....	25
3.1 Généralités.....	25
3.2 Récepteurs de la NT.....	27
3.3 Modulation du système DAergique par la NT.....	28
Partie 4: Le striatum.....	31
4.1 Généralités.....	31
4.2 Les MSNs.....	33
4.2.1 Généralités sur les synapses excitatrices.....	34
4.2.2 Synapses excitatrices des MSNs.....	37
4.3 La DA dans le striatum.....	38
4.3.1 Distribution des récepteurs de la dopamine dans le striatum.....	38

4.3.2 Régulation de l'activité des MSNs par la DA.....	41
4.3.3 La maladie de Parkinson: un exemple de plasticité pathologique	42
4.3.4 Formation des synapses excitatrices des MSNs	45
Partie 5: Problématique et hypothèses.....	48
Article 1.....	51
Article 2.....	91
Article 3.....	115
Discussion	147
1: Interaction fonctionnelle entre le NTR1 et l'autorécepteur D2.....	147
1.1 Désensibilisations homologue et hétérologue dans les HEK-293.....	148
1.2 Différences entre les deux isoformes du récepteur D2.....	149
1.3 Phosphorylation directe du récepteur D2 par la PKC	150
1.4 Protéines impliquées dans le mécanisme d'interaction NTR1-D2	151
1.5 Désensibilisation fonctionnelle et/ou internalisation?	152
1.6 Pertinence de nos données dans un contexte pathologique.....	153
2: Établissement et maintien de la ségrégation de l'expression des récepteurs D1 et D2 dans le striatum.....	156
2.1 Ségrégation D1/D2 dans le striatum à différents âges	156
2.2 Mécanismes d'induction et de maintien de la ségrégation D1/D2	159
3: Rôle des neurones DAergiques dans la formation des synapses excitatrices sur les MSNs exprimant le récepteur D2	161
3.1 Effet des neurones DAergiques: rôle du glutamate?	162
3.2 Équilibre des afférences excitatrices et corrélation avec l'activité électrique	165
3.3 Signalisation DAergique versus glutamatergique.....	166
Conclusion.....	170
Bibliographie	172

Liste des figures

Figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Principaux noyaux DAergiques dans le cerveau de rongeur en développement	4
Figure 2	Voies biochimiques de la synthèse des catécholamines	5
Figure 3	Reproduction de la célèbre expérience d'Otto Loewi par R. H. Kahn	7
Figure 4	La DA appliquée dans les homogénats de striatum	9
Figure 5	Principales voies de signalisation des récepteurs DAergiques de type D1 et D2	17
Figure 6	Principes généraux de la désensibilisation homologue des RCPGs	20
Figure 7	Principaux circuits de la NT dans le cerveau de rongeur	26
Figure 8	Anatomie des principales voies entrantes et sortantes du striatum	33
Figure 9	Exemples d'épines dendritiques de morphologies différentes	36
Figure 10	Tranches sagittales de cerveaux de souris transgéniques BAC D1- et D2-GFP	40
Figure 11	Régulation des synapses corticostriatales par la DA	42
A1 Figure 1	NT induces D2S internalization in transfected HEK-293 cells	78
A1 Figure 2	NT-induced D2R internalization in transfected HEK-293 cells is PKC-dependent	80
A1 Figure 3	Mutation of D2S PKC phosphorylation sites prevents NT-mediated reduction in D2R function in cultures DA neurons	82
A1 Figure 4	Knockdown of β -arr1, Dyn1 and Dyn2 in cultured DA neurons	84
A1 Figure 5	Knockdown of β -arr1 and Dyn2 but not Dyn1 prevents Quin-mediated reduction in D2R function in cultured DA neurons	85
A1 Figure 6	Knockdown of β -arr1 but not Dyn2 or Dyn1 prevents the ability of	87

	NT to reduce D2R function in cultured DA neurons	
A2 Figure 1	Distribution of D1 and D2 reporter proteins in mouse striatal sections reveals extensive segregation	108
A2 Figure 2	Distribution of D1 and D2 reporter proteins in acutely dissociated mouse striatal sections reveals age-dependent increase in segregation	110
A2 Figure 3	Segregation of D1 and D2 reporter proteins is maintained in postnatal striatal neurons in primary culture	112
A3 Figure 1	Analysis of four different culture conditions	140
A3 Figure 2	Analysis of CoMs cultures with a cKO of VGLUT2 in Daergic neurons	142
A3 Figure 3	Analysis of 3x culture condition after chronic treatments with Daergic receptor antagonists	143
A3 Figure 4	Analysis of 3x culture condition after chronic treatments with glutamatergic receptor antagonists	144

Liste des abréviations

DA	Dopamine
SNc	Substance noire compacte
ATV	Aire tegmentale ventrale
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
NT	Neurotensine
PKC	Protéine kinase C
MSN	<i>Medium spiny neuron</i>
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
MOA	Monoamine oxydase
TH	Tyrosine hydroxylase
VMAT	<i>Vesicular monoamine transporter</i>
DAT	<i>Dopamine transporter</i>
COMT	Catéchol-o-méthyl transférase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	ARN messenger
D2S	D2 court
D2L	D2 long
SNr	Substance noire réticulée
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
PLC	Phospholipase C
PKA	Protéine kinase A
CREB	<i>Cyclic AMP response element binding protein</i>
PP-1	<i>Protein phosphatase 1</i>
DARPP-32	<i>Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDA</i>
IP3	Inositol triphosphate
GIRK	<i>G protein-coupled inward rectifying potassium channel</i>
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
β-arr1	bêta-arrestine 1
KO	<i>Knock out</i>
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PC	Pro-protéine convertase

GPI	Globus pallidus interne
GPe	Globus pallidus externe
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
PLT	Potentialisation à long terme
CamKII	Protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante
VGLUT	<i>Vesicular glutamate transporter</i>
6-OHDA	6-hydroxydopamine
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
mEPSC	<i>Miniature excitatory post-synaptic current</i>
cKO	<i>Conditionnal knock out</i>

*The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries, is not
"Eureka!", but "That's funny..."*

- Isaac Asimov

Remerciements

J'aimerais remercier le Dr Louis-Éric Trudeau de m'avoir accueilli dans son laboratoire et fait confiance durant toutes ces années d'apprentissage. Merci aussi à tous les membres du labo Trudeau qui m'ont enduré/supporté durant les bons et les mauvais moments. Je suis particulièrement reconnaissant envers Marie-Josée Bourque pour ses prouesses techniques et humaines, ainsi que pour son amitié. Je tiens aussi à souligner l'important apport de mes parrains, Dr Jean-Claude Lacaille et Dre Graciela Pineyro, qui m'ont aussi beaucoup aidé. Merci aux membres de mon jury de thèse, Dre Nicole Leclerc, Dre Anne McKinney et Dr Pierre Blanchet; j'espère que la lecture de cette thèse vous sera agréable! Je souhaite aussi remercier tous mes amis et mes proches, notamment mon meilleur ami Martin Lefebvre qui a su contribuer à maintenir mon équilibre mental, et surtout Dre Caroline Fasano, ma meilleure moitié et sans doute la plus belle découverte de mes années de recherche. Finalement, merci à mes parents de m'avoir soutenu et d'avoir toléré mes absences. Vous trouverez dans cet ouvrage le fruit de mes efforts les plus sincères.

Introduction

Cette thèse vise à mieux comprendre la régulation et les fonctions du système dopaminergique (DAergique) du cerveau. La DA est un neurotransmetteur qui fait partie de la famille des catécholamines. Les neurones DAergiques se situent principalement dans la SNc et l'ATV du mésencéphale ventral. Les axones de ces neurones se retrouvent dans des régions cibles incluant le striatum, le noyau accumbens et le cortex préfrontal, régions où la DA régule des fonctions essentielles telles que les mouvements volontaires, la motivation et la cognition. De nombreuses pathologies sont associées à des défaillances de la neurotransmission DAergique. Par exemple, la schizophrénie est une maladie psychiatrique qui se caractérise par un dérèglement de la signalisation DAergique centrale et dont on traite les principaux symptômes avec des antagonistes pharmacologiques de certains récepteurs DAergiques. La maladie de Parkinson, quant à elle, résulte d'une dégénérescence progressive et sélective des neurones DAergiques de la SNc, ce qui a pour effet de diminuer drastiquement les concentration striatales de DA et de provoquer des symptômes moteurs tels que la bradykinésie, des tremblements et des dyskinésies.

Cette thèse se divise en deux volets relativement distincts, mais intrinsèquement reliés dans notre objectif de mieux comprendre le système DAergique au niveau pré- et postsynaptique. D'abord, nous explorerons les détails historiques, anatomiques et fonctionnels de la DA et de ses récepteurs, pour introduire le sujet de la régulation de l'autorécepteur DAergique par la neurotensine, un neuropeptide connu pour son influence importante sur le système DAergique. Ensuite, nous aborderons en détails le sujet des ganglions de la base et de la régulation de l'activité du striatum par la DA en provenance de la voie striatonigrale, pour traiter de l'étude du rôle des afférences DAergiques dans la formation des synapses excitatrices du striatum.

Partie 1: La dopamine

1.1 Aspect historique

La dopamine (DA) fit son entrée dans l'histoire lorsqu'elle fut synthétisée pour la toute première fois par Barger et Ewens, en 1910. Initialement, elle n'attira pas tellement l'attention des chercheurs et ce n'est que plusieurs années plus tard, en 1938, que Holtz fit la découverte de l'enzyme DOPA décarboxylase responsable de convertir la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) en DA. Cette découverte fut importante en soi puisqu'elle mena directement au postulat de Blaschko, en 1939, proposant la voie de synthèse des catécholamines qui attribuait à la L-DOPA et la DA des rôles de précurseurs de la noradrénaline et de l'adrénaline. Toutefois, en 1942, Holtz effectua une curieuse observation: contrairement à la noradrénaline, la DA diminue la pression vasculaire, ce qui suggérait que cette dernière pourrait avoir des effets distincts (Hornykiewicz, 1966). Holtz, incrédule face à ses propres résultats, attribua plutôt ce phénomène à un effet indirect des métabolites de la DA produits par la monoamine oxydase (MAO), une des enzymes de dégradation de la dopamine. Cependant, dans les années 50, Hornykiewicz démontra que l'emploi d'un inhibiteur de la MOA provoque une augmentation des effets hypotenseurs de la DA, excluant ainsi toute implication des métabolites. Ces travaux furent les premiers à démontrer un rôle spécifique de la DA dans un phénomène physiologique distinct (Hornykiewicz, 1958, 2002)

La fin des années 50 marqua l'histoire de la neurologie par l'établissement d'un lien entre la DA et le cerveau, et ce plus particulièrement dans le contexte général de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. En 1957, Montagu exposa la présence abondante de catécholamines dans le cerveau en affirmant qu'une bonne partie de ce signal pourrait être de la DA (Montagu, 1957). À peine quelques mois plus tard, en 1958,

Carlsson démontra que la DA est bel et bien présente dans des cerveaux de lapins grâce à une technique fluorimétrique plus sensible qui permet la distinction claire entre la DA et les autres catécholamines (Carlsson et al., 1958). Dans la même étude, Carlsson rapporta que le contenu en DA est fortement diminué dans le cerveau de lapins traités à la réserpine, effet similaire à celui sur les concentrations cérébrales de noradrénaline. Toutefois, il démontra aussi qu'une injection de L-DOPA, connue pour renverser les effets centraux de la réserpine, augmente dramatiquement le niveau de DA dans le cerveau tout en n'ayant qu'un effet modeste sur les concentrations de noradrénaline (Carlsson et al., 1958). L'année suivante, deux études identifièrent le striatum comme le site exhibant les concentrations de DA les plus importantes dans le cerveau de plusieurs espèces, dont l'humain (Bertler and Rosengren, 1959; Sano et al., 1959). Ces travaux classiques de la fin des années 50 représentent indubitablement la pierre d'assise de la grande histoire de la recherche sur la DA.

1.2 Anatomie des voies DAergiques

De nombreuses études faisant appel à des techniques variées ont porté sur l'anatomie du système DAergique du cerveau. La méthode d'histofluorescence (*formaldehyde induced fluorescence*), aussi connue sous le nom de technique « Falck-Hillarp » en l'honneur des scientifiques l'ayant mise au point, permet d'abord la visualisation des catécholamines directement dans les cellules nerveuses de rat afin d'établir la distribution des neurones dits « DAergiques » selon une classification classique des noyaux A1 à A17 (Dahlstrom and Fuxe, 1964), toujours utilisée aujourd'hui. Après l'identification de la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme limitante de la synthèse de la DA qui convertit la tyrosine en L-DOPA (Nagatsu et al., 1964; Molinoff et Axelrod, 1971), et grâce aux nouveaux développements des techniques d'immunofluorescence, il fut possible de cibler précisément les noyaux DAergiques et d'en cerner les principaux circuits anatomiques. Les voies DAergiques dites « centrales » émergeant du mésencéphale se divisent en trois circuits plus ou moins distincts qui feront l'objet essentiel de cette thèse (Figure 1): 1- la

voie nigrostriée, qui origine de la substance noire compacte (SNc) et qui projette vers le striatum dorsal; 2- la voie mésolimbique, qui origine de l'aire tegmentale ventrale (ATV) et qui projette vers le système limbique incluant le striatum ventral (noyau accumbens); 3- la voie mésocorticale, qui origine de l'ATV et qui projette vers le cortex cérébral (Björklund et Dunnett, 2007).

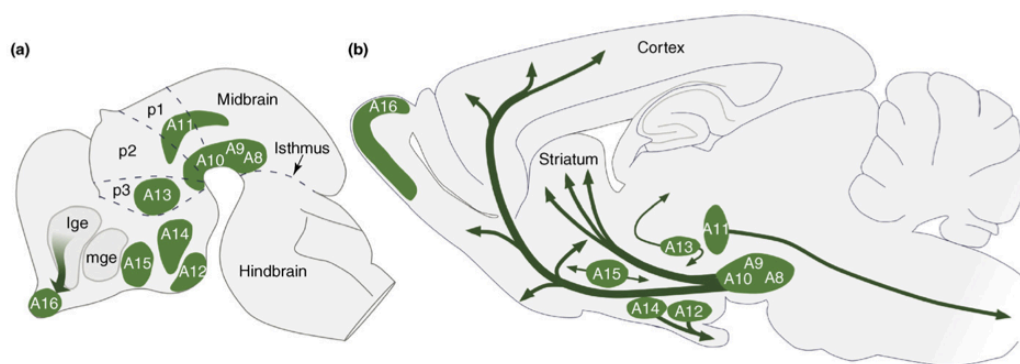


Figure 1: Principaux noyaux DAergiques dans le cerveau de rongeur en développement (a) et mature (b). Tiré de (Björklund and Dunnett, 2007).

1.3 Biochimie de la DA: de la synthèse à la dégradation

Les voies de synthèse des catécholamines sont aujourd'hui bien connues (Figure 2). L'acide aminé L-tyrosine est le précurseur commun pour la synthèse de toutes les catécholamines. La TH catalyse l'ajout d'un groupement hydroxyle sur l'anneau de benzène de la L-tyrosine pour créer la structure « catéchol » dans ce qui est l'étape limitante de la synthèse de la DA. À ce stade, la molécule obtenue est la L-DOPA qui, comme nous l'avons vu précédemment, est utilisée comme traitement pharmacologique dans la maladie de Parkinson. La dernière étape de la synthèse de la DA est la décarboxylation de la L-DOPA en DA, effectuée par l'enzyme DOPA décarboxylase.

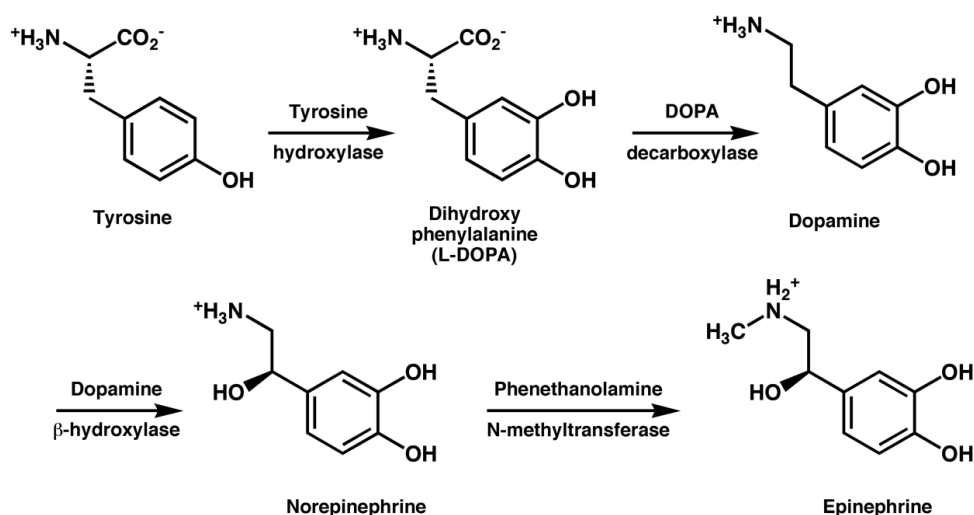


Figure 2: Voies biochimiques de la synthèse des catécholamines. Tiré de http://fr.academic.ru/pictures/frwiki/84/Tyrosine_metabolism.png.

La DA synthétisée est emmagasinée dans les vésicules synaptiques grâce à un transporteur vésiculaire nommé VMAT (pour *vesicular monoamine transporter*). En réponse à l'activité électrique d'un neurone DAergique, les vésicules synaptiques chargées en DA peuvent fusionner avec la membrane plasmique pour libérer la DA à partir des terminaisons axonales et du compartiment somato-dendritique. Une fois dans le milieu extracellulaire, la DA interagit avec des récepteurs pré- ou postsynaptiques très sélectifs de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), responsables de diverses formes de neuromodulation par l'activation de cascades de signalisations intracellulaires. Ces récepteurs DAergiques, au nombre de 5, peuvent être classifiés dans 2 catégories selon leur structure et leurs voies de signalisations respectives: le type D1, regroupant les récepteurs D1 et D5, et le type D2 regroupant les récepteurs D2, D3 et D4 (les récepteurs DAergiques feront l'objet d'une description détaillée dans la deuxième partie de l'introduction). Enfin, la neurotransmission DAergique est interrompue lorsque la DA est recapturée par le transporteur membranaire DAT (pour *DA transporter*) exprimé par les neurones DAergiques, ou lorsque la DA est dégradée par les enzymes MAO (MAO-A et MAO-B) ou la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT).

Partie 2: Récepteurs de la dopamine

2.1 Aspect historique

De prime abord, il peut sembler évident de traiter du thème de ses récepteurs dans l'étude d'un neurotransmetteur. Toutefois, il est intéressant de préciser qu'à l'époque où la DA fut identifiée comme substance sécrétée par et agissant sur le cerveau, la plupart des membres de la communauté scientifique croyaient toujours que les neurones du système nerveux communiquaient entre eux principalement par le biais de changements dans le champs électrique synaptique plutôt que par transmission chimique (Greengard, 2001; Iversen and Iversen, 2007). Il était pourtant bien reconnu que certaines substances chimiques peuvent avoir des effets sur le système nerveux, particulièrement dans la périphérie, mais le mécanisme d'action de ces substances représentait bien souvent une mystérieuse boîte noire. Pourtant, les premières mentions du concept de « récepteur » pour une substance chimique datent du tout début du 20^e siècle, alors que le physiologiste anglais John Newport Langley décrivit les effets de la nicotine et du curare à la jonction neuromusculaire. Dans son modèle expérimental, il fit l'observation que la nicotine provoque une contraction musculaire alors que le curare bloque les effets de la nicotine, mais pas ceux d'une stimulation électrique du muscle, et ce même après la dégénérescence du nerf qui innerve le muscle en question. Il en conclut que la nicotine et le curare agissent sur la même *substance réceptrice* située dans le muscle et dont la fonction est de recevoir le stimulus pour le transmettre à la *matière contractile* (Langley, 1905). En 1921, Otto Loewi démontra, par une célèbre expérience (Figure 3) dont il aurait apparemment eu l'inspiration dans un rêve, que la stimulation du nerf vague diminue la fréquence cardiaque par la sécrétion d'une substance chimique qu'il nomma « Vagusstoff » (*substance vagale*), plus tard identifiée comme étant l'acétylcholine (Davenport, 1991).

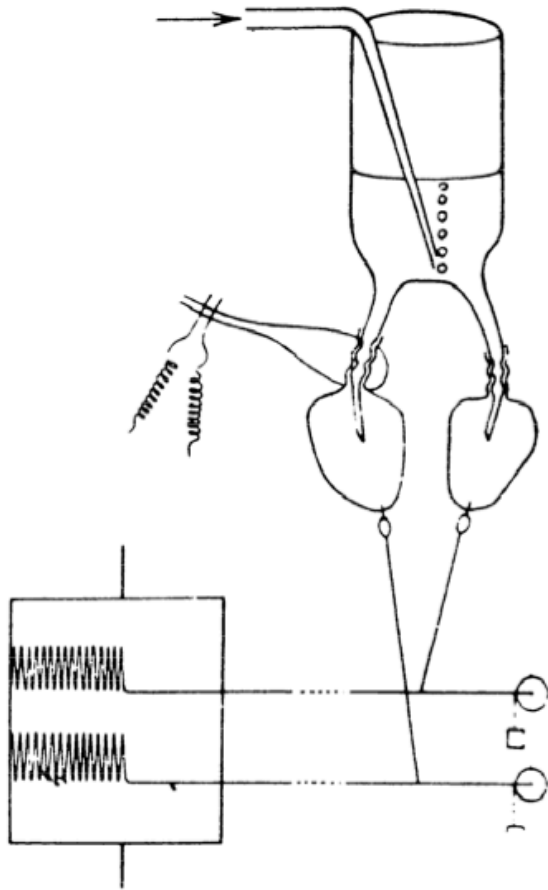


Figure 3: Reproduction de la célèbre expérience d'Otto Loewi par R. H. Kahn. La stimulation électrique du nerf vague diminue la fréquence de battements du cœur qu'il innerve (à gauche), mais également du cœur qui baigne dans la même solution, sans être innervé par le nerf (à droite). Tiré de (Davenport, 1991)

Malgré ceci, le débat sur la nature de la neurotransmission se poursuivit jusqu'au milieu du 20^e siècle, animé par des scientifiques renommés: d'un côté, Henry Hallett Dale soutenait sa nature chimique alors que John Carew Eccles défendait plutôt sa nature électrique (Davenport, 1991). Le débat était toujours d'actualité dans les années 50 et 60, mais le côté chimique commençait à prendre lentement le dessus grâce, notamment, aux fameux travaux de Bernard Katz et de ses collègues sur la relâche quantique de neurotransmetteurs à la jonction neuromusculaire (Fatt and Katz, 1950; Katz and Miledi, 1965).

Même après l'acceptation générale de l'importance de la neurotransmission chimique, le concept de récepteur demeurait relativement vague à cause des limitations techniques de l'époque. Malgré tout, grâce à l'essor remarquable de la pharmacologie et de la biochimie, de nombreuses expériences menèrent à des avancées appréciables dans la compréhension de plusieurs mécanismes importants de la neurotransmission dans le cerveau. En ce qui concerne la DA, l'identification de substances pharmacologiques aux « effets antagonistes » comme l'halopéridol et la chlorpromazine (premières molécules utilisées comme antipsychotiques) permit de cerner peu à peu les caractéristiques de l'hypothétique « récepteur à DA » (Carlsson and Lindqvist, 1963; Ungerstedt et al., 1969), sans toutefois pouvoir identifier précisément sa nature exacte. Au début des années 70, le groupe de Paul Greengard observa une importante augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans les ganglions cervicaux supérieurs du lapin après stimulation de ses fibres afférentes (McAfee et al., 1971). Puisque cette région contient une concentration importante de DA, ils testèrent ensuite les effets de l'application de DA sur les niveaux d'AMPC dans un bloc de tissus bovin contenant les ganglions cervicaux supérieurs (Kebabian et Greengard, 1971). Tel qu'anticipé, ils observèrent que la DA provoque une augmentation des niveaux d'AMPC très nette, ce qui les mena à postuler qu'une adénylate cyclase (l'enzyme de synthèse de l'AMPC) sensible à la DA pouvait être le « récepteur biochimique » de la DA. Ils entreprirent donc logiquement de poursuivre leurs études dans le striatum, la région du cerveau où l'on trouve la plus forte concentration de DA (Figure 4). Ainsi, ils constatèrent que de très faibles doses de DA suffirent pour augmenter les niveaux d'AMPC dans des homogénats de striatum de rat et que cet effet est bloqué par l'halopéridol et la chlorpromazine (Kebabian et al., 1972).

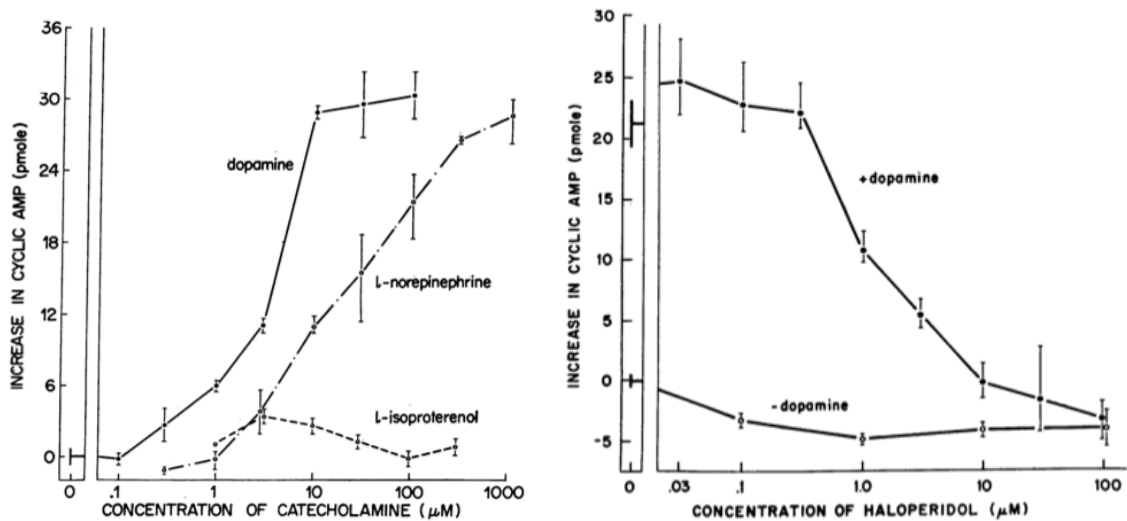


Figure 4: La DA appliquée dans des homogénats de striatum produit une augmentation dans les concentrations d'AMPc (gauche) qui est bloquée par l'halopéridol (droite). Tiré de (Kebabian et al., 1972).

Toutefois, des études réalisées au cours des années suivantes démontrèrent que toutes les fonctions de la DA ne sont pas associées avec la régulation d'une adénylate cyclase sensible à la DA, comme l'inhibition de la libération de prolactine des cellules lactotrophes de la glande pituitaire et les effets présynaptiques de la DA par ce qu'on appelait déjà les « autorécepteurs » DAergiques (Kebabian and Calne, 1979). Ceci suggérait l'existence d'au moins deux types de récepteurs à DA différents, qui furent désignés pour la toute première fois par l'appellation D1 (régulant l'adénylate cyclase) et D2 (ne régulant pas l'adénylate cyclase) par Kebabian et Calne en 1979 (Kebabian et Calne, 1979). Le type D2 fut plus précisément décrit et caractérisé par la suite comme inhibiteur de l'adénylate cyclase (De Camilli et al., 1979; Onali et al., 1981; Stoof et Kebabian, 1984). Il s'agit d'une réalisation importante dans le domaine de la recherche sur la DA puisqu'il devint dès lors possible d'identifier des fonctions spécifiques et de cribler des molécules pharmacologiques sélectives sur l'un ou l'autre des deux types de récepteurs DAergiques selon les effets biochimiques mesurés.

La prochaine grande avancée dans l'étude des récepteurs DAergiques se produisit grâce à l'application des techniques de biologie moléculaire. Le clonage moléculaire permit de déterminer les séquences d'ADN de tous les récepteurs DAergiques. Le récepteur D2 fut le premier à être cloné chez le rat en 1988 (Bunzow et al., 1988), puis le clonage du D1 chez l'humain et le rat suivirent en 1990 et furent publiés simultanément par plusieurs groupes (Dearry et al., 1990; Monsma et al., 1990; Sunahara et al., 1990; Zhou et al., 1990). On découvrit ensuite des séquences pour trois autres récepteurs DAergiques: le D3 (Sokoloff et al., 1990) et le D4 (Van Tol et al., 1991) qui furent classés dans la famille des récepteurs DAergiques de type D2, et le D5 (Grandy et al., 1991; Sunahara et al., 1991; Tiberi et al., 1991; Weinshank et al., 1991) qui fut classé dans la famille du type D1. Le clonage des récepteurs DAergiques représente une étape particulièrement marquante dans la caractérisation de la neurotransmission DAergique puisqu'il ouvrit la porte vers l'application de nouvelles techniques de biologie moléculaire telles que l'hybridation *in situ* et le *polymerase chain reaction* (PCR), de même que l'expression de l'ADN complémentaire dans des lignées cellulaires, qui permirent respectivement de cartographier l'expression et de faciliter l'étude pharmacologique et biochimique de chacun des sous-types de récepteurs (Gingrich and Caron, 1993).

2.2 Expression des récepteurs DAergiques dans le cerveau

Le récepteur D1 est celui qui est le plus abondamment exprimé dans le cerveau. On retrouve son ARN messenger (ARNm) dans les corps cellulaires de neurones situés dans le noyau caudé-putamen (striatum), le noyau accumbens, le tubercule olfactif, l'amygdale et le cortex frontal. Le D1 est aussi présent, mais en plus faibles concentrations, dans l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus et le cervelet. Comparée à celle du D1, l'expression du D5 est beaucoup plus restreinte et moins abondante. On retrouve son ARNm surtout dans les corps mammillaires, le thalamus et l'hippocampe, de même que plus faiblement dans le noyau caudé-putamen et le noyau accumbens. L'ARNm du D2 est le deuxième plus abondamment exprimé des récepteurs DAergiques et on le retrouve dans le

noyau caudé-putamen, le noyau accumbens, le tubercule olfactif, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, le septum et l'amygdale. De plus, il est aussi très abondant dans le mésencéphale ventral, dans les corps cellulaires des neurones DAergiques de la SNc et de l'ATV. La présence du récepteur D2 sur la membrane plasmique des neurones DAergiques eux-mêmes le place dans une position où il peut agir comme autorécepteur pour réguler l'activité de ces neurones, comme nous le verrons plus loin en détails. Par ailleurs, le D2 existe en deux versions différentes produites par épissage alternatif de son ARN (Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989): le D2 court (D2S pour *short*) et le D2 long (D2L). Certaines études anatomiques et fonctionnelles démontrent que le D2S est surtout exprimé dans les neurones DAergiques où il agirait comme autorécepteur, alors que le D2L serait le plus abondant post-synaptiquement dans les régions cibles des afférences DAergiques (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000; Lindgren et al., 2003). L'expression de l'ARNm du D3 se limite quant à elle principalement au système limbique du cerveau, notamment dans la coquille du noyau accumbens, dans le tubercule olfactif et dans les îlots de Calleja. On détecte aussi de faibles niveaux de D3 dans le noyau caudé-putamen, la SNc, l'ATV, le septum et le cortex. Finalement, le D4 est le récepteur DAergique le moins abondant, alors qu'on retrouve son ARNm principalement dans le cortex frontal, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus, la substance noire réticulée (SNr), le pallidum, le thalamus et le noyau caudé-putamen (Gingrich and Caron, 1993; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Gerfen and Surmeier, 2011). Finalement, il est intéressant de préciser qu'il existe un certain chevauchement dans l'expression des différents types de récepteurs DAergiques au niveau régional et cellulaire, notamment dans le cas du D1 et du D2 dans le striatum. La question de la colocalisation au niveau cellulaire de ces deux récepteurs représente un sujet de recherche important, avec son lot de controverse, et sera abordé plus tard dans la section de l'introduction portant sur le striatum.

2.3 Signalisation des récepteurs de la dopamine

2.3.1 Généralités sur les RCPGs

Notons d'abord que tous les récepteurs DAergiques font partie de la grande famille des RCPGs. Les protéines G portent leur nom en raison de leur capacité à lier les nucléosides à bases de guanine comme la guanosine diphosphate et triphosphate (GDP et GTP). La liaison des protéines G avec la GDP ou GTP reproduit la fonction d'un « interrupteur moléculaire »: lorsqu'elles lient la GDP, elles sont inactives; lorsqu'elles lient la GTP, elles sont actives. Les protéines G consistent en un assemblage de 3 sous-unités distinctes, nommées α , β et γ , pour former un complexe hétérotrimérique couplé au RCPG. Le site de liaison avec la GDP ou la GTP se trouve sur la sous-unité α . Après l'activation du RCPG par son ligand, la protéine G va se dissocier du récepteur et se scinder en deux éléments de signalisation actifs: la sous-unité α (qui lie maintenant le GTP), et le complexe $\beta\gamma$ (Hamm et Gilchrist, 1996). Même s'il existe de nombreuses variétés de sous-unités α , β et γ , la classification des protéines G se base uniquement sur la nature de leurs sous-unités α , elles-mêmes divisées en quatre grandes familles selon leur principale fonction: α_s active l'adénylate cyclase, α_i inhibe l'adénylate cyclase, α_q active la phospholipase-C (PLC) et α_{12} active l'échange de nucléoside sur la kinase Rho (Gainetdinov et al., 2004). Ainsi, la signalisation des récepteurs DAergiques (Figure 5) dépendra principalement du type de protéine G auxquels ils sont associés.

2.3.2 Adénylate cyclase

Tel que mentionné précédemment, la première classification des récepteurs DAergiques en type D1 ou type D2 se fondait leur régulation de l'activité de l'adénylate cyclase et des niveaux d'AMPc (Kebabian et Calne, 1979). Il apparaîtra plus tard que cette propriété découle du couplage des récepteurs avec des protéines G de différentes natures. Dans le cas des récepteurs de type D1, leur couplage s'effectue principalement avec des

protéines G contenant la sous-unité alpha de type α_s , notamment la sous-unité α_{olf} qui est la plus abondamment exprimée dans le striatum et semble y être impliquée dans le couplage du récepteur D1 avec l'adénylate cyclase (Hervé et al., 1993). D'ailleurs, l'expression du récepteur D1 en lignées cellulaires a pu démontrer que son activation entraîne systématiquement une augmentation des niveaux d'AMPc. Il en va de même pour le D5, bien que celui-ci ait une activité constitutive indépendante de la DA- nettement plus élevée que son homologue. De leur côté, les récepteurs de type D2 se couplent principalement à des protéines G constituées de sous-unité α_i qui provoquent une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase et donc une diminution des niveaux d'AMPc, tel que démontré par l'expression des récepteurs D2, D3 et D4 dans des lignées cellulaires.

L'activité de nombreuses enzymes dépend directement des niveaux d'AMPc, ce qui en fait un régulateur important de l'activité cellulaire. Une de ces enzymes les mieux caractérisées est la protéine kinase dépendante de l'AMPc, mieux connue sous le nom de protéine kinase A (PKA). La PKA est une kinase pouvant phosphoryler les résidus sérines et thréonines de multiples protéines, dont notamment le facteur de transcription CREB (pour *cyclic AMP response element binding protein*). Dans le cerveau, la PKA régule l'état de phosphorylation de plusieurs protéines affectant les fonctions neuronales, tels que différents canaux ioniques et récepteurs ionotropes. Le contrôle précis de l'état de phosphorylation de ces protéines est assuré par les fonctions opposées des kinases et des phosphatases; dans le cas de la PKA, son activité est principalement contrebalancée par la phosphatase PP-1 (pour *protein phosphatase-1*). D'autres éléments peuvent aussi réguler l'équilibre entre les kinases et les phosphatases dont une protéine très abondante dans le striatum nommée DARPP-32 (pour *dopamine and cyclic AMP regulated phosphoprotein of 32 kDa*). DARPP-32 est en réalité un substrat de la PKA qui, une fois phosphorylé en position thréonine-34, peut inhiber la PP-1. Ce mécanisme d'amplification de l'activité de la PKA est un élément central des fonctions de la DA dans les ganglions de la base (Greengard et al., 1999).

2.3.3 Canaux ioniques

L'activation des récepteurs DAergiques peut entraîner la modulation de nombreux canaux ioniques. Ces protéines transmembranaires forment des pores sélectifs pour certaines espèces ioniques précises dont les changements de concentrations sont cruciaux pour l'activité cellulaire et neuronale. L'ouverture des pores est normalement régulée par différents types de stimuli, tels que la liaison d'un ligand (« récepteurs-canaux ») ou les changements dans le potentiel membranaire (canaux « voltages-dépendants »). On retrouve des canaux ioniques sur la membrane cytoplasmique, mais également sur les membranes d'organelles intracellulaires comme le réticulum endoplasmique.

Dans le cas des canaux ioniques se trouvant sur la membrane de réticulum endoplasmique, il existe des données contradictoires concernant la capacité des récepteurs DAergiques à moduler la relâche de calcium des réserves intracellulaires. Le mécanisme typique de cette relâche passe par une activation de la PLC, qui elle peut hydrolyser des lipides membranaires pour en former de l'inositol triphosphate (IP3). L'IP3 peut ensuite se lier à son récepteur, qui est en fait un canal calcique se trouvant dans la membrane du réticulum endoplasmique. La liaison de l'IP3 à son récepteur entraîne ainsi une élévation du calcium intracellulaire, alors que les ions se déplacent selon leur gradient de concentration de l'intérieur du réticulum endoplasmique au cytoplasme. Une telle activation de la PLC passe généralement par l'activation de protéines G contenant des sous-unités α_q , ce qui ne correspond pas à la signalisation classique des récepteurs DAergiques. Il semble tout de même que l'activation des récepteurs DAergiques dans certaines conditions (e.g.: type de lignée cellulaire, dose élevée d'agoniste) puisse moduler les niveaux d'IP3 et avoir un effet sur la relâche de calcium intracellulaire, mais il pourrait aussi s'agir d'un mécanisme régulé par la PKA (Missale et al., 1998; Beaulieu et Gainetdinov, 2011). Par ailleurs, des études récentes ont démontré un mécanisme alternatif par lequel un hétéromère D1-D2 se formerait dans des lignées cellulaires (Lee et al., 2004) ainsi que dans certaines régions du striatum (Rashid et al., 2007; Hasbi et al., 2009; Perreault et al., 2010). Étonnamment, le couplage de cet hétéromère s'effectuerait exclusivement avec une protéine $G\alpha_q$, permettant

ainsi l'activation de la cascade de signalisation de la PLC et la modulation des niveaux de IP3 et de calcium intracellulaire. Cependant, tel que mentionné précédemment et comme nous le verrons en détail dans la section sur le striatum, la colocalisation des récepteurs D1 et D2 dans le cerveau est relativement limitée. Toutefois, une incidence plus importante de cette colocalisation a été relevée dans des neurones du noyau accumbens (Rashid et al., 2007) et du cortex préfrontal (Zhang et al., 2010), ce qui mène à penser que cette voie de signalisation DAergique pourrait avoir une portée restreinte mais significative.

Les récepteurs DAergiques peuvent aussi moduler l'activité des canaux ioniques présents sur la membrane extracellulaire. Parmi les cas les mieux étudiés figure celui de la régulation des canaux calciques par le récepteur D1. En effet, il fut démontré que l'application d'un agoniste sélectif du récepteur D1 dans des tranches de striatum de rat diminue les courants passant à travers les canaux calciques de types N et P, alors qu'elle augmente les courants passant à travers les canaux calciques de type L (Surmeier et al., 1995). De plus, cette modulation des courants calciques par le récepteur D1 dépend de la voie de signalisation de l'AMPC, de la PKA et de la PP-1 (Surmeier et al., 1995). Une étude plus récente a aussi exposé un mécanisme d'interaction physique directe entre le récepteur D1 et le canal calcique de type N dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal chez le rat, ce qui entraîne l'inhibition et/ou l'internalisation du canal ionique par l'activation du D1 (Kisilevsky et al., 2008). De son côté, le récepteur D2 semble lui aussi capable de moduler la fonction des canaux de type L, cette fois-ci par un mécanisme d'inhibition des courants calciques qui dépend de la signalisation des sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G et d'une cascade d'activation impliquant l'activation de la PLC, l'augmentation des concentrations d'IP3 et l'activation de la phosphatase calcineurine (Hernandez-Lopez et al., 2000; Olson et al., 2005). La régulation des canaux de types N (Yan et al., 1997) et P/Q (Salgado et al., 2005) par le récepteur D2 a aussi déjà été démontrée.

Finalement, il est bien établi que les conductances potassiques sont régulées par l'activité des récepteurs DAergiques, particulièrement dans le cas du récepteur D2. La voie de signalisation associée à cette fonction du récepteur D2 implique la sous-unité $\beta\gamma$ des

protéines G qui agit directement sur les canaux potassiques de type GIRKs (pour *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*) afin d'en moduler les courants (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Que ce soit du côté postsynaptique dans les neurones striataux (Greif et al., 1995) et les cellules lactotrophes de la glande pituitaire (Einhorn et al., 1991), du côté présynaptique dans les neurones DAergiques (Lacey et al., 1987; Kim et al., 1995; Inanobe et al., 1999; Uchida et al., 2000) ou dans d'autres types cellulaires (Werner et al., 1996; Kuzhikandathil et al., 1998), l'activation du récepteur D2 entraîne généralement l'augmentation des courants potassiques, ce qui engendre une hyperpolarisation membranaire et une diminution de l'activité neuronale. D'ailleurs, au niveau présynaptique, la modulation des courants potassiques par l'auto-récepteur D2 s'opère sur deux fronts parallèles. Le premier implique les récepteurs D2 du compartiment somato-dendritique qui régulent le taux de décharge spontané des neurones DAergiques par l'activation des canaux GIRKs (White and Wang, 1984; Grace and Bunney, 1985; Uchida et al., 2000), tel que mentionné plus haut. Le deuxième cible plus précisément les auto-récepteurs D2 situés au niveau des terminaisons axonales, qui régulent spécifiquement la relâche de DA via une activation de canaux potassiques de types Kv (Fulton et al., 2011; Martel et al., 2011).

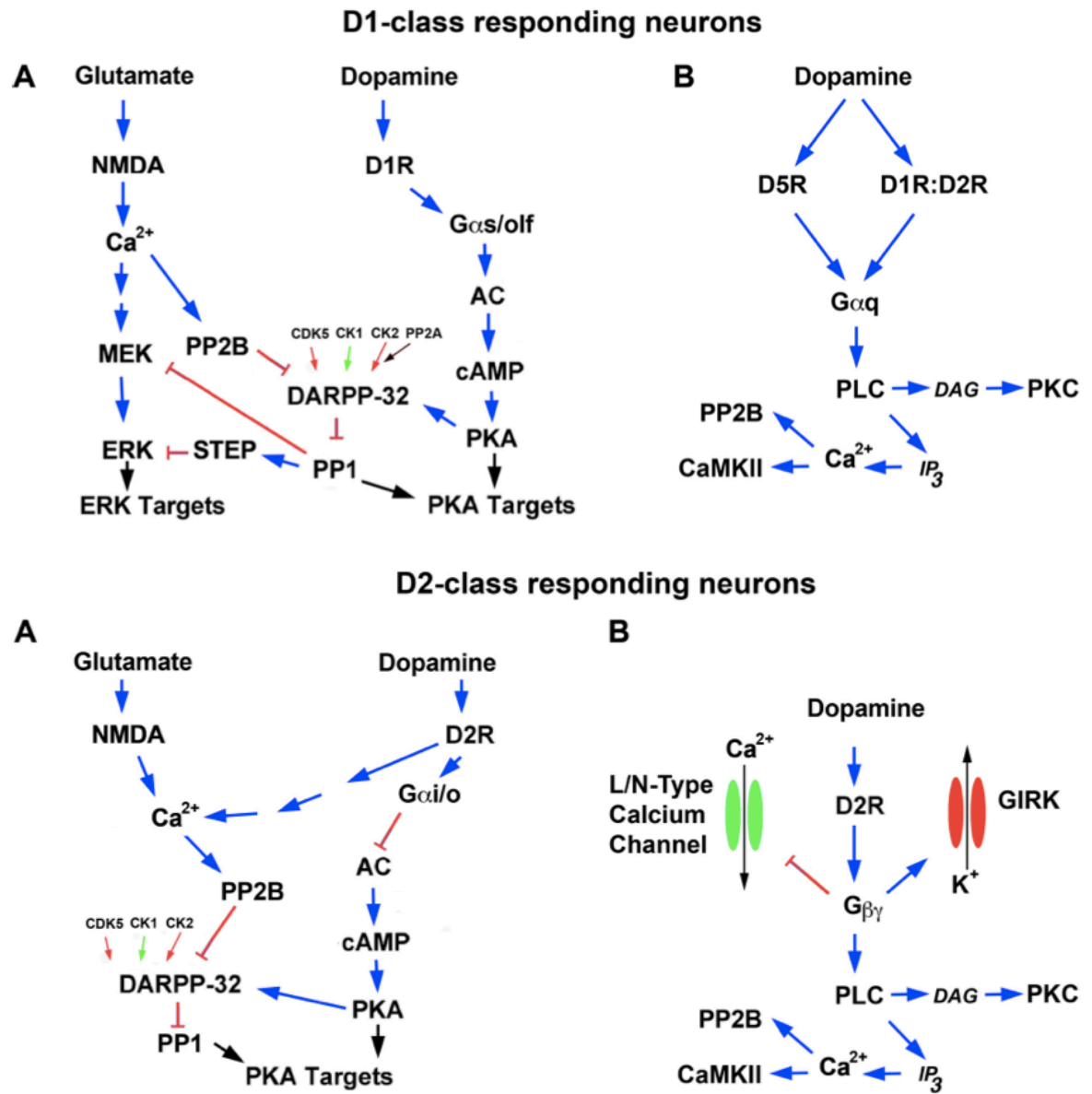


Figure 5: Principales voies de signalisation des récepteurs DAergiques de type D1 (haut) et D2 (bas). Tiré de (Beaulieu et Gainetdinov, 2011)

2.4 Désensibilisation des récepteurs de la dopamine

Comme nous l'avons vu plus tôt dans la section 1.3, le système DAergique possède des outils pour dégrader et recapturer la DA extracellulaire excédentaire afin de promouvoir la cessation de la signalisation et assurer un équilibre général dans l'activité du neurotransmetteur. Toutefois, il existe un niveau supplémentaire de régulation de la neurotransmission qui s'opère au niveau des récepteurs et qui porte le nom général de « désensibilisation ». Celle-ci se décrit largement comme la capacité des récepteurs à diminuer leur activité dans des conditions où leur agoniste est toujours disponible pour induire leur signalisation. Comme nous le verrons, les mécanismes généraux de désensibilisation des récepteurs DAergiques sont relativement similaires à ceux des autres membres de la grande famille des RCPGs, bien qu'ils comportent tout de même certaines spécificités. De plus, il arrive parfois qu'il y ait interaction entre plusieurs systèmes de neurotransmission ou voies de signalisations, de sorte que la désensibilisation d'un certain type de récepteur peut ne pas toujours dépendre de sa propre activation. Une distinction est alors faite entre la désensibilisation « homologue », qu'un récepteur entraînera pour lui-même après son activation, et la désensibilisation « hétérologue » causée par d'autres facteurs. Dans cette section, nous verrons d'abord les principes généraux qui s'appliquent à la désensibilisation homologue des RCPGs, pour ensuite entrer dans les détails spécifiques de la désensibilisation homologue et hétérologue des récepteurs DAergiques.

2.4.1 Principes généraux de la désensibilisation homologue des RCPGs

La désensibilisation des RCPGs (Figure 6) se divise en deux phases intimement associées d'un point de vue mécanistique, soit la désensibilisation fonctionnelle et l'internalisation des récepteurs. La désensibilisation fonctionnelle se caractérise par une diminution de l'efficacité d'un récepteur à enclencher ses voies de signalisations, alors que l'internalisation fait référence à une diminution par endocytose du nombre de récepteurs disponibles à la membrane extracellulaire. Lorsqu'un RCPG interagit avec son ligand et se

trouve dans sa conformation active, il devient alors un substrat pour une famille de kinases appelées GRKs (pour *G protein-coupled receptor kinases*). Ces kinases peuvent ainsi phosphoryler le récepteur sur des sites spécifiques de sa partie intracellulaire. La phosphorylation du récepteur permet ensuite le recrutement d'une autre famille de protéines appelées les arrestines qui, elles, vont se lier au RCPGs pour bloquer la liaison avec les protéines G, empêchant du même coup l'enclenchement d'autres cycles de signalisation en dépit de la présence et de la liaison de l'agoniste. Ces étapes correspondent aux mécanismes de la désensibilisation fonctionnelle. Les GRKs et les arrestines provoquent aussi le recrutement des facteurs impliqués dans l'internalisation des RCPGs via la clathrine et un complexe de protéines adaptatrices incluant AP2. L'angle particulier présent dans la structure de la clathrine fait en sorte que l'assemblage de plusieurs monomères entraîne la formation d'un puits membranaire contenant les récepteurs ciblés pour l'internalisation. Ce puits sera éventuellement clivé complètement de la membrane extracellulaire par l'entremise de l'activité d'une GTPase nommée dynamine, ce qui forme une vésicule d'endocytose intracellulaire. Après leur internalisation, les récepteurs peuvent suivre deux chemins différents: le recyclage membranaire ou la dégradation lysosomale. Donc, grâce à ces mécanismes contrôlant l'efficacité de leur signalisation et leur abondance membranaire, les RCPGs disposent d'un nombre appréciable de points de régulation pouvant maintenir l'équilibre de leurs fonctions ou les moduler.

Le génome humain contient les séquences encodant sept protéines GRKs différentes, regroupées d'un point de vue structural et fonctionnel en trois familles distinctes: GRK1 (GRK1/7), GRK2 (GRK2/3) et GRK4 (GRK4/5/6). On retrouve les membres de la famille GRK1 dans le système visuel, là où ils régulent l'activité des RCPGs appelés opsines, contenues exclusivement dans les cellules photoréceptrices et responsables de la perception de la lumière. Les autres GRKs sont exprimées de façon plus ubiquitaire et peuvent être regroupées dans une catégorie large des GRKs non-visuelles. Une catégorisation similaire existe aussi pour les quatre arrestines connues: les arrestines 1/4 forment le groupe des arrestines visuelles, et les arrestines 2/3 celui des non-visuelles. D'ailleurs, malgré la possibilité de confusion évidente, les arrestines 2/3 portent aussi le

nom de β -arrestine1 (β -arr1) et β -arrestine2 (β -arr2), respectivement, puisqu'elle se distinguèrent initialement par une plus grande affinité pour le récepteur β -adrénergique qu'avec les opsines du système visuel.

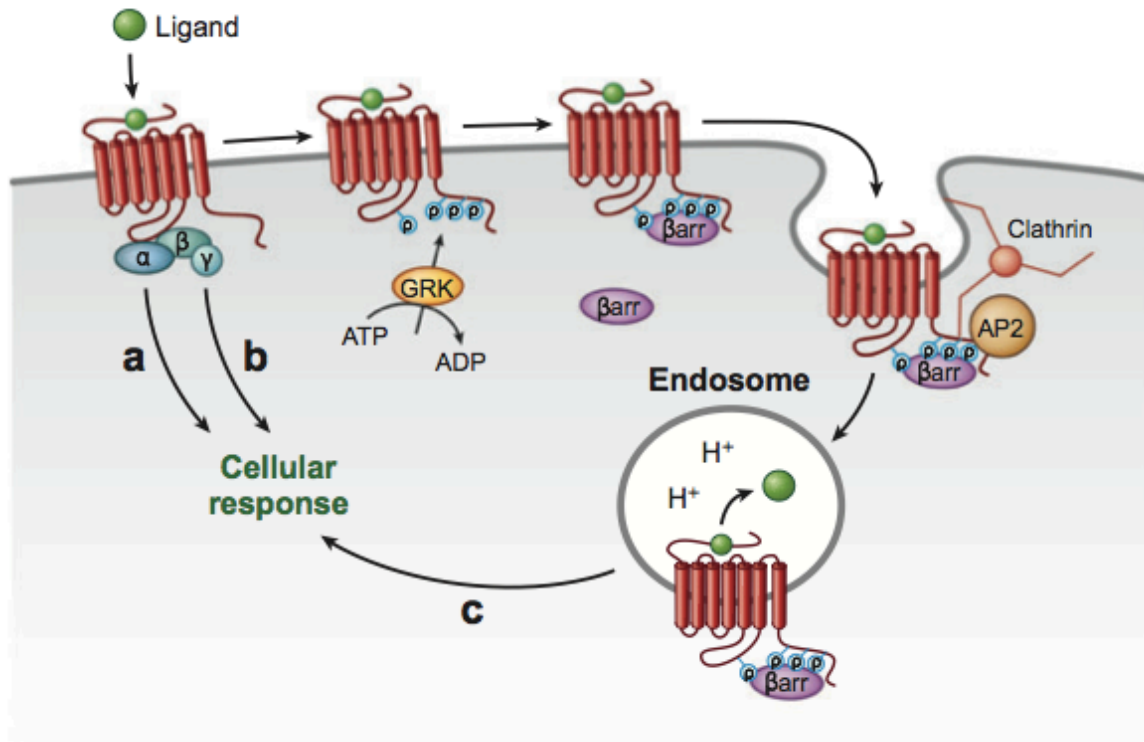


Figure 6: Principes généraux de la désensibilisation homologue des RCGPs. Tiré de (Hanyaloglu et Von Zastrow, 2008)

2.4.2 Désensibilisation homologue des récepteurs de la dopamine

La spécificité des mécanismes de désensibilisation homologue des différents RCPGs provient principalement de la diversité des protéines GRKs et arrestines. Parmi les GRK non-visuelles, la GRK4 est la seule qui ne soit pas exprimée abondamment dans le cerveau, bien qu'elle ait un rôle important à jouer dans le système DAergique rénal. Des

autres GRKs non-visuelles, GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6 sont toutes présentes dans les régions du système DAergique, mais l'expression de la GRK6 est la plus abondante dans le striatum, ce qui lui confère une importance particulière (Erdtmann-Vourliotis et al., 2001). D'ailleurs, des souris chez laquelle le gène de GRK6 a été inactivé (knock-out ;KO) exhibent une plus grande sensibilité de leur réponse locomotrice à la cocaïne et aux amphétamines, deux drogues connues pour augmenter les concentrations de DA extracellulaires (Gainetdinov et al., 2003). De plus, l'absence de GRK6 provoque un couplage plus efficace du récepteur D2 avec sa protéine G, mais pas du récepteur D1, ce qui semble être à la source des effets comportementaux observés chez l'animal KO (Gainetdinov et al., 2003). Même si les GRK2, GRK3 et GRK5 peuvent toutes réguler la fonction de récepteurs DAergiques dans des systèmes d'expression hétérologues (Tiberi et al., 1996; Ito et al., 1999; Iwata et al., 1999; Kabbani et al., 2002), les résultats obtenus dans des expériences *in vivo* ne permettent pas de conclure quant à leur rôle exact. En effet, le KO partiel de GRK2 chez la souris (hémizygote) ne provoque qu'une très légère augmentation de la sensibilité aux effets locomoteurs de la cocaïne (Gainetdinov et al., 2004), alors qu'un KO complet de GRK3 produit l'effet inverse (Gainetdinov et al., 2004) et que le KO complet de GRK5 n'altère pas la réponse aux drogues influençant le système DAergique (Gainetdinov et al., 1999). Finalement, dans des études *in vitro* d'expression en cellules hétérologues, il fut démontré qu'un récepteur D2 muté sur tous ses sites de phosphorylation par les GRK peut toujours lier les arrestines, se désensibiliser et s'internaliser suite à son activation (Namkung et al., 2009a). Il semble en effet que l'activité de phosphorylation de GRK2 soit nécessaire pour entraîner la désensibilisation du D2, mais que la phosphorylation du récepteur spécifiquement par les GRK régule plutôt le recyclage, et non sa désensibilisation (Namkung et al., 2009a, 2009b), ce qui suggère l'existence d'autres protéines intermédiaires dans le mécanisme de désensibilisation.

Du côté des arrestines, notons que les deux arrestines non-visuelles sont présentes dans le cerveau, mais que l'ARNm et la protéine de la β -arr1 y sont nettement plus abondants que ceux de la β -arr2 (Gurevich et al., 2002). Des études utilisant des modèles

d'expression en cellules hétérologues ont montré que la β -arr1 et la β -arr2 peuvent réguler les récepteurs D1, D2 et D3, mais que la β -arr2 semble le faire de façon plus efficace (Oakley et al., 2000; Kim et al., 2001; Lan et al., 2009a, 2009b). Par contre, un peu comme pour les GRKs, les expériences avec des souris chez lesquelles le gène de la β -arr1 ou de la β -arr2 a été inactivé ont démontré une baisse des réponses locomotrices suite à des traitements avec de l'amphétamine ou l'agoniste DAergique apomorphine (Gainetdinov et al., 2004; Beaulieu et al., 2005). Toutefois, ces travaux ont mené à la découverte d'un mécanisme très intéressant qui explique en partie ces résultats et qui attribue à la β -arr2 une fonction dans la signalisation des récepteurs DAergiques D2 et D3, indépendamment de son rôle dans la désensibilisation des RCPGs (Beaulieu et al., 2005, 2007). En somme, les études de la désensibilisation homologue des récepteurs DAergiques ont permis de mettre en valeur toute la complexité de la régulation du système DAergique et demeure un sujet de recherche encore fertile aujourd'hui.

2.4.3 Désensibilisation hétérologue des récepteurs de la dopamine

Si la désensibilisation homologue permet l'auto-régulation de l'activité des RCPGs, la désensibilisation hétérologue ouvre la porte vers une multitude de possibilités d'interactions différentes. En effet, à partir du moment où une kinase ou un autre type de protéine possède la capacité de moduler la désensibilisation d'un certain récepteur, tous les effecteurs de ce modulateur hétérologue peuvent donc affecter la signalisation du récepteur en question. Il s'agit d'un potentiel de régulation extrêmement large dont les mécanismes et les conséquences fonctionnelles commencent à peine à être explorés. Dans le cas des récepteurs DAergiques, le rôle de la protéine kinase C (PKC) est certainement le mieux connu. La PKC est une kinase qui peut phosphoryler des résidus sérines ou thréonines suite à son activation par des seconds messagers tels que le diacylglycérol ou le calcium intracellulaire, selon le type d'isoforme exprimé parmi la quinzaine connue. Elle fait notamment partie de la cascade de signalisation classique des RCPGs couplés à des

protéines $G\alpha_q$. Il fut démontré que le récepteur D1 est phosphorylé de manière constitutive par la PKC de type γ et δ et que l'éthanol peut diminuer cette phosphorylation, ce qui augmente l'activité du D1 dans un système d'expression hétérologue (Rex et al., 2008, 2010). Le récepteur D3 peut lui aussi subir une régulation hétérologue par la PKC: la phosphorylation du D3 par la PKC entraîne sa désensibilisation fonctionnelle et son internalisation dans un processus qui dépend de la dynamine, mais pas des arrestines ni des GRKs (Cho et al., 2007). Toutefois, le premier mécanisme de désensibilisation hétérologue d'un récepteur DAergique par la PKC à avoir été identifié et celui le mieux caractérisé à ce jour implique le récepteur D2. En effet, dans une étude de 2004, Namkung et Sibley ont mesuré l'état de phosphorylation du D2L exprimé dans des cellules HEK 293 (pour *human embryonic kidney 293*) suite à des traitements pharmacologiques avec des activateurs de la PKA (la forskoline) ou de la PKC (le PMA, pour *phorbol 12-myristate 13-acetate*). De façon assez étonnante, l'augmentation de l'activité de la PKA ne modifie pas l'état de phosphorylation basale du récepteur D2L, alors que l'augmentation de l'activité de la PKC provoque une phosphorylation importante du récepteur (Namkung et Sibley, 2004). Par ailleurs, un inhibiteur de la PKC n'inhibe pas la phosphorylation du D2L induite par la DA, ce qui indique que l'action de la PKC est distincte de la phosphorylation agoniste-dépendante liée à la désensibilisation homologue. Dans la même étude, des mesures de l'accumulation de l'AMPc et des expériences de liaison permirent aussi d'établir que la phosphorylation du D2L par la PKC induit la désensibilisation fonctionnelle et l'internalisation de ce récepteur dans un mécanisme qui dépend des dynamines et des β -arrestines (Namkung et Sibley, 2004). Il est intéressant de noter que d'autres études ont rapporté une différence de sensibilité dans la phosphorylation des deux isoformes du récepteur D2 par la PKC. En effet, la séquence de 29 acides aminés présente dans la troisième boucle intracellulaire du D2L agit comme un pseudo-substrat de la PKC, diminuant ainsi l'efficacité de la phosphorylation et de la désensibilisation fonctionnelle PKC-dépendante du D2L comparativement à celle du D2S (Liu et al., 1992; Morris et al., 2007). Étant donnée la distribution principalement présynaptique du D2S et postsynaptique du D2L (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000; Lindgren et al., 2003), cette différence dans

la régulation des isoformes du récepteur D2 constitue un aspect intéressant dans le contexte de l'intégration de la signalisation DAergique. Les modulateurs de l'activité de la PKC constituent donc des régulateurs potentiels des fonctions du D2, avec la possibilité d'effets pré- et postsynaptiques distincts. D'ailleurs, la prochaine section traite de la neurotensine, un neuropeptide intimement lié au système DAergique et qui est susceptible d'exploiter cette différence de désensibilisation hétérologue entre le D2L et le D2S.

Partie 3: La neurotensine

3.1 Généralités

La neurotensine (NT) est un petit peptide de 13 acides aminés isolé pour la première fois en 1973 à partir de l'hypothalamus bovin. Initialement, il fut baptisé ainsi en raison de l'effet hypotenseur qu'il produit suite à des applications locales. Le gène de la NT fut d'abord cloné chez le chien (Dobner et al., 1987), puis chez le rat (Kislauskis et al., 1988): le gène complet encode un peptide précurseur de 170 acides aminés contenant la NT ainsi que la neuromédine N, dont le clivage en protéines actives est assuré par l'activité protéolytique des membres de la famille enzymatique des PCs (pro-protéine convertases). Le mécanisme de relâche de la NT est similaire à celui des autres peptides sécrétés, c'est-à-dire que la protéine s'accumule dans des vésicules à cœur dense qui vont fusionner avec la membrane extracellulaire pour libérer la NT dans un processus qui dépend du calcium (Binder et al., 2001). L'inactivation de la NT se produit grâce à l'intervention d'endopeptidases de la famille des métallopeptidases qui clivent la protéine dans le segment responsable de son activité de signalisation, c'est-à-dire les acides aminés 8-13 en C-terminal (Vincent et al., 1994). Anatomiquement (Figure 7), on retrouve la NT principalement dans le système digestif et dans le système nerveux central et ganglions de la racine dorsale, où son expression très dispersée est particulièrement abondante dans l'hypothalamus, le système limbique et comme nous le verrons plus en détail, généralement associée intimement avec le système DAergique (Binder et al., 2001; St-Gelais et al., 2006).

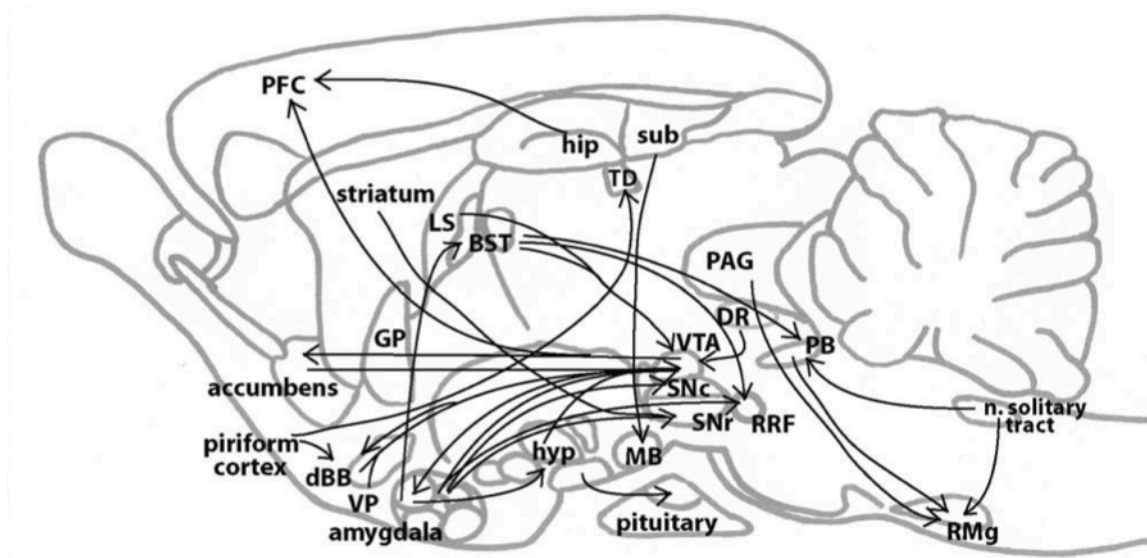


Figure 7: Principaux circuits de la NT dans le cerveau de rongeur. Tiré de (St-Gelais et al., 2006)

Les fonctions de la NT sont relativement variées, touchant le contrôle de la pression sanguine, la température corporelle, la douleur et la prise alimentaire. Dans le système nerveux central, la NT affecte aussi le circuit de la récompense, les mécanismes de dépendance aux drogues d'abus et les effets des médicaments antipsychotiques; ces fonctions associent la NT de très près avec le système DAergique. D'ailleurs, le cas de la schizophrénie est particulièrement intéressant puisqu'il semble que la NT puisse potentiellement remplir le rôle d'antipsychotique endogène (Binder et al., 2001; Nemeroff, 2001; Cáceda et al., 2006). Ce syndrome psychiatrique sévère regroupe un large spectre de symptômes dits positifs (psychose, hallucinations, délire de grandeur, paranoïa), négatifs (retrait social, pauvreté du langage, affect plat) et cognitifs (mémoire de travail défectueuse, troubles de la planification à court terme). On associe généralement ces symptômes à une hyperactivité du système DAergique mésolimbique et une hypoactivité du système DAergique mésocortical (Carlsson et al., 2001). La très grande majorité des médicaments utilisés dans le traitement des patients schizophrènes tempèrent principalement les symptômes positifs par un ciblage plus ou moins sélectif du récepteur DAergique D2.

Comme nous le verrons dans les sections qui suivent, la NT est un important régulateur du système DAergique et il existe une interaction fonctionnelle extrêmement pertinente dans le contexte de la schizophrénie entre un des récepteurs de la NT, le NTR1, et le récepteur D2.

3.2 Récepteurs de la NT

La NT exerce ses fonctions en liant un de ses 3 récepteurs: NTR1, NTR2 et NTR3. Le NTR1 (Tanaka et al., 1990) et le NTR2 (Chalon et al., 1996) font tous les deux partie de la grande famille des RCPG, contrairement au NTR3 (Mazella et al., 1998) qui avait déjà été identifié précédemment sous le nom de gp95/sortilin et fait partie d'une nouvelle famille de protéines intracellulaires impliquées dans le transport de protéines entre différentes organelles de la cellule (Binder et al., 2001; Mazella and Vincent, 2006). La majorité des effets étudiés de la NT sont attribués à l'activité du NTR1 et du NTR2, et nous n'aborderons pas le NTR3 en détail.

On considère le NTR1 comme le récepteur à haute affinité de la NT, avec une constante de dissociation pour la NT de 0.1-0.3 nM (Vincent et al., 1999). Il est exprimé aussi bien dans la périphérie que dans le cerveau, où on retrouve son ARNm dans le noyau septal médial, le noyau basal de Meynert, le noyau suprachiasmatique, le noyau supramammillaire, la *zona incerta*, le pallidum, la SN, l'ATV et la moelle épinière (Alexander and Leeman, 1998; Vincent et al., 1999). Dans tous les systèmes où il fut étudié jusqu'ici, le NTR1 se couple principalement avec la protéine $G\alpha_q$, ce qui lui confère la capacité d'activer la PLC et d'enclencher les cascades de signalisation impliquant le diacylglycérol, l'IP3 et une mobilisation de calcium intracellulaire (Kitabgi, 2006). L'activation du NTR1 peut aussi affecter positivement l'excitabilité neuronale en augmentant des conductances cationiques non-sélectives par un mécanisme impliquant l'IP3 (Wu et al., 1995; Chien et al., 1996; Farkas et al., 1996; St-Gelais et al., 2004) ainsi qu'en inhibant des canaux potassiques à rectification entrante via la PKC (Wu and Wang, 1995; Cathala and Paupardin-Tritsch, 1997; Farkas et al., 1997). Cette régulation des

conductances cationiques et potassiques fut observée dans des neurones DAergiques; nous verrons un peu plus loin que le NTR1 est particulièrement lié à la régulation du système DAergique. D'un point de vue fonctionnel, des études portant sur des animaux chez lesquels le gène NTR1 a été inactivé ont démontré qu'il est surtout impliqué dans le contrôle de la température, la prise alimentaire, la locomotion et les effets de type neuroleptiques de la NT (Remaury et al., 2002; Mechanic et al., 2009; Feifel et al., 2010a; Liang et al., 2010).

Le NTR2 possède une plus faible affinité pour la NT, se chiffrant à des valeurs de 2-10 nM (Vincent et al., 1999). Il est surtout exprimé dans le cerveau, notamment dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe, l'hypothalamus, la strie terminale, la substance grise périaqueducatale, la SN et l'ATV (Vincent et al., 1999; St-Gelais et al., 2006). Les voies de signalisations enclenchées par son activation sont encore aujourd'hui mal comprises, la plupart des données provenant seulement de systèmes d'expression hétérologue. En effet, la NT peut parfois agir comme agoniste, antagoniste ou agoniste inverse du récepteur NTR2, alors que les antagonistes SR-48692 et la levocabastine peuvent parfois agir comme agonistes (Mazella and Vincent, 2006; St-Gelais et al., 2006). En outre, le NTR2 a été identifié comme le récepteur principalement impliqué dans l'effet analgésique et thermorégulateur de la NT, en plus d'exercer de légers effets neuroleptiques (Sarret et al., 2005; Mazella and Vincent, 2006; Liang et al., 2010).

3.3 Modulation du système DAergique par la NT

Depuis la découverte de la NT, sa relation intime avec le système DAergique a généré beaucoup d'intérêt. Cette relation découle en premier lieu d'une très grande proximité anatomique. Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité de la DA du cerveau origine du mésencéphale ventral, soit de la SNc ou de l'ATV, où l'on retrouve de nombreux corps cellulaires contenant de la NT. En effet, la NT est présente dans une sous-population de neurones de l'ATV qui expriment aussi la TH, alors qu'on la retrouve dans

une proportion beaucoup plus faible de neurones de la SNc qui n'expriment pas la TH (Hökfelt et al., 1984; Seroogy et al., 1988). La majorité de la NT libérée dans le mésencéphale provient donc de l'extérieur: de nombreuses fibres positives pour la NT innervent la SNc et l'ATV sans se superposer au marquage TH (Hökfelt et al., 1984). De plus, la combinaison de marqueurs rétrogrades et d'hybridation *in situ* a permis d'identifier le septum rostro-latéral, l'aire préoptique et l'hypothalamus latéral comme source première des afférences NT-positives dans l'ATV (Zahm et al., 2001). Finalement, on retrouve une très forte expression du récepteur NTR1 dans la SNc et l'ATV, notamment dans une grande majorité de neurones DAergiques (Nicot et al., 1995; Boudin et al., 1996, 1998; Fassio et al., 2000; Cáceda et al., 2006), ainsi qu'une certaine expression du NTR2 (Walker et al., 1998).

Sur le plan fonctionnel, de nombreuses études démontrent l'importante régulation du système DAergique par la NT, principalement dans les effets de la NT sur la physiologie des neurones DAergiques. D'abord, tel que mentionné précédemment, l'activation du NTR1 à la membrane des compartiments somatodendritiques des neurones DAergiques enclenche une voie de signalisation impliquant la protéine $G\alpha_q$, ce qui entraîne une augmentation des conductances cationiques non-sélectives (Wu et al., 1995; Chien et al., 1996) et une diminution des courants potassiques à rectification entrante (Wu et Wang, 1995; Cathala et Paupardin-Tritsch, 1997; Farkas et al., 1997). Ces deux mécanismes ont pour effet de causer une dépolarisation de la membrane des neurones DAergiques, augmentant ainsi leur taux de décharge spontanée et la relâche de DA. De plus, la NT peut aussi inhiber directement la fonction de l'auto-récepteur D2. Comme nous l'avons vu dans la section 2.3.3, l'auto-récepteur D2 agit comme un frein sur l'activité spontanée des neurones DAergiques en augmentant les conductances potassiques à travers des canaux de type GIRK (Beaulieu et Gainetdinov, 2011). Il fut démontré que l'activation du NTR1, à des concentrations inférieures à celles nécessaires pour l'effet de la NT sur le taux de décharge des neurones DAergiques, peut effectivement entraîner une inhibition de la fonction de l'auto-récepteur D2 (Shi et Bunney, 1990; Binder et al., 2001; Jomphe et al., 2006). Par ailleurs, la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation de la PKC sont nécessaires

à cette interaction fonctionnelle, contrairement à la signalisation du récepteur de l'IP3, ce qui dissocie cet effet sur l'autorécepteur de l'effet direct de la NT sur l'excitabilité membranaire (Jomphe et al., 2006). Finalement, la présence du récepteur NTR1 dans les terminaisons axonales des neurones DAergiques le place aussi dans une situation idéale pour réguler la relâche de DA (Binder et al., 2001). En effet, une étude récente a montré que la NT augmente la relâche terminale de DA lorsqu'elle est provoquée par un train de stimulations, contrairement à une stimulation unique (Fawaz et al., 2009). De plus, un pré-traitement avec le sulpiride, un antagoniste du récepteur D2, diminue fortement l'effet de la NT, suggérant que celui-ci dépend d'une interaction fonctionnelle avec le D2. Ces travaux sur l'interaction entre le NTR1 et le D2, conjointement avec les données sur la désensibilisation hétérologue du D2 par la PKC mentionnées dans la section 2.4.3, représentent les assises du projet de recherche de la première moitié de mon doctorat et qui fait l'objet du premier article de cette thèse. Nous y reviendrons en détails dans la section problématique et hypothèses.

Partie 4: Le striatum

4.1 Généralités

Le striatum est une structure sous-corticale localisée à l'entrée du circuit des ganglions de la base. Ce circuit anatomique représente une boucle de connexions qui regroupe le striatum, le pallidum (divisé en *gobus pallidus* interne et externe; GPi et GPe), le noyau sous-thalamique, la SNr et la SNc. L'activité des ganglions de la base est extrêmement importante, puisqu'elle est impliquée dans la sélection des actions, le contrôle des mouvements volontaires et l'apprentissage moteur (Mink, 1996; Redgrave et al., 1999; Cisek et Kalaska, 2010). Anatomiquement, le striatum se divise en une partie dorsale et une partie ventrale; puisque la partie ventrale porte aussi le nom de noyau accumbens, nous utiliserons le terme « striatum » pour désigner spécifiquement le striatum dorsal. Même si le noyau accumbens peut avoir un certain rôle à jouer dans les mouvements volontaires, il est généralement davantage associé au circuit de la récompense et à la régulation du système limbique impliqué dans le contrôle des émotions (Salamone et al., 2005). Par ailleurs, le striatum dorsal peut lui aussi se diviser en deux régions distinctes mais cellulièrement homogènes: le noyau caudé et le putamen. Chez les primates, ces deux structures peuvent facilement être différenciées en raison de la capsule interne qui les divise, ce qui n'est pas le cas chez les rongeurs où on utilise les appellations striatum et caudé-putamen de façon quasi interchangeable. Pour plus de simplicité, nous désignerons ici le striatum comme le regroupement implicite du noyau caudé et du putamen. Bien que plusieurs populations neuronales distinctes existent au sein du striatum, l'une d'elles domine largement les autres: les MSNs (pour *medium spiny neurons*) comptent pour approximativement 95 % de tous les neurones striataux. Ce sont les seuls neurones de projection du striatum, et leur neurotransmetteur principal est le GABA (pour *γ-aminobutyric acid*). Les autres 5 % sont constitués d'interneurones classés selon leurs

caractéristiques morphologiques et biochimiques: les gigantesques interneurons cholinergiques et trois types différents de petits interneurons GABAergiques exprimant soit la parvalbumine, la calrétinine ou la somatostatine/neuropeptide Y (Tepper et al., 2004). Nous nous attarderons ici principalement aux neurones de projections du striatum.

D'un point de vue anatomique (Figure 8), l'entrée principale du striatum provient du cortex cérébral. Si le striatum représente l'entrée des ganglions de la base, le GPi et la SNr constituent sa voie de sortie, là où converge l'information traitée dans les différents noyaux du circuit. Il est presque unanimement accepté que les MSNs projettent leurs axones dans deux voies parallèles et majoritairement exclusives: soit vers le GPe par ce qu'on appelle la voie indirecte, soit vers le GPi et la SNr par ce qu'on appelle la voie directe (Smith et al., 1998; Bolam et al., 2000; Wu et al., 2000; Bertran-Gonzalez et al., 2010; Gerfen et Surmeier, 2011). La voie directe, ou striatonigrale, porte ainsi son nom parce qu'elle relie *directement* l'entrée et la sortie des ganglions de la base. La voie indirecte, ou striatopallidale, ajoute des intermédiaires synaptiques au niveau du GPe, qui projette ses axones vers le noyau sous-thalamique, qui assure le relais vers le GPi et la SNr. Enfin, les neurones du GPi et de la SNr projettent leurs afférences principalement vers le thalamus, qui transmet ultimement l'information au cortex pour compléter la boucle, en plus d'établir une connexion directe et récurrente vers le striatum (Smith et al., 1998; Bolam et al., 2000). La combinaison des connexions excitatrices et inhibitrices de ce réseau a pour conséquence que les voies directe et indirecte ont des effets opposés sur l'activité thalamo-corticale, et donc sur la génération des mouvements: la voie directe facilite et la voie indirecte inhibe.

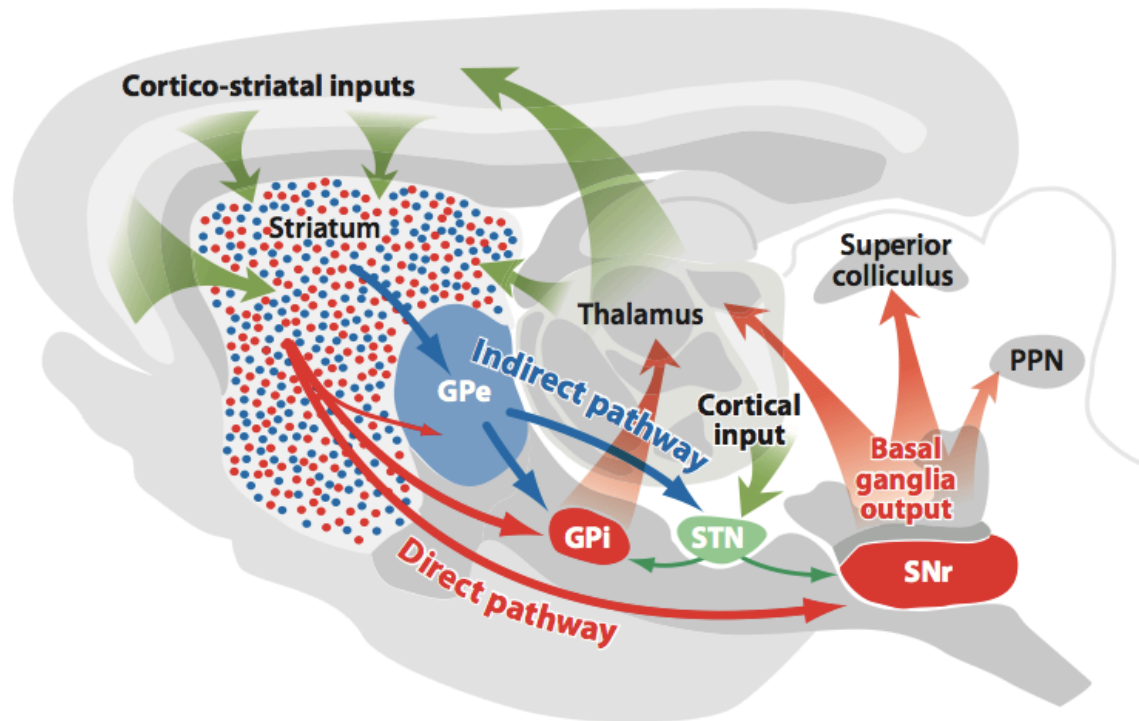


Figure 8: Anatomie des principales voies entrantes et sortantes du striatum. Tiré de (Gerfen and Surmeier, 2011)

4.2 Les MSNs

Les MSNs du striatum doivent leur nom au fait qu'ils expriment une forte densité d'épines dendritiques (d'où le qualificatif *spiny*). Les épines dendritiques sont des structures très spécialisées formant la composante postsynaptique de la majorité des synapses excitatrices de toutes les régions du cerveau (Kasai et al., 2003). L'activité de ces synapses influence grandement le comportement électrique des MSNs, en assurant notamment la transition entre leurs deux niveaux d'excitabilité bien distincts: le *up-state* et le *down-state*. En effet, l'état basal des MSNs est dominé par des conductances potassiques provenant de l'ouverture constitutive de canaux à rectification entrante de type Kir2 et qui ont pour effet de maintenir le potentiel membranaire à un niveau hyperpolarisé très loin du seuil de

génération des potentiels d'action dans ce qu'on appelle le *down-state* (Gerfen et Surmeier, 2011). Une activation soutenue et temporellement convergente des afférences excitatrices faisant synapse sur les MSNs peut provoquer une dépolarisation suffisante pour inhiber les canaux Kir2 ainsi que d'autres canaux potassiques, les Kv4, pour maintenir le potentiel membranaire à un niveau assez élevé de sorte que d'autres événements excitateurs puissent à leur tour générer des potentiels d'actions dans ce qu'on appelle le *up-state* (Wilson et Kawaguchi, 1996; Day et al., 2008). Bien que cette dichotomie d'excitabilité soit particulière aux MSNs, les synapses excitatrices présentes sur leurs épines dendritiques possèdent beaucoup des propriétés classiques et communes aux autres types de synapses glutamatergiques. Une caractéristique importante les distingue toutefois: l'importance de la signalisation DAergique dans le striatum et le rôle de la DA dans la régulation des synapses des MSNs. Ainsi, nous allons d'abord survoler les principales caractéristiques des synapses excitatrices en général, puis aborder ensuite quelques particularités des synapses présentes sur les MSNs et, finalement, décrire les facettes les plus importantes des fonctions de la DA dans la régulation de ces synapses.

4.2.1 Généralités sur les synapses excitatrices

Dans une synapse excitatrice typique, le neurotransmetteur glutamate est relâché à la zone active de la terminaison axonale et se lie aux récepteurs glutamatergiques ionotropes postsynaptiques. Il existe trois types de récepteurs glutamatergiques ionotropes impliqués dans la transmission synaptique excitatrice: les récepteurs AMPA (pour *2-amino-3(-5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid*), les récepteurs de type kaïnate et les récepteurs NMDA (pour *N-methyl-D-aspartate*). Les récepteurs AMPA et de type kaïnate sont relativement similaires du point de vue fonctionnel et pharmacologique; c'est pourquoi on les regroupe souvent en parlant de la catégorie AMPA/kaïnate. Les récepteurs AMPA/kaïnate sont responsables de la majorité de la transmission excitatrice du cerveau. On les retrouve en grande quantité dans les épines dendritiques faisant partie d'un complexe protéique nommé la densité postsynaptique. Dans la plupart des cas, le canal ionique formé

dans la structure des récepteurs AMPA/kainate est perméable au sodium et au potassium. De leur côté, les récepteurs NMDA possèdent quatre propriétés fondamentales qui les distinguent des récepteurs AMPA/kainate. Premièrement, ils ont une cinétique d'ouverture beaucoup plus lente, ce qui donne une forme particulière aux enregistrements de leurs courants. Deuxièmement, le canal ionique formé dans la structure des récepteurs NMDA est perméable au sodium, au potassium et au calcium. Troisièmement, l'ouverture de son canal ionique nécessite la liaison d'un co-agoniste, la glycine, en plus de la liaison au glutamate. Quatrièmement, même si le canal ionique du récepteur NMDA est en conformation ouverte, le flot d'ions est obstrué par la présence de magnésium qui se lie à l'intérieur du canal pour le bloquer. Afin que le courant puisse passer, la membrane postsynaptique doit être dépolarisée suffisamment pour expulser le magnésium hors du canal ionique du récepteur NMDA. En ce sens, on le considère souvent comme un « détecteur de coïncidence », puisque sa fonction requiert une dépolarisation préalable qui provient en général d'une activation synaptique des récepteurs AMPA/kainate. D'ailleurs, le mécanisme le mieux connu de potentialisation à long terme (PLT) des synapses glutamatergiques dépend de l'activation des récepteurs NMDA: une relâche soutenue de glutamate présynaptique sert d'abord à dépolariser la membrane postsynaptique par l'activation des récepteurs AMPA/kainate, puis le magnésium est expulsé du canal ionique des récepteurs NMDA activés, permettant une entrée de calcium qui mène notamment à l'activation de la CamKII (pour *calcium/calmodulin-dependent kinase II*), une protéine cruciale dans la PLT. La CamKII peut phosphoryler les récepteurs AMPA, ce qui augmente à la fois leur conductance et leur abondance à la membrane synaptique (Lisman et al., 2002; Malenka et Bear, 2004). Ces mécanismes entraînent donc une augmentation durable de la force synaptique, c'est-à-dire de l'efficacité de la transmission synaptique.

Il existe une relation intime entre la morphologie d'une épine dendritique et l'efficacité de sa transmission synaptique: la force synaptique est proportionnelle à la taille de l'épine où la synapse se trouve ainsi qu'à la quantité de récepteurs AMPA qu'elle contient (Matsuzaki et al., 2004; Hanley, 2008). La PLT représente donc un mécanisme important par lequel la forme des épines peut varier avec le degré de maturité et d'efficacité

synaptique: il est généralement accepté que les épines longues et fines forment les synapses les moins efficaces et les plus plastiques, alors que les épines courtes et larges forment des synapses plus stables et efficaces (Bourne et Harris, 2007). Ainsi, on utilise régulièrement une classification qualitative de la morphologie des épines qui décrit à la fois leur forme et leur degré de maturité (Figure 9): les épines de type *thin* (mince) sont longues, étroites, possèdent une petite tête et sont considérées comme les moins matures et les plus plastiques; les épines de type *mushroom* (champignon) sont courtes, possèdent une grosse tête, un petit cou, sont considérées comme assez matures et stables; les épines de type *stubby* (trapu) sont petites, avec une grosse tête, sans cou et sont considérées comme les plus matures et les plus stables (Kasai et al., 2003; Yoshihara et al., 2009).

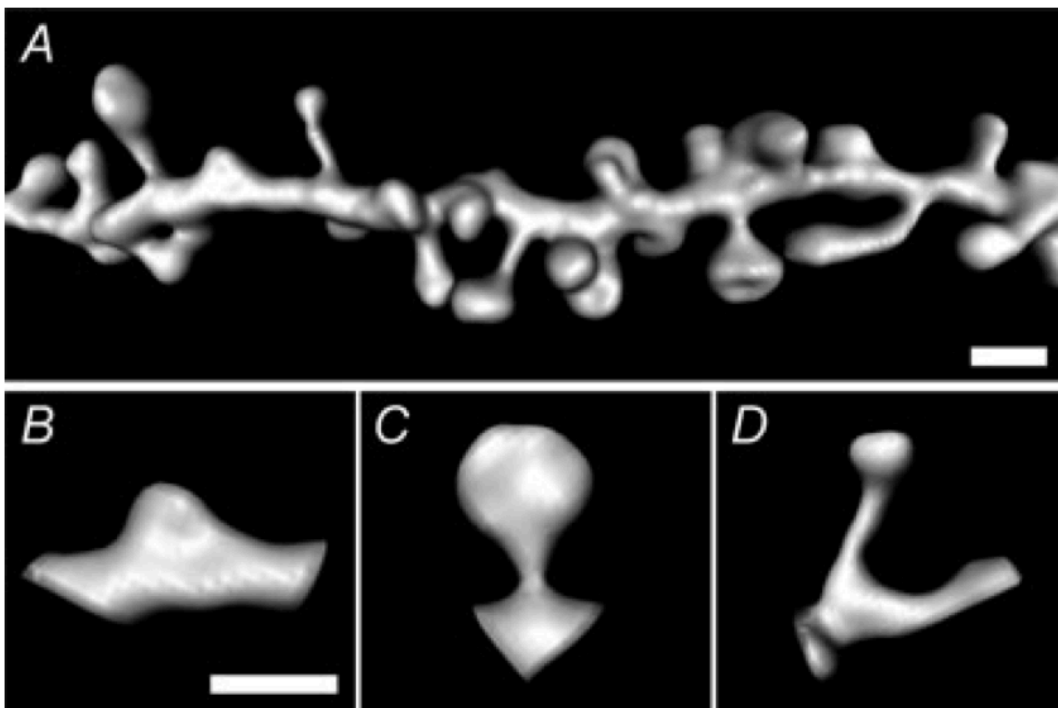


Figure 9: Exemples d'épines dendritiques de morphologies différentes: stubby (b), mushroom (c) et thin (d). Tiré de (McKinney, 2010)

4.2.2 Synapses excitatrices des MSNs

Les synapses excitatrices sur les MSNs se forment avec les terminaisons axonales glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus. Les afférences corticales proviennent de toutes les régions corticales (cortex sensoriel, moteur et associatif) et expriment le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT1 (pour *vesicular glutamate transporter 1*), tandis que les afférences thalamiques proviennent principalement du noyau intralaminaire du thalamus et expriment le VGLUT2 (Fremeau et al., 2004; Smith et al., 2009a; El Mestikawy et al., 2011; Gerfen et Surmeier, 2011). Bien que certaines données aient initialement suggéré des différences fondamentales dans l'architecture des réseaux corticostriataux et thalamostriataux (Smith et al., 2004), des études plus récentes démontrent de nombreuses similitudes. Par exemple, les terminaisons axonales corticales et thalamiques ciblent autant les MSNs de la voie directe que de la voie indirecte: un même neurone cortical ou thalamique innerve à la fois la voie directe et la voie indirecte par des embranchements axonaux, et un même MSN reçoit des afférences à la fois corticales et thalamiques (Doig et al., 2010). De plus, le positionnement des synapses thalamocorticales et corticostriatales par rapport aux terminaisons DAergiques permet une influence comparable par la DA libérée dans le striatum (Moss et Bolam, 2008). Par contre, on note une différence dans le point de contact des afférences glutamatergiques striatales sur les MSNs. En effet, la totalité des synapses corticostriatales prennent place directement sur les épines dendritiques des MSNs, alors qu'un certain pourcentage (20-30 %) du total des synapses thalamostriatales se forment sur les dendrites des MSNs, ce qui semble varier selon la région thalamique à l'origine des projections excitatrices en question (Moss et Bolam, 2008; Smith et al., 2009a). Les afférences glutamatergiques du striatum diffèrent aussi en ce qui a trait à certains aspects fonctionnels: il fut démontré qu'un paradigme de stimulation identique des afférences glutamatergiques du striatum produit une potentialisation de la transmission corticostriatale, alors qu'il induit plutôt une dépression de la transmission thalamostriatale (Ding et al., 2008).

4.3 La DA dans le striatum

L'innervation DAergique du striatum représente un des aspects fondamentaux de la régulation de l'activité des ganglions de la base. Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, les afférences DAergiques en provenance principalement de la SNc innervent très densément le striatum. D'ailleurs, en raison de la grande complexité de l'arborisation axonale que forment les projections DAergiques dans cette région, il a été estimé qu'un seul neurone DAergique peut innerver environ 3 % du volume total du striatum et ainsi influencer jusqu'à 75 000 MSNs (Matsuda et al., 2009). Bien sûr, tel que mentionné précédemment, on retrouve une abondante quantité et variété de récepteurs DAergiques sur les MSNs, dont l'activité permet une modulation importante par la DA. Dans les prochaines sections, nous verrons d'abord comment sont distribués les récepteurs DAergiques dans le striatum. Ensuite, nous traiterons de la régulation de l'activité des MSNs par la DA en conditions normales puis dans le contexte de la maladie de Parkinson. Finalement, nous aborderons la question de l'établissement des synapses excitatrices sur les MSNs au cours du développement et la question du rôle de la DA dans ce phénomène.

4.3.1 Distribution des récepteurs de la dopamine dans le striatum

Tel que mentionné dans la section 2.2, tous les sous-types de récepteurs DAergiques sont exprimés dans le striatum, mais les récepteur D1 et D2 sont, de très loin, les plus abondants. D'ailleurs, il existe un parallèle extrêmement important entre la distribution des récepteurs DAergiques et l'anatomie du striatum. En effet, il est aujourd'hui quasi unanimement admis que les MSNs de la voie directe expriment majoritairement le récepteur D1, alors que les MSNs de la voie indirecte expriment majoritairement le récepteur D2. Dans les années 80, des études portant sur l'expression de neuropeptides dans le striatum suite à des traçages rétrogrades révélèrent que les MSNs de la voie striatonigrale expriment la substance P et la dynorphine, alors que les MSNs de la voie striatopallidale expriment l'enképhaline (Gerfen et Young, 1988) et qu'une lésion à la 6-hydroxyDA (6-

OHDA), une toxine qui provoque sélectivement la dégénérescence des neurones DAergiques, diminue les niveaux d'ARNm de la substance P, mais augmente ceux de l'enképhaline (Young et al., 1986). Ceci suggérait déjà que les MSNs des voies directe et indirecte diffèrent en terme d'expression de neuropeptides, mais aussi que la DA régule ces deux populations de façon opposée. Quelques années plus tard, après le clonage des récepteurs D1 et D2, la même expérience fut reproduite avec des sondes reconnaissant les ARNm de ces récepteurs DAergiques et démontra que le D1 se localise majoritairement dans les MSNs striatonigraux (et positifs à la substance P), alors que le D2 se localise majoritairement dans les MSNs striatopallidiaux (et positifs à l'enképhaline) (Gerfen et al., 1990). Par contre, certaines données électrophysiologiques suggéraient plutôt une colocalisation des récepteurs dans les neurones striataux en se basant sur les effets fonctionnels produits par des molécules pharmacologiques ciblant les récepteurs de type D1 ou de type D2 (Akaike et al., 1987; Cepeda et al., 1993). Une étude mesurant l'ARNm par l'approche PCR (pour *polymerase chain reaction*) en cellule unique permit ensuite de démontrer que les MSNs exprimant majoritairement le D1 et la substance P expriment souvent le récepteur D3, alors que les MSNs exprimant le D2 et l'enképhaline exprime souvent le récepteur D5, mais qu'il existe, en réalité, très peu de chevauchement entre les récepteurs D1 et D2 (Surmeier et al., 1996). La présence de récepteurs DAergiques dans les différents types d'interneurones du striatum pourrait aussi expliquer, au moins en partie, les données électrophysiologiques (Gerfen et Surmeier, 2011). En effet, les interneurones GABAergiques expriment principalement le récepteur D5 (Rivera et al., 2002; Centonze et al., 2003), alors que les interneurones cholinergiques expriment surtout le D2 et le D5 (Yan and Surmeier, 1997; Yan et al., 1997), compliquant grandement l'interprétation de toute étude purement pharmacologique dans le striatum.

L'avènement de la technologie des transgènes BAC (pour *bacterial artificial chromosome*, Figure 10) encodant des protéines fluorescentes sous le contrôle de promoteurs spécifiques confirma finalement de façon convaincante la ségrégation entre le D1 et le D2 dans les MSNs (Gertler et al., 2008; Shuen et al., 2008; Valjent et al., 2009; Ade et al., 2011). Cependant, la colocalisation D1-D2 semble être un fait bien réel, puisqu'il

est possible d'immunoprécipiter un hétéromère de ces récepteurs dans des extraits de striatum (Lee et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de cet hétéromère engendre une cascade de signalisation spécifique impliquant la protéine $G\alpha_q$, la PLC et une augmentation de la libération du facteur de croissance BDNF (pour *brain-derived neurotrophic factor*) (Rashid et al., 2007; Hasbi et al., 2009; Perreault et al., 2010). Par ailleurs, cette signalisation serait davantage présente dans le noyau accumbens, là où la colocalisation des récepteurs D1 et D2 apparaît plus importante (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Hasbi et al., 2009). Une autre possibilité intéressante serait que la ségrégation des récepteurs DAergiques suive une régulation développementale. En effet, des données *in vitro* ont suggéré une importante augmentation de la co-expression des récepteurs D1 et D2 dans des MSNs en culture primaire (Shetreat et al., 1996; Wong et al., 1999; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2004; Hasbi et al., 2009), suggérant que la ségrégation puisse être induite et/ou maintenue par des facteurs extrinsèques qui s'établiraient graduellement au cours du développement. Toutefois, à ce jour, il n'existe aucune donnée à propos de l'ontogénie de la ségrégation des récepteurs D1 et D2 dans le striatum. Ceci nous a mené à envisager un court projet de recherche, présenté comme deuxième article de cette thèse, mettant à profit la technologie des animaux BAC transgéniques pour explorer le développement de la ségrégation D1-D2 *in vivo* et son maintien *in vitro*. Nous y reviendrons en détails dans la section problématique et hypothèses.

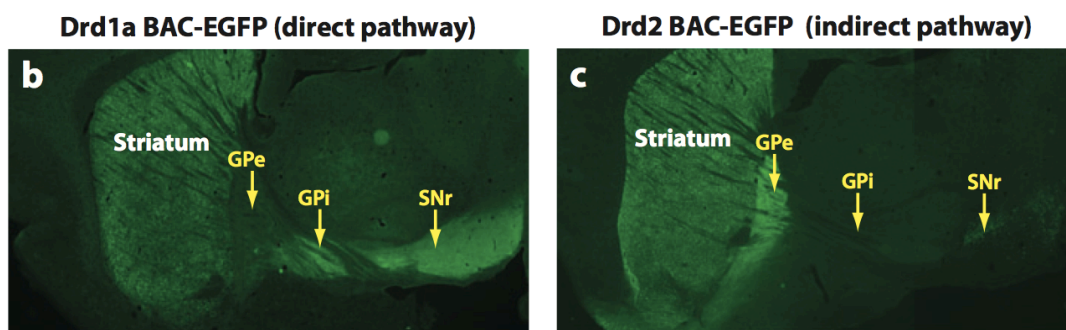


Figure 10: Tranches sagittales de cerveaux de souris transgéniques exprimant un BAC encodant la protéine GFP sous le contrôle du promoteur du récepteur D1 (b) ou D2 (c). Tiré de (Gerfen et Surmeier, 2011).

4.3.2 Régulation de l'activité des MSNs par la DA

Il est maintenant largement accepté que la DA contrôle l'excitabilité des MSNs. Plus précisément, par l'entremise des récepteurs DAergiques présents dans les dendrites ou dans le cou des épines dendritiques, la DA régule l'activité des synapses glutamatergiques qui se forment sur les MSNs dans ce qu'on a appelé la « triade striatale » (Dani et Zhou, 2004; Gerfen et Surmeier, 2011). Généralement, l'action de la DA peut prendre deux formes différentes, selon le type de MSN et donc le type de récepteur DAergique qu'elle active: l'activité du D1 augmente l'excitabilité des MSNs de la voie directe, alors que l'activité du D2 diminue celle de la voie indirecte. Nous verrons ici les principaux mécanismes à l'origine de cette régulation par la DA (Figure 11).

L'activation de la cascade intracellulaire de l'adénylate cyclase, de l'AMPc et de la PKA par le récepteur D1 augmente l'expression membranaire des récepteurs AMPA (Snyder et al., 2000) et NMDA (Hallett et al., 2006), et potentialise les courants passant à travers les récepteurs NMDA par un mécanisme dépendant de l'état de phosphorylation des récepteurs et impliquant la protéine DARPP-32 (Cepeda et al., 1993; Blank et al., 1997). La PKA cible aussi les canaux calciques de type L Cav1.3: leur phosphorylation suite à l'activation du D1 entraîne une augmentation des courants calciques qui promeut la dépolarisation durant les périodes de *up-states* (Surmeier et al., 1995). Finalement, la stimulation du D1 provoque aussi une diminution des conductances des canaux calciques Cav2 dont l'activité est associée avec celle des canaux potassiques calcium-dépendants de type SK (Vilchis et al., 2000). Ainsi, le récepteur D1 permet d'augmenter les réponses synaptiques excitatrices et l'excitabilité générale des MSNs de la voie directe, principalement par l'intermédiaire de la PKA.

De son côté, le récepteur D2 agit généralement à l'inverse du récepteur D1. En effet, son activation diminue les courants des récepteurs AMPA et NMDA (Cepeda et al., 1993; Hernández-Echeagaray et al., 2004) et diminue le nombre de récepteurs AMPA membranaires en induisant sa déphosphorylation dans un processus impliquant aussi la protéine DARPP-32 (Håkansson et al., 2006). De plus, le D2 réduit la relâche de glutamate

des terminaisons corticales dans un mécanisme qui pourrait passer par une activation de récepteurs localisés directement sur les axones corticostriataux (Bamford et al., 2004); cependant une autre étude suggère plutôt un rôle du D2 postsynaptique qui régulerait les terminaisons corticales en induisant une relâche rétrograde d'endocannabinoïdes par les MSNs (Yin et Lovinger, 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, le D2 diminue aussi les courants calciques à travers les canaux de type L (Hernandez-Lopez et al., 2000; Olson et al., 2005) et augmente les courants potassiques dans les MSNs (Greif et al., 1995) grâce à la signalisation par les sous-unités $\beta\gamma$.

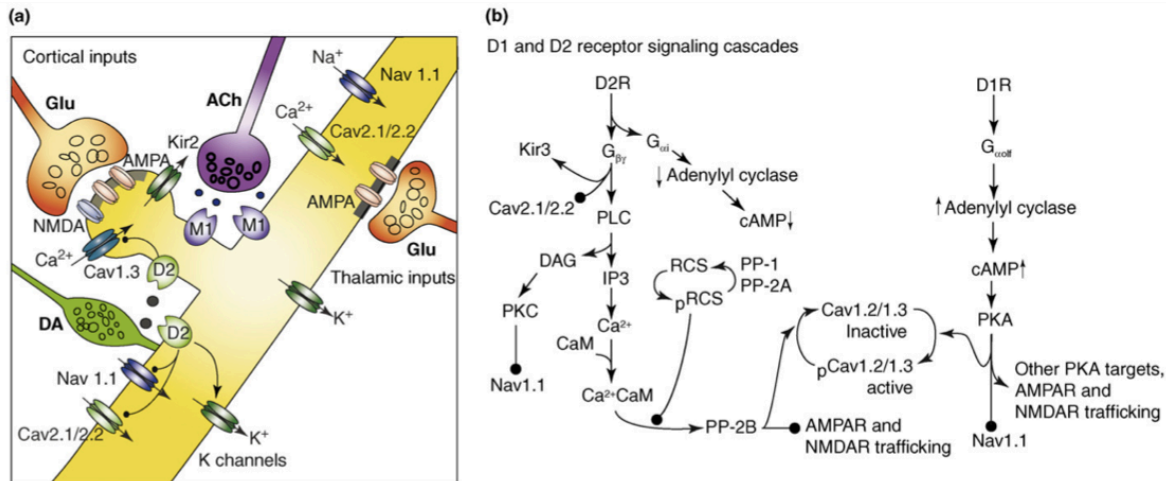


Figure 11: Régulation des synapses corticostriatales par la DA. Tiré de (Surmeier et al., 2007)

4.3.3 La maladie de Parkinson: un exemple de plasticité pathologique

La maladie de Parkinson est une maladie dégénérative dont les symptômes les plus fréquents affectent le système moteur en causant, entre autres, une lenteur des mouvements, de la rigidité et des tremblements involontaires. La dégénérescence des neurones DAergiques de la SNc, provoquant une lourde perte d'innervation DAergique dans le striatum, est connue depuis longtemps comme caractéristique principale de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Comme nous venons de le voir, la DA active

la voie directe et inhibe la voie indirecte des ganglions de la base par l'entremise des récepteurs exprimés relativement sélectivement par les deux projections parallèles du striatum. Puisque la voie directe facilite les mouvements et que la voie indirecte les inhibe, l'effet global de la dopamine est de faciliter les mouvements par sa modulation de la voie directe tout en les désinhibant par sa modulation de la voie indirecte. On peut donc résumer les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson assez simplement: le manque de DA produit une diminution de l'activité de la voie striatonigrale et une augmentation de celle de la voie striatopallidale, ayant pour résultat une forte inhibition dans l'initiation des mouvements volontaires.

Évidemment, les conséquences d'une dénervation DAergique dans le striatum, graduelle ou rapide, sont extrêmement complexes et mènent à une réorganisation importante des circuits des ganglions de la base sur les plans fonctionnels et structuraux. L'étude de ces changements s'est effectué principalement à l'aide de modèles animaux dans lesquels la mort sélective des neurones DAergiques est provoquée par des traitements avec la 6-OHDA ou une autre neurotoxine aux effets bien connus, le MPTP (pour 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine). Ainsi, il fut d'abord démontré que la perte d'innervation DAergique dans le striatum de rats produit une importante diminution dans la densité d'épines dendritiques des MSNs (Ingham et al., 1989, 1993), effet qui est aussi retrouvé chez l'homme dans des cerveaux parkinsoniens *post-mortem* (Stephens et al., 2005; Zaja-Milatovic et al., 2005). De plus, chez le rat, ces changements dans le nombre d'épines correspondent à une diminution du nombre de contacts synaptiques excitateurs sur les MSNs, et non à une relocalisation des synapses ailleurs que sur les épines (Ingham et al., 1998). Grâce à l'utilisation des animaux transgéniques BAC exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur des récepteur D1 ou D2, on découvrit ensuite que, chez la souris, cette diminution de synapses excitatrices suite à un traitement à la 6-OHDA se produit spécifiquement sur les MSNs de la voie striatopallidale, dans un mécanisme impliquant la perte d'inhibition des canaux calciques de type L Cav1.3 par la diminution de l'activité du récepteur D2 (Day et al., 2006). Par contre, une étude chez le singe traité au MPTP suggère à l'inverse que la perte d'épines dendritiques des MSNs ne suit aucune spécificité en terme

de voie directe ou indirecte (Villalba et al., 2009); il pourrait s'agir de différences attribuables à l'espèce étudiée.

Il semble que la perte des afférences DAergiques influence aussi les terminaisons glutamatergiques corticales et thalamiques dans le striatum. De nombreux travaux ont ainsi rapporté une augmentation de la connectivité des afférences corticostriatales (Lindfors and Ungerstedt, 1990; Calabresi et al., 1993; Anglade et al., 1996) ainsi qu'une plus forte expression striatale de la sous-unité GluR1 des récepteurs glutamatergiques de type AMPA (Betarbet et al., 2000) dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson. Par contre, il est important de souligner que cette connectivité augmentée s'accompagne d'une altération fonctionnelle majeure, alors qu'on a observé l'impossibilité d'induire une PLT aux synapses corticostriatales chez le rat hémiparkinsonien (Picconi et al., 2003). Finalement, d'un point de vue structural, on note chez le rat et le singe une augmentation dans le nombre et la taille des terminaisons glutamatergiques corticales, mais il semble que seule la taille des terminaisons thalamiques soit affectée (Ingham et al., 1993; Raju et al., 2008; Villalba and Smith, 2011). Ces indices ont mené à l'élaboration d'une théorie selon laquelle les changements suivant la dénervation DAergique induiraient une hyperactivité du circuit corticostriatal (Calabresi et al., 2007; Smith et al., 2009b), qui serait la cause de la diminution du nombre d'épines dendritiques des MSNs par une adaptation homéostatique. D'ailleurs, cette idée est supportée par des études démontrant qu'une dépolarisation soutenue de cocultures primaires contenant des neurones striataux et corticaux provoque une perte d'épines chez les MSNs-D2 (Tian et al., 2010), et que la perte des afférences corticales avant la dénervation DAergiques prévient la diminution de la densité d'épines dendritiques des MSNs dans des cultures organotypiques ou *in vivo* chez le rat (Neely et al., 2007; Garcia et al., 2010).

Dans un autre ordre d'idée, certains travaux ont rapporté une diminution des sites de liaisons de la NT dans le striatum de cerveaux parkinsoniens *post mortem* (Chinaglia et al., 1990; Fernandez et al., 1994) ainsi que dans un modèle lésionnel de la maladie chez le singe (Goulet et al., 1999). Évidemment, puisque le NTR1 est abondant dans les fibres

DAergiques, il est logique de prédire une diminution des sites de liaisons de la NT dans le striatum suite à la perte des afférences nigrales, mais il est probable que l'expression du récepteur par les neurones striataux soit aussi diminuée dans le contexte pathologique, étant donné que l'étendue de la baisse de liaison observée n'est pas équivalente à celle de la perte des afférences DAergiques. En ce qui a trait aux niveaux de NT, les résultats obtenus dans plusieurs contextes différents sont plutôt équivoques. D'une part, des études dans des cerveaux parkinsoniens *post mortem* ont démontré que les niveaux de NT demeuraient inchangés dans le striatum, mais augmentés dans la SNc et SNr (Bissette et al., 1985; Fernandez et al., 1995). D'autre part, les modèles lésionnels chez le rat ont démontré une augmentation de NT dans le striatum, mais pas dans la SN (Engber et al., 1992; Taylor et al., 1992), alors qu'aucun changement n'a été observé chez le singe lésé (Allen et al., 1986; Taylor et al., 1991). Finalement, dans le contexte très probable d'hyperactivité des afférences corticostriatales dans la maladie de Parkinson, il semble que ce soit l'habilité de la NT à moduler la transmission glutamatergique, plutôt que DAergique, qui puisse offrir une voie thérapeutique potentielle. En effet, la NT provoque normalement l'augmentation de la transmission synaptique NMDA-dépendante dans le striatum, effet annulé par un antagoniste sélectif du NTR1 (Ferraro et al., 2008, 2012), travaux qui suggèrent l'utilité potentielle d'un antagoniste du NTR1 en ajout à la L-DOPA chez les patients parkinsoniens.

4.3.4 Formation des synapses excitatrices des MSNs

Les caractéristiques de la régulation des MSNs par la DA en conditions normales et pathologiques mentionnées jusqu'ici concernent exclusivement la situation chez l'animal adulte. Très peu de données sont disponibles sur la formation du réseau des ganglions de la base et, plus particulièrement, comment la DA peut l'influencer. Certaines études montrent que la transmission glutamatergique module positivement la formation des épines dendritiques des MSNs, tout en promouvant l'établissement des synapses excitatrices. En effet, des MSNs en cocultures avec des neurones corticaux forment beaucoup plus d'épines

dendritiques et de synapses fonctionnelles que des MSNs en monocultures (Segal et al., 2003; Penrod et al., 2011). D'ailleurs, l'inhibition de la transmission synaptique par des traitements chroniques avec la tétrodontoxine, un antagoniste des canaux sodiques voltage-dépendants, bloque l'effet positif des cocultures sur la formation des épines (Segal et al., 2003). Des travaux récents, démontrent par ailleurs que l'activité des projections striatofugales des voies directe et indirecte influence l'établissement des synapses excitatrices et des épines dendritiques dans le striatum par une modulation de la boucle de signalisation des ganglions de la base (Kozorovitskiy et al., 2012). Grâce à la technologie qui tire profit de la recombinaison Cre, ces auteurs sont parvenus à créer un KO du transporteur vésiculaire du GABA sélectivement dans les neurones exprimant les récepteurs D1 ou D2, ce qui annule complètement la transmission synaptique GABAergique des MSNs striatonigraux ou striatopallidaux. Ainsi, leurs résultats révèlent que l'inactivation de la voie directe provoque une diminution de la fréquence mEPSCs (pour *miniature excitatory postsynaptic currents*) et de la densité des épines dendritiques des MSNs, alors que l'inactivation de la voie indirecte provoque exactement l'inverse. Pour confirmer que ces effets proviennent bien d'une modulation *du circuit* sur les entrées glutamatergiques du striatum, ils ont aussi montré qu'une inhibition chronique et sélective de neurones corticaux de couches profondes produit les mêmes résultats que l'inhibition de la relâche de GABA par les MSNs de la voie directe. De plus, une relâche focale de glutamate par la technique de photoactivation (« *uncaging* ») sur des dendrites de MSNs immatures (8-11 jours après la naissance) provoque la formation d'une épine dendritique *de novo*. Au final, il semble que le glutamate relâché par les afférences excitatrices du striatum ait un certain rôle à jouer dans la formation des épines dendritiques des MSNs, probablement durant les premières semaines postnatales alors que les terminaisons corticales commencent à relâcher du glutamate et former des synapses. Mais qu'en est-il de la DA? Les terminaisons DAergiques innervent le striatum très tôt au cours du développement (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000), et il semble que la libération de DA soit déjà présente à la naissance (Ferrari et al., 2012) pouvant avoir une influence

potentielle sur la synaptogénèse corticostriatale. Cette question importante constitue la base du projet de recherche qui sera présenté dans le troisième article de cette thèse.

Partie 5: Problématique et hypothèses

La première partie de cette thèse est abordée dans un premier article qui concerne la régulation présynaptique de l'autorécepteur D2 par la NT. Comme nous l'avons vu précédemment, la NT est connue comme un important régulateur du système DAergique. Elle aurait d'ailleurs un rôle potentiel à jouer dans le traitement des symptômes de la schizophrénie, certains la considérant même comme un antipsychotique endogène (Kinkead et Nemeroff, 2002). De plus, l'activation du récepteur NTR1 de la NT produit une diminution de la fonction de l'autorécepteur D2, ce dernier étant la cible principale de la très grande majorité des médicaments antipsychotiques. Le mécanisme d'interaction entre le NTR1 et le D2 dépend de la PKC (Jomphe et al., 2006), un des médiateurs intracellulaires les plus importants des effets de la NT (Wu et Wang, 1995; Wu et al., 1995; Cathala et Paupardin-Tritsch, 1997). Or, il a été démontré que la phosphorylation du récepteur D2 par la PKC induit sa désensibilisation fonctionnelle ainsi que son internalisation (Namkung and Sibley, 2004; Morris et al., 2007). La possibilité que la régulation du D2 par la NT passe par l'activation de la PKC et de la phosphorylation directe de l'autorécepteur D2, entraînant sa désensibilisation fonctionnelle ou son internalisation, constituait l'hypothèse centrale du premier article de cette thèse. La différence de sensibilité à la phosphorylation de D2S et du D2L par la PKC (Morris et al., 2007) permettait aussi d'envisager que la NT puisse réguler différemment les deux isoformes du D2. L'identification du mécanisme d'interaction entre le NTR1 et le D2 devrait permettre de mieux comprendre les effets antipsychotiques potentiels de la NT ainsi que d'offrir de nouvelles pistes pour d'éventuelles alternatives pharmacologiques pour le traitement de la schizophrénie.

Ensuite, dans la deuxième partie de cette thèse qui est abordée dans un deuxième et un troisième article, nous avons porté notre attention une la composante postsynaptique du système DAergique: le striatum. D'abord, il est aujourd'hui unanimement accepté que les

MSNs striatonigraux expriment le récepteur D1, alors que les MSNs de la voie striatopallidale expriment le récepteur D2 (Bertran-Gonzalez et al., 2010). Toutefois, rien n'est connu sur l'ontogénie de la ségrégation de l'expression des récepteurs DAergiques dans le striatum. De plus, certains travaux ont montré que la ségrégation disparaissait une fois les MSNs mis en culture (Shetreat et al., 1996; Wong et al., 1999; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2004; Hasbi et al., 2009), suggérant que la ségrégation ne soit pas intrinsèque aux MSNs, ce qui soulève la possibilité que des facteurs extrinsèques, comme la DA, puissent influencer l'établissement et/ou le maintien de la ségrégation des récepteurs DAergiques dans le striatum. Ainsi, une perturbation importante de l'activité au sein des ganglions de la base pourrait éventuellement modifier le profil d'expression des récepteurs DAergiques. De plus, l'étude des neurones striataux dans un système *in vitro* pourrait être grandement biaisée par les facteurs extrinsèques présents ou absents dans les différentes approches de culture cellulaire. Donc, notre objectif pour le deuxième article de la thèse était de tester l'hypothèse que le développement de la ségrégation des récepteurs D1 et D2 dans les MSNs soit graduel et que cette ségrégation soit régulée par des facteurs extrinsèques comme la DA.

Finalement, de nombreux indices mènent à penser que le glutamate libéré par les terminaisons excitatrices innervant le striatum joue un rôle important dans la formation des synapses sur les MSNs au cours du développement (Segal et al., 2003; Penrod et al., 2011; Kozorovitskiy et al., 2012). Par contre, rien n'est connu sur l'influence que peut jouer la DA sur ce phénomène, alors que les terminaisons DAergiques sont déjà établies dans le striatum et libèrent de la DA dès la naissance (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano et Di Porzio, 2000; Ferrari et al., 2012). De plus, les neurones DAergiques possèdent la capacité de libérer du glutamate, grâce à leur expression de la protéine VGLUT2 (Dal Bo et al., 2004; Mendez et al., 2008; El Mestikawy et al., 2011), particulièrement aux stades embryonnaires et après une lésion à la 6-OHDA (Dal Bo et al., 2008; Mendez et al., 2008), suggérant une importance potentielle de cette relâche de glutamate dans la formation de la circuiterie striatale et de son adaptation à des conditions traumatiques similaires à la maladie de Parkinson. Notre hypothèse pour le troisième et

dernier article de cette thèse était donc que les neurones DAergiques puissent moduler la synaptogénèse sur les MSNs via la DA et le glutamate.

Article 1

Neurotensin triggers dopamine D2 receptor desensitization through a protein kinase C and beta-arrestin1-dependent mechanism

Dominic Thibault^{1,2,4}, Paul R. Albert⁵, Graciela Pineyro^{1,3,6}, Louis-Éric Trudeau^{1,2,3,4}.

1- Department of Pharmacology; 2- Department of Physiology; 3- Department of Psychiatry; 4- Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central; 5- Ottawa Hospital Research Institute, University of Ottawa; 6- Centre de recherche du CHU Ste-Justine, Université de Montréal

ABSTRACT

The peptide neurotensin (NT) is known to exert a potent excitatory effect on the dopaminergic system by inhibiting D2 dopamine (DA) receptor (D2R) function. This regulation is dependent on activation of protein kinase C (PKC), a well-known effector of the type 1 NT receptor (NTR1). Because PKC phosphorylation of D2Rs has recently been shown to induce its internalization, we hypothesized that NT acts to reduce D2R function through heterologous desensitization of the D2R. In the present study, we first used HEK-293 cells to demonstrate that NT induces PKC-dependent D2R internalization. Furthermore, internalization displayed faster kinetics in cells expressing the D2R short isoform, known to act as an autoreceptor in DA neurons, than in cells expressing the long isoform, known to act as a postsynaptic D2R. In patch-clamp experiments on cultured DA neurons, overexpression of a mutant D2S lacking three key PKC phosphorylation sites abrogated the ability of NT to reduce D2R-mediated cell firing inhibition. Short interfering RNA-mediated inhibition of beta-arrestin1 and dynamin2, proteins important for receptor desensitization, reduced agonist-induced desensitization of D2R function, but only the inhibition of beta-arrestin1 reduced the effect of NT on D2R function. Taken together, our data suggest that NT acutely regulates D2 autoreceptor function and DA neuron excitability through PKC-mediated phosphorylation of the D2R, leading to heterologous receptor desensitization.

Since its discovery in the 1970s, NT has been well established as a potent modulator of the DA system (Binder et al., 2001; St-Gelais et al., 2006). A vast majority of DA neurons in the substantia nigra and the ventral tegmental area express the NTR1, the high affinity NT receptor (Nicot et al., 1995; Fassio et al., 2000). Activation of these G α q-coupled receptors has been shown to increase DA neuron excitability via distinct mechanisms, one

of which consists in a reduction of presynaptic D2 autoreceptor function (Shi and Bunney, 1992; Jiang et al., 1994; Wu and Wang, 1995; Farkas et al., 1997). Activation of these D2Rs by DA normally causes cell hyperpolarization, which leads to a decrease in both spontaneous firing and DA release (Lacey et al., 1987; Kennedy et al., 1992; Kim et al., 1995; Missale et al., 1998; Uchida et al., 2000). D2R regulation is an important area of interest for modern neuropharmacology since all clinically effective antipsychotic drugs (APDs) act at least in part as D2R antagonists. Moreover, because a growing amount of data from both human and animal studies provides evidence for the implication of NT in the pathophysiology of schizophrenia and in the action of APDs (Sharma et al., 1997; Radke et al., 1998; Cáceda et al., 2005; Kinkead et al., 2005; Norman et al., 2008; Feifel et al., 2009, 2010; Mechanic et al., 2009; Liang et al., 2010), a better understanding of the mechanism mediating the NTR1-D2R interaction seems necessary.

The major second messenger cascade triggered by NTR1 signaling involves activation of phospholipase C and the subsequent increase in intracellular calcium concentration, inositol-triphosphate production and PKC activity, all of which have been linked to physiological effects of NT (Watson et al., 1992; Wu and Wang, 1995; Wu et al., 1995; Cathala and Paupardin-Tritsch, 1997; St-Gelais et al., 2004). We have previously demonstrated that the regulation of D2R function by NT in cultured DA neurons requires PKC activity (Jomphe et al., 2006). Interestingly, it was also shown that the D2R can be directly phosphorylated by PKC, leading to agonist-independent functional desensitization and internalization of the membrane D2R (Namkung and Sibley, 2004; Morris et al., 2007). The goal of the present study was to assess whether NTR1 activation leads to PKC-induced D2R desensitization and to establish if a mechanism of agonist-independent desensitization of the D2R could have any functional significance for the physiological effects of NT on DA neurons. Our results show that NTR1 activation can trigger PKC-dependent internalization of both short and long isoforms of D2R (D2S and D2L) in a transfected HEK-293 cell line. We also demonstrate that the effect of NT on D2R function in cultured DA neurons is strongly reduced by overexpression of a D2S receptor mutated on PKC

phosphorylation sites that are critical for D2R desensitization and by siRNA-mediated downregulation of β -arrestin1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

HEK-293 cell culture and transfection. HEK-293 cells were maintained in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, UT, USA) enriched with 1% penicillin/streptomycin, 0.5% Glutamax and 10% fetal bovine serum (Gibco). Upon reaching approximately 80% confluence, the enriched medium was replaced with basic DMEM and the cells were transiently transfected with pcDNA3.1 plasmids containing the sequences of HA-tagged NTR1 (Missouri S&T cDNA Resource Center, USA) and flag-tagged D2L or D2S using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Internalization assay by immunofluorescence. 24 hours after transfection, HEK-293 cells were reseeded in enriched DMEM onto glass coverslips pre-coated with poly-L-lysine (Gibco). The next day, the enriched medium was removed and cells were incubated with basic DMEM containing a rabbit polyclonal anti-flag antibody (1:1000, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) for 30 minutes to allow binding to surface receptors, before being treated for 10 minutes with basic DMEM (vehicle), 10 μ M quinpirole (Quin, specific D2R agonist, Sigma-Aldrich) or 10 nM NT (NT 8-13, active fragment, Sigma-Aldrich). After fixation, cells were incubated with a first secondary antibody (1:500, ALEXA 633 anti-rabbit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 30 minutes, which labeled surface receptors (membrane signal). After washout of the first secondary antibody, cells were permeabilized in a 0.01% Triton X-100 solution and incubated with a second secondary antibody (1:500, ALEXA 488 anti-rabbit, Molecular Probes) for 30 minutes, which labeled both surface and internalized receptors (total signal = membrane + internalized). Images were acquired with a point-scanning confocal microscope (Prairie Technologies) equipped with argon and helium/neon lasers. Internalization was then quantified cell by cell from images processed with ImageJ software (NIH) by subtracting the membrane signal from the total signal and expressed as a percentage of the total signal of each individual transfected cell. Statistical

analysis was performed with a one-way ANOVA followed with Tukey's multiple comparison tests.

D2S colocalization with Rab5. HEK-293 cells transfected with the D2S, NTR1 and a Rab5-GFP plasmids were handled identically to the internalization assay protocol described above, with a labeling of surface D2S on live cells and a subsequent 10 minute drug treatment. After fixation and permeabilization, cells were incubated with a goat polyclonal anti-GFP antibody (1:1000, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), and then with secondary antibodies (ALEXA 488 anti-goat and ALEXA 546 anti-rabbit, 1:500 each, Molecular Probes). Images were acquired with a laser scanning confocal microscope (FV1000 MPE, Olympus) equipped with multi-argon and helium/neon lasers. D2S-Rab5 colocalization was measured with the "Mander's Coefficient" plugin of the ImageJ software. The Pearson correlation coefficient obtained for each image from the different treatment groups were averaged and statistically analyzed with a one-way ANOVA followed with Tukey's multiple comparison tests.

Internalization assay by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 24 hours after transfection, HEK-293 cells were re-suspended in enriched medium and reseeded into 24-welled plates pre-coated with poly-L-lysine. After an overnight incubation, the enriched medium was removed and the cells were washed with basic DMEM (vehicle) or 10 μ M chelerythrine (CHE, Sigma-Aldrich), a wide spectrum PKC inhibitor, for 30 minutes. The cells were then treated with 10 μ M quinpirole and/or 10 nM NT for different time periods. Receptor trafficking was stopped by adding ice-cold PBS for 5 minutes, following which cells were rinsed and fixed in 3% PFA for 20 minutes. Membrane immunoreactivity of the D2R was revealed by incubation for one hour with an anti-flag primary antibody (rabbit polyclonal, 1:1000, Sigma-Aldrich) and for 30 minutes with HRP-coupled secondary antibody (1:5000, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). After antibody incubations and PBS washes, the HRP substrate o-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA FAST OPD, Sigma-Aldrich) was added to each well, and the reaction was stopped after 15 minutes by addition of 3N HCl. 200 μ L from each well was then

transferred to a 96-welled plates for subsequence absorbance readings at 490 nm on a Wallac Victor2 1420 Multilabel plate-reader (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Each experiment had two different internal controls consisting of untreated transfected cells (100% membrane signal value, set as time 0) and untreated non-transfected cells (non-specific labeling). Specific membrane immunoreactivity value was calculated by subtracting the intensity level of wells seeded with non-transfected cells, and the signal from treated transfected cells was expressed as a percentage of the intensity level of wells containing untreated transfected cells. Values were always obtained and averaged in triplicate and statistical analyses were performed by two-way repeated-measures ANOVAs followed with Bonferroni multiple comparison tests to compare the membrane signal measured at different time points following vehicle or CHE pre-treatments.

DA neuron culture and plasmid transfections. Mesencephalic DA neuron primary culture was prepared according to a protocol described in earlier publications (Jomphe et al., 2005, 2006; Dal Bo et al., 2008; Fasano, Poirier, et al., 2008; Fasano, Thibault, et al., 2008; Mendez et al., 2008). Briefly, dissociated neurons from the isolated mesencephalon of newborn transgenic mice expressing the enhanced GFP (EGFP) under the control of the tyrosine hydroxylase promoter (TH-EGFP/21-31) (Sawamoto et al., 2001; Matsushita et al., 2002) were seeded on a monolayer of cortical astrocytes coming from the same animals. These cultures were maintained in Neurobasal medium enriched with 1% penicillin/streptomycin, 1% Glutamax, 2% B-27 supplement and 10% fetal bovine serum (Gibco). For plasmid transfections, 3-day old neuron cultures were co-transfected with pcDNA3 plasmids containing sequences for the DsRed protein and either the D2S-flag (D2S-WT) or a D2S-mutant (triple mutant T225A, S228G and S229G) for a total of 4 μ g of DNA per coverslip by means of calcium phosphate co-precipitation.

Knockdown of mRNAs by siRNA transfection. RT-PCR was first performed to verify the presence of each RNA of interest in DA neuron cultures at the appropriate time (7-12 DIV). In all cases, total mRNA was extracted from neuronal culture coverslips using TriZOL (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and dissolved in RNase-free water.

cDNA synthesis was performed with 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix (Qiagen, Valencia, CA, USA), 2.5 μ M random hexamers (RHs; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 500 ng of total RNA, 10 mM DTT, 40 U RNaseOUT, 200 U Moloney-murine leukemia virus (M-MLV) RT (Invitrogen), 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, and 3 mM MgCl₂, pH 8.3. For transfections with siRNA, 7-day old neuron cultures were transfected with a total of 40 or 60 pmoles of siRNAs per coverslip using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's guidelines (Invitrogen). Controls consisted in cultures transfected with a Cy-3-labelled scramble siRNA sequence (Ambion, Austin, TX, USA). Knockdown of target mRNA was then assessed by RT-PCR on whole coverslip extracts at 24, 48, and 72 hours post-transfection (8-10 DIV). Primers and oligonucleotides (synthesized by Alpha DNA, Montreal, QC, Canada) were designed respectively to amplify each specific sequence by RT-PCR and to synthesize siRNAs using a kit (Ambion). Sequences for β -arrestin1 (β -arr1), β -arrestin2 (β -arr2), dynamin1 (Dyn1) and dynamin2 (Dyn2) mRNAs were obtained from the Entrez Nucleotides mouse database (www.ncbi.nlm.nih.gov). The PCR primers were as follows (left primers followed by right primers): β -arr1, 5'- gagtctacgtgacactgacctg -3' and 5'- ctcaggggcatactgaacctt -3'; β -arr2, 5'- aagtcgagccctaactgcaa -3' and 5'- cagctcttgtccaggaag -3'; Dyn1, 5'- ttgtgctgactgctgagaatc -3' and 5'- ctccttcagtgcgtgtgata -3'; Dyn2, 5'- gccataccaatcagggggaga -3' and 5'- cccacaggcataggaatcagggga -3'. The oligonucleotides sequences for siRNA synthesis were as follows (sense oligonucleotides followed by antisense oligonucleotides): β -arr1, 5'- aagcactgtactgagctgtgcctgttc -3' and 5'- aacacagctcagtacaagtgccctgttc -3'; Dyn1, 5'- aatccttgtaccaggacagacctgttc -3' and 5'- aatctgtcctggtacaaggatcctgttc -3'; Dyn2, 5'- aaacaactctagtgtgtctacctgttc -3' and 5'- aagtagacacactagagttgtcctgttc -3'.

Patch-clamp recordings. Neuron culture coverslips of 7 (plasmid transfection) or 9-11 (siRNA transfection) days in culture were positioned in a recording chamber affixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 fluorescent microscope and gravitationally perfused with a physiological saline solution composed of (in mM): NaCl, 140; KCl, 5;

MgCl₂, 2; CaCl₂, 2; HEPES, 10; sucrose, 6; glucose, 10. Whole-cell patch-clamp recordings were performed on GFP expressing neurons using borosilicate pipettes (5.5-6.5 MΩ) filled with an intra-pipette solution composed of (in mM): KMeSO₄, 145; KCl, 20; NaCl, 10; EGTA, 0.1; ATP (Mg salt), 2; GTP (Tris salt), 0.6; HEPES, 10; phosphocreatine, 10 (pH 7.35). The signal was amplified by a Warner PC-505 amplifier, filtered at 1 kHz, digitized at 10 kHz and analyzed with pClamp8 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Spontaneous firing rate was recorded and analyzed off-line using MiniAnalysis software (Synaptosoft, Fort Lee, NJ, USA). Threshold for spike detection was set to 30 mV. In every case, the maximal effect of Quin (1 μM) on the spontaneous firing rate of DA neurons was calculated by comparing the number of spikes during the minute of maximal effect with the 2-minute baseline period. In order to measure the desensitization of D2R function, patched DA neurons were treated with Quin for a prolonged period of eight consecutive minutes. The mean maximal effect of Quin on firing rate was compared to the average rate of minutes 4 to 6 after the beginning of treatment. A rejection criterion was set as to keep for further analysis only neurons that showed a minimum of 50% reduction in firing in response to Quin. In order to measure the effect NT on D2R function, patched DA neurons were first exposed to Quin for 2 minutes to measure D2R-mediated firing rate inhibition (and to exclude non-responsive neurons), washed for 6 minutes, treated with NT (1 nM) for 3 minutes and finally exposed again to Quin in the presence of NT (Quin+NT). A second rejection criterion was set to exclude unstable neurons that did not show recovery of at least 50% of their initial firing rate by the end of the second Quin washout period. Neurons from control, plasmid and siRNA transfection groups all displayed similar basal firing rate and spike amplitude (data not shown). Typical membrane resistance of recorded DA neurons ranged from about 150 to 400 MΩ. Statistical analysis was performed by a two-way repeated-measure ANOVAs followed with Bonferroni multiple comparison tests.

RESULTS

NT induces D2S internalization in transfected HEK-293 cells. We first used HEK-293 cells transiently transfected with both NTR1 and flag-tagged short isoform D2R (D2S-WT) receptors to test whether NTR1 activation triggers D2R internalization. As a first approach, we detected D2R internalization by immunofluorescence using a strategy involving membrane labeling of the D2S prior to treatment and incubation of cells with different secondary antibodies before and after cell permeabilization (Fig. 1A). Cells treated with Quin (10 μ M) or NT (10 nM) alone both showed equivalent D2S internalization after 10 minutes (28.9 ± 5.0 and $26.5 \pm 3.5\%$, respectively; n=29 cells for Quin and 37 for NT, Fig. 1B). On the other hand, co-application of Quin and NT (Quin+NT) produced a significantly greater internalization ($50.6 \pm 3.4\%$; n=36) compared to Quin or NT alone, suggesting an additive effect of the drugs after 10 minutes of treatment. To confirm that the D2S was readily internalized through a typical endocytotic route, we performed a similar membrane labeling experiment in HEK-293 cells transiently transfected with Rab5-GFP, an early-endosomal protein (Stenmark, 2009), in addition to the NTR1 and D2S-WT receptors (Fig. 1C). Our analysis showed a significant increase in the Pearson correlation coefficient of the Rab5 and D2S signals, compared to control following a 10-minute treatment with Quin (10 μ M), NT (10 nM) or both; this can be interpreted as an increase in Rab5-D2S colocalization (-0.052 ± 0.019 for Ctl, 0.203 ± 0.032 for Quin, 0.115 ± 0.041 for NT and 0.201 ± 0.049 for Quin+NT). Thus, NTR1 activation seems to trigger D2S internalization by endocytosis in HEK-293 cells.

NT-induced D2S internalization in transfected HEK-293 cells is PKC-dependent. As a second strategy to confirm our initial findings and to gain insight into the time course of receptor internalization, we used an ELISA approach quantifying the decrease in membrane immunoreactivity induced by drug treatment at different time points. Because PKC is a major component of the NTR1 signaling cascade and was shown to induce D2R

internalization via direct receptor phosphorylation (Namkung and Sibley, 2004), we used chelerythrin (CHE), a wide-spectrum PKC inhibitor, to test the hypothesis that NT-induced D2R internalization requires PKC activity. Compared to controls, set to a membrane signal value of 100%, the D2S membrane signal decreased to a value of $80.2 \pm 2.1\%$ (n=5 experiments) after 5 minutes of treatment with Quin following a 30-minute pre-treatment with vehicle (Fig 2A, black curve). Cells that were treated with Quin for 5 minutes after pre-treatment with CHE (10 μ M) displayed a similar level of receptor internalization ($80.1 \pm 1.4\%$ of control; n=4), showing that agonist-induced homologous D2S internalization is PKC-independent. In both these cases, Quin-induced reduction in membrane signal reached a plateau value after 5 minutes and remained constant during the entire treatment period. In cells pre-treated with vehicle, NT induced more extensive internalization of D2S, with cell surface signal reaching $57.6 \pm 6.8\%$ of control (n=5) after 5 minutes (Fig. 2B, black curve); the signal came back to $74.7 \pm 2.4\%$ of control (n=5) at 10 minutes. In cells pre-treated with CHE, NT failed to induce any change in membrane D2S signal (Fig 2B, gray curve), which was significantly different from the NT group with vehicle pre-treatment (Fig2B, black curve; $P=0.0003$); all time points were statistically different between the two conditions ($P<0.01$ or lower, Bonferroni posttest), clearly showing that NT-induced D2S internalization is PKC-dependent. Co-treatment with both Quin and NT together (Quin+NT, Fig. 2C, black curve) produced a large reduction in membrane signal at 5 minutes ($50.5 \pm 8.8\%$ of control; n=5), which persisted after 10 minutes ($53.7 \pm 3.8\%$) and rose back to $70.2 \pm 3.0\%$ of control (n=5) after 15 minutes. Following CHE pre-treatment, Quin and NT co-application still caused a decrease in membrane D2S signal (Fig. 2C, gray curve), but with a pattern of internalization that was similar to that induced by Quin alone. Membrane signal from the Quin+NT treated cells after vehicle or CHE pre-treatment were significantly different overall ($P=0.0069$), but post-hoc tests confirmed that only the 5 and 10 minutes time points differed ($P<0.01$ for both). Overall, these results show that while PKC is not required for agonist-dependent D2S internalization, this kinase is necessary for

NT-induced D2S internalization through a mechanism that seems additive to Quin-induced internalization only within the first 10 minutes of treatment in transfected HEK-293.

NT induces PKC-dependent D2L internalization in transfected HEK-293 cells. Because prior studies have reported that rapid (2-min) uncoupling of D2L is less sensitive to PKC phosphorylation than D2S (Liu et al., 1992; Morris et al., 2007), we also examined the ability of NT to regulate D2L internalization in ELISA experiments with transfected HEK-293 cells. Similar to our results with D2S, pre-treatment with the PKC inhibitor CHE failed to interfere with Quin-induced D2L internalization (Fig. 2D; $P=0.8645$) but prevented NT-induced D2L internalization (Fig. 2E; $P=0.0003$). Interestingly, the amplitude and kinetics of D2L internalization in response to NT or Quin+NT co-application were different than for D2S (Fig. 2E, 2F): the peak reduction in membrane D2S seen after 5 minutes of NT was not present for the D2L, reaching only $80.8 \pm 3.9\%$ of control in response to NT and $72.7 \pm 1.7\%$ of control in response to Quin+NT. Pre-treatment with CHE also altered the response to Quin+NT co-application (Fig. 2F; $P=0.0267$), but post-hoc analysis revealed that this was only due to a difference at 30 and 60 minutes ($P<0.01$ and 0.05 , respectively), where Quin and NT seem to produce additive effects. Taken together, these experiments demonstrate that activation of NTR1 by NT can trigger D2S and D2L internalization in a PKC-dependent manner in transfected HEK-293 cells, although the kinetics of the PKC-dependent response of D2S and D2L in the combined agonist treatments were partially different.

Mutation of D2S PKC phosphorylation sites prevents NT-mediated reduction in D2R function in cultured DA neurons. We next examined cultured DA neurons to extend our conclusions to a cellular context in which NTR1 and D2R are normally co-expressed. For these experiments, primary postnatal cultures were prepared from TH-GFP transgenic mice, thus facilitating identification of DA neurons for patch-clamp recordings. Considering that PKC has been shown to phosphorylate D2R directly, leading to its functional desensitization and internalization (Namkung and Sibley, 2004; Morris et al., 2007) and that PKC activity is necessary for the ability of NT to reduce D2R in DA neurons (Jomphe

et al., 2006), we hypothesized that mutation of D2R PKC phosphorylation sites should prevent the ability of NT to reduce D2R-mediated firing rate inhibition. To test this hypothesis, we used a previously characterized D2S construct in which three key PKC phosphorylation sites specifically required for PKC-induced internalization of the D2R have been mutated (D2S triple mutant T225A, S228G and S229G) (Namkung and Sibley, 2004; Morris et al., 2007). Our results show that overexpression of this construct in DA neurons, acting as a dominant negative to compete with endogenous D2Rs (Fig. 3A), produced a complete blockade of NT's ability to reduce D2R agonist (Quin)-mediated inhibition of cell firing (Fig. 3D). Indeed, in control cultures transfected with wild-type D2S (D2S-WT), NT strongly reduced the ability of Quin to inhibit spontaneous firing ($84.9 \pm 8.0\%$ when applied alone, compared to a $54.1 \pm 6.9\%$ reduction after NT; Fig. 3B; $P < 0.01$; two-way ANOVA with Bonferroni posttest; $n=7$). In contrast, in neurons transfected with mutant D2S, NT failed to reduce the effect of Quin ($75.3 \pm 8.2\%$ reduction with Quin alone compared to $77.6 \pm 8.9\%$ average maximal reduction of firing rate in the presence of NT; Fig. 3C; $p=0.74$, $n=5$). These findings suggest that direct phosphorylation of the D2R by PKC, which can mediate D2R internalization, is required for the effect of NT on D2R function.

Knockdown of β -arr1 and Dyn2 but not Dyn1 prevents agonist-induced desensitization of D2R function in cultured DA neurons. Many proteins, including arrestins and dynamins, mediate the normal agonist dependent desensitization of GPCRs (Wolfe and Trejo, 2007). Interestingly, PKC-mediated agonist-independent desensitization and sequestration of D2R was also shown to depend both on arrestins and dynamins (Namkung and Sibley, 2004). In light of our results showing that NT triggered D2R internalization in transfected HEK-293 cells and our demonstration that mutation of phosphorylation sites important for PKC-dependent D2R internalization prevented the NTR1-D2R interaction in cultured DA neurons, we next evaluated whether siRNA-mediated down-regulation of desensitization-related proteins (Fig. 4A-B) would also alter the physiological effect of NT on D2R function. We first examined the presence of β -arr1, β -arr2, Dyn1 and Dyn2 mRNA in

mouse DA neurons in primary culture by RT-PCR and found that all could be detected (Fig. 4B), except for β -arr2 (data not shown). Hence, we designed siRNA sequences targeting β -arr1, Dyn1 and Dyn2 mRNA and optimized conditions to insure efficient transfection of cultured neurons (Fig. 4A) and maximal knockdown at the moment of the electrophysiological recordings (Fig. 4B).

We next determined the consequence of these knockdowns on D2R function and agonist-induced desensitization by measuring Quin-induced firing rate inhibition. This also served the purpose of providing a functional control for our ability to inhibit proteins important for receptor desensitization. Neurons transfected with scrambled siRNA sequences (Scr; Fig. 5A) responded to Quin (1 μ M) with an average maximal decrease in firing rate of $74.6 \pm 5.5\%$. As typically found, continuous perfusion with Quin produced a gradual reduction of the D2R agonist effect, as seen by the average decrease in firing rate of $38.8 \pm 9.1\%$ during the period covering minutes 4 to 6 after the beginning of the treatment, which was significantly different from the maximal effect (Fig. 5E; $P < 0.001$; two-way ANOVA with Bonferroni posttest; $n = 16$). In contrast, while the maximal effect of Quin was not significantly different in neurons transfected with siRNAs targeting β -arr1 ($80.5 \pm 5.3\%$ reduction; Fig. 5B), no significant desensitization of this response was observed: the firing inhibition remaining at $78.5 \pm 4.8\%$ of baseline 4-6 minutes after the beginning of Quin perfusion, which was statistically identical to the initial effect (Fig. 5E; $P = 0.16$; $n = 9$). Neurons transfected with siRNAs targeting Dyn1 (Fig. 5C) still showed significant desensitization, with an average maximal Quin effect of $75.5 \pm 6.5\%$ compared to $52.9 \pm 7.4\%$ 4-6 minutes after the beginning of Quin (Fig. 5E; $P < 0.01$; $n = 8$). Finally, physiological responses to Quin showed no significant desensitization in neurons transfected with siRNAs targeting Dyn2 (Fig. 5D) ($84.2 \pm 4.3\%$ vs. $71.4 \pm 8.8\%$ after 4-6 minutes) (Fig. 5E; $p = 0.14$; $n = 9$). Hence, our results show that under these conditions, β -arr1 and Dyn2, but not Dyn1, are important for agonist-induced functional desensitization of native D2R expressed in cultured DA neurons.

Knockdown of β -arr1 but not Dyn2 or Dyn1 prevents NT-mediated reduction of D2R function in cultured DA neurons. To test the hypothesis that NT affects D2R function by causing its desensitization, we measured the effect of NT in cultured DA neurons following siRNA knockdown of β -arr1, Dyn1 and Dyn2. We found that in control neurons transfected with Scr sequences, NT displayed its normal ability to reduce D2R-mediated firing rate inhibition (Fig. 6A) ($70.2 \pm 4.9\%$ under control conditions in comparison to $8.1 \pm 5.8\%$ in the presence of NT (Fig. 6E; two-way ANOVA with Bonferroni posttest; $P < 0.01$, $n=5$). In contrast, in DA neurons transfected with siRNAs targeting β -arr1 (Fig. 6B), the ability of NT to reduce D2R function was blocked ($75.0 \pm 5.0\%$ under control conditions in comparison to $79.5 \pm 8.2\%$ in the presence of NT; Fig. 6E; $P=0.47$, $n=7$). However, neurons transfected with siRNAs targeting Dyn1 (Fig. 6C) or Dyn2 (Fig. 6D), responded to NT in a way that was similar to the Scr control group (Dyn1; $67.0 \pm 6.8\%$ inhibition of firing rate in response to Quin under control conditions vs. $15.5 \pm 11.0\%$ in presence of NT; Fig. 6E; $P < 0.05$, $n=5$) (Dyn2; $78.6 \pm 6.3\%$ under control conditions vs. $10.5 \pm 13.5\%$ in presence of NT; Fig. 6E; $P < 0.01$, $n=6$). Thus, we conclude from these electrophysiological experiments that the ability of NT to reduce D2R function in DA neurons is dependent on β -arr1, but not Dyn1 or Dyn2.

DISCUSSION

In this study, we provide evidence linking the well-known ability of the neuropeptide NT to reduce D2R function to a mechanism of heterologous desensitization. Our first primary finding is that activation of NTR1 induces PKC-dependent internalization of D2S and D2L in transfected HEK-293 cells: the wide-spectrum PKC inhibitor CHE completely abolished NT-induced internalization of both isoforms without affecting internalization induced by the D2R agonist Quin. This finding that PKC is not required for homologous internalization of D2R is in line with a previous demonstration that inhibition of PKC activity does not alter agonist-induced phosphorylation of the D2L receptor in HEK-293 cells (Namkung and Sibley, 2004).

Our second major finding is that NT differentially regulates D2S and D2L internalization. While NT induced a biphasic internalization of D2S, consisting of a large amplitude rapid phase at 5 min and a more modest but protracted phase lasting up to 60 min, D2L showed a comparable slow phase, but a blunted fast phase. The difference between the rapid phase of NT-induced D2S and D2L internalization is compatible with the previously reported property of the D2L receptor to be more resistant to phosphorylation by PKC compared to D2S: the 29 amino-acid sequence present only in the D2L acts as a pseudo-substrate site to decrease interaction between the kinase and the third intracellular loop of the receptor (Liu et al., 1992; Morris et al., 2007). The transient nature of the observed D2S internalization peak could perhaps be related to the fact that the NTR1 receptor internalizes massively and rapidly upon activation (Botto et al., 1998; Vandembulcke et al., 2000).

Although an initial evaluation of D2R internalization by immunolabeling suggested a potentially additive effect of combined NTR1 and D2R activation at a 10 min time point (Fig. 1A-B), an evaluation of the time-course of D2R cell surface expression using more quantitative ELISA assay failed to detect an additive effect of a combined stimulation of

NTR1 and D2R at most time points examined (Fig. 2). Although not a direct, quantitative measure of internalization, our evaluation of D2S/Rab5 colocalization (Fig. 1C-D) also argues against an additive effect. These findings together suggest that the mechanism of D2R homologous internalization acts as an apparent repressor of PKC-dependent heterologous internalization. We also found that the receptor internalization triggered by co-application of NT and Quin was to a large extent PKC-independent, which is not what would be expected if a purely additive effect of the two agonists occurred. While for D2S, only the initial fast phase of internalization was reduced by CHE in cells treated with Quin + NT (Fig. 2C), for D2L, only late phases were reduced by the PKC blocker (Fig. 2F). Since D2R agonist-dependent internalization is believed to be primarily mediated by various G-protein related kinase (GRK)-dependent mechanisms (Ito et al., 1999; Iwata et al., 1999; Kim et al., 2001; Namkung, Dipace, Javitch, et al., 2009; Namkung, Dipace, Urizar, et al., 2009), activation of D2Rs in the co-treatment condition with NT may recruit GRKs to the D2R and perhaps reduce the accessibility of PKC phosphorylation sites. It is also possible that stimulation of the D2R may itself lead to the inhibition of NTR1 function and reduced PKC activation, as suggested by our prior work showing that Quin reduces the ability of NT to mobilize intracellular calcium in DA neurons (Jomphe et al., 2006). This model may explain why NT and Quin do not lead to an additive or synergistic enhancement of D2R internalization, but further investigation will be necessary to understand the different behaviors of D2S and D2L in this particular context.

We provide evidence that overexpression of a D2S bearing mutations on critical PKC phosphorylation sites (T225A, S228G and S229G) in cultured DA neurons prevents negative regulation of D2R function by NT. Considering that D2R activation in DA neurons induces the opening of potassium conductances (Lacey et al., 1987; Missale et al., 1998) and that NTR1 can negatively regulate inward rectifying potassium currents via PKC (Wu and Wang, 1995; Cathala and Paupardin-Tritsch, 1997), an alternate mechanism for NTR1-D2R interaction was that NTR1 inhibits the function of potassium channels that are normally activated by the D2R. Based on our present findings, this alternative is not likely

to play a major role in the interaction mechanism. A more likely model is that activation of NTR1 leads to PKC-mediated phosphorylation of D2R, leading to its internalization or functional desensitization. Compatible with this hypothesis, and in particular for the implication of receptor internalization, prior work has shown that mutations of S228 and S229 strongly inhibit PKC-induced sequestration of D2L from the membrane of HEK-293 cells without affecting functional desensitization (Namkung and Sibley, 2004). Other PKC phosphorylation sites on the D2R (T352, T354 and S355) have been identified and characterized as modulators of sequestration and functional desensitization (Namkung and Sibley, 2004), but were not examined in the present study. Although these residues could also be phosphorylated upon NTR1 activation, it is unlikely that they would play a necessary role in the NTR1-D2R interaction since the T225A, S228G and S229G mutations were sufficient to abolish the effect of NT on D2R function.

Our recordings of DA neuron firing changes in response to prolonged Quin treatment, combined with siRNA knockdown of β -arr1, Dyn1 or Dyn2, confirm previous results showing that agonist-dependent homologous desensitization of D2R is regulated by β -arr1 and Dyn2, but not Dyn1 (Vickery and von Zastrow, 1999; Zhang et al., 1999; Oakley et al., 2000; Kim et al., 2001; Kabbani et al., 2004). Importantly, our results showing that siRNA knockdown of β -arr1 prevents the ability of NT to reduce D2R function in DA neurons also argue in favor of heterologous D2R desensitization as the primary mechanism of NTR1-D2R interaction in DA neurons. We did not examine the implication of β -arr2 since it was not detected in our cultured DA neuron model, compatible with anatomical examinations of midbrain DA nuclei (Gurevich et al., 2002). Nonetheless, conclusive evidence has been provided for the implication of β -arr2 in D2R internalization and signaling in striatal neurons (Beaulieu et al., 2005; Skinbjerg et al., 2009). This distinction argues in favor of the hypothesis that pre- and postsynaptic D2R signaling is partially different, as suggested by previous work (Usiello et al., 2000; Lindgren et al., 2003).

Despite the fact that Dyn2 appears to be implicated in agonist-dependent desensitization of D2R function in DA neurons (Fig. 5D), its knockdown failed to prevent NT-mediated

inhibition of D2R function (Fig. 6). This finding may be considered surprising in light of the prior observation that in HEK-293 cells, heterologous D2L internalization induced by PKC phosphorylation depends on both arrestins and dynamins, as shown by the expression of dominant-negative proteins (Namkung and Sibley, 2004). However, a number of differences between the two experimental settings should be considered, including receptor isoform (D2L versus D2S), experimental model (HEK-293 versus primary cultured DA neurons) and time course of PKC activation (2h PMA versus 3 min NT). It is likely that our recordings highlighted acute, early effects of NT, which could differ in mechanism from longer lasting effects mediated by prolonged stimulation of this signaling cascade. Although our results in HEK-293 cells identify D2R internalization as a possible mechanism of NTR1-D2R interaction, our functional data obtained in DA neurons could be mediated by either internalization or functional uncoupling of the D2R, both resulting from direct PKC phosphorylation: following NTR1 activation, arrestin-dependent functional uncoupling of D2R could occur as a first, necessary mechanism, followed later by dynamin-dependent internalization if NTR1 or other PKC-recruiting pathways are activated for more prolonged periods.

Taken together, our results suggest a novel mechanism by which the regulatory peptide NT acutely shuts down D2 autoreceptor function in DA neurons: we propose that NTR1 activation leads to PKC-mediated phosphorylation of D2S, triggering β -arr1 recruitment and receptor functional uncoupling or heterologous internalization. For many years, NT has been examined in relation to the physiopathology of schizophrenia and the action of APDs. Indeed, subsets of schizophrenic patients have lower NT concentrations in their cerebrospinal fluid, and treatment with APDs normalizes these concentrations in parallel with symptom improvement (Nemeroff et al., 1989; Garver et al., 1991; Sharma et al., 1997). Most interestingly, viral overexpression of NTR1 in rat nucleus accumbens reduces amphetamine- and dizocilpine-induced deficits in pre-pulse inhibition (PPI) and hyperlocomotion (Cáceda et al., 2005), two behavioral responses associated with schizophrenia symptoms. In recent studies, NTR1 knockout animals have also been shown

to exhibit increased basal and amphetamine-induced DA release in the striatum and decreased responsiveness to a NT analogue to improve PPI and reduce acoustic startle responses (Feifel et al., 2010; Liang et al., 2010). NT receptor ligands have attracted much attention as possible new antipsychotic drug candidates (Kinkead and Nemeroff, 2002; Boules et al., 2007; Li et al., 2010). It has been argued that antipsychotic-like effects of NT could be caused specifically by a reduction in D2R-mediated neurotransmission in the accumbens through a combination of pre- and postsynaptic effects (Binder et al., 2001; Cáceda et al., 2006; Boules et al., 2007). Our finding of a differential ability of NT to regulate D2S and D2L internalization is most relevant in this context because it provides a new framework to explain how NT may differentially regulate presynaptic and postsynaptic D2Rs. Indeed, anatomical and functional experiments suggest that the D2L acts mainly as a postsynaptic receptor, whereas the D2S is generally considered as the primary fast-acting autoreceptor in DA neurons (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000; Lindgren et al., 2003). Our electrophysiological data suggest that NT causes acute heterologous desensitization of presynaptic D2R through a PKC- and β -arr1-dependent mechanism. Numerous reports have shown that NT can also negatively regulate postsynaptic D2R function in the striatum and other brain regions (Beauregard et al., 1992; Li et al., 1994; Díaz-Cabiale et al., 2002). As suggested by our present results, it is possible that NT regulates pre- and postsynaptic D2Rs via a similar heterologous desensitization mechanism, but with different magnitudes and time courses. These differential properties could perhaps prove to be useful in the development of new treatments against schizophrenia.

REFERENCES

- Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2005. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122, 261–273.
- Beauregard, M., Ferron, A., Descarries, L., 1992. Opposite effects of neurotensin on dopamine inhibition in different regions of the rat brain: an iontophoretic study. *Neuroscience* 47, 613–619.
- Binder, E.B., Kinkead, B., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2001. Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol. Rev.* 53, 453–486.
- Botto, J.M., Chabry, J., Sarret, P., Vincent, J.P., Mazella, J., 1998. Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 585–590.
- Boules, M., Shaw, A., Fredrickson, P., Richelson, E., 2007. Neurotensin agonists: potential in the treatment of schizophrenia. *CNS Drugs* 21, 13–23.
- Cáceda, R., Kinkead, B., Nemeroff, C.B., 2006. Neurotensin: role in psychiatric and neurological diseases. *Peptides* 27, 2385–2404.
- Cáceda, R., Kinkead, B., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2005. Virally mediated increased neurotensin 1 receptor in the nucleus accumbens decreases behavioral effects of mesolimbic system activation. *J. Neurosci.* 25, 11748–11756.
- Cathala, L., Paupardin-Tritsch, D., 1997. Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J. Physiol. (Lond.)* 503 (Pt 1), 87–97.
- Dal Bo, G., Bérubé-Carrière, N., Mendez, J.A., Leo, D., Riad, M., Descarries, L., Lévesque, D., Trudeau, L.-E., 2008. Enhanced glutamatergic phenotype of

- mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156, 59–70.
- Díaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., Narváez, J.A., Finetti, S., Antonelli, T., Tanganelli, S., Ferraro, L., 2002. Neurotensin-induced modulation of dopamine D2 receptors and their function in rat striatum: counteraction by a NTR1-like receptor antagonist. *Neuroreport* 13, 763–766.
- Farkas, R.H., Chien, P.Y., Nakajima, S., Nakajima, Y., 1997. Neurotensin and dopamine D2 activation oppositely regulate the same K⁺ conductance in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci. Lett.* 231, 21–24.
- 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.
- Fasano, C., Thibault, D., Trudeau, L.-E., 2008. Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3, Unit 3.21.
- Fassio, A., Evans, G., Grisshammer, R., Bolam, J.P., Mimmack, M., Emson, P.C., 2000. Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology* 39, 1430–1442.
- Feifel, D., Mexal, S., Melendez, G., Liu, P.Y.T., Goldenberg, J.R., Shilling, P.D., 2009. The brattleboro rat displays a natural deficit in social discrimination that is restored by clozapine and a neurotensin analog. *Neuropsychopharmacology* 34, 2011–2018.
- Feifel, D., Pang, Z., Shilling, P.D., Melendez, G., Schreiber, R., Button, D., 2010. Sensorimotor gating in neurotensin-1 receptor null mice. *Neuropharmacology* 58, 173–178.
- Garver, D.L., Bissette, G., Yao, J.K., Nemeroff, C.B., 1991. Relation of CSF neurotensin concentrations to symptoms and drug response of psychotic patients. *Am J Psychiatry* 148, 484–488.

- Gurevich, E.V., Benovic, J.L., Gurevich, V.V., 2002. Arrestin2 and arrestin3 are differentially expressed in the rat brain during postnatal development. *Neuroscience* 109, 421–436.
- Ito, K., Haga, T., Lameh, J., Sadée, W., 1999. Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur. J. Biochem.* 260, 112–119.
- Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K., Haga, T., 1999. Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur. J. Biochem.* 263, 596–602.
- Jiang, Z.G., Pessia, M., North, R.A., 1994. Neurotensin excitation of rat ventral tegmental neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 474, 119–129.
- Jomphe, C., Bourque, M.-J., Fortin, G.D., St-Gelais, F., Okano, H., Kobayashi, K., Trudeau, L.-E., 2005. Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J. Neurosci. Methods* 146, 1–12.
- Jomphe, C., Lemelin, P.-L., Okano, H., Kobayashi, K., Trudeau, L.-E., 2006. Bidirectional regulation of dopamine D2 and neurotensin NTS1 receptors in dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2789–2800.
- Kabbani, N., Jeromin, A., Levenson, R., 2004. Dynamin-2 associates with the dopamine receptor signalplex and regulates internalization of activated D2 receptors. *Cell. Signal.* 16, 497–503.
- Kennedy, R.T., Jones, S.R., Wightman, R.M., 1992. Dynamic observation of dopamine autoreceptor effects in rat striatal slices. *J. Neurochem.* 59, 449–455.
- Khan, Z.U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., de la Calle, A., Goldman-Rakic, P.S., 1998. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7731–7736.

- Kim, K.M., Nakajima, Y., Nakajima, S., 1995. G protein-coupled inward rectifier modulated by dopamine agonists in cultured substantia nigra neurons. *Neuroscience* 69, 1145–1158.
- Kim, K.M., Valenzano, K.J., Robinson, S.R., Yao, W.D., Barak, L.S., Caron, M.G., 2001. Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* 276, 37409–37414.
- Kinkead, B., Dobner, P.R., Egnatashvili, V., Murray, T., Deitemeyer, N., Nemeroff, C.B., 2005. Neurotensin-deficient mice have deficits in prepulse inhibition: restoration by clozapine but not haloperidol, olanzapine, or quetiapine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 256–264.
- Kinkead, B., Nemeroff, C.B., 2002. Neurotensin: an endogenous antipsychotic? *Curr Opin Pharmacol* 2, 99–103.
- Lacey, M.G., Mercuri, N.B., North, R.A., 1987. Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J. Physiol. (Lond.)* 392, 397–416.
- Li, X.M., Hedlund, P.B., Fuxe, K., 1994. Strong effects of NT/NN peptides on DA D2 receptors in rat neostriatal sections. *Neuroreport* 5, 1621–1624.
- Li, Z., Boules, M., Williams, K., Peris, J., Richelson, E., 2010. The novel neurotensin analog NT69L blocks phencyclidine (PCP)-induced increases in locomotor activity and PCP-induced increases in monoamine and amino acids levels in the medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 1311, 28–36.
- Liang, Y., Boules, M., Li, Z., Williams, K., Miura, T., Oliveros, A., Richelson, E., 2010. Hyperactivity of the dopaminergic system in NTS1 and NTS2 null mice. *Neuropharmacology* 58, 1199–1205.
- Lindgren, N., Usiello, A., Goiny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., Hokfelt, T., Borrelli, E., Fisone, G., 2003. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4305–4309.

- Liu, Y.F., Civelli, O., Grandy, D.K., Albert, P.R., 1992. Differential sensitivity of the short and long human dopamine D2 receptor subtypes to protein kinase C. *J. Neurochem.* 59, 2311–2317.
- Matsushita, N., Okada, H., Yasoshima, Y., Takahashi, K., Kiuchi, K., Kobayashi, K., 2002. Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J. Neurochem.* 82, 295–304.
- Mechanic, J.A., Sutton, J.E., Berson, A.E., Wu, X., Kwan, J., Schreiber, R., Pang, Z., Button, D.C., 2009. Involvement of the neurotensin receptor 1 in the behavioral effects of two neurotensin agonists, NT-2 and NT69L: lack of hypothermic, antinociceptive and antipsychotic actions in receptor knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 19, 466–475.
- Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Dal Bo, G., Bourdeau, M.L., Danik, M., Williams, S., Lacaille, J.-C., Trudeau, L.-E., 2008. Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J. Neurosci.* 28, 6309–6318.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225.
- Morris, S.J., Van-Ham, I.I., Daigle, M., Robillard, L., Sajedi, N., Albert, P.R., 2007. Differential desensitization of dopamine D2 receptor isoforms by protein kinase C: the importance of receptor phosphorylation and pseudosubstrate sites. *Eur. J. Pharmacol.* 577, 44–53.
- Namkung, Y., Dipace, C., Javitch, J.A., Sibley, D.R., 2009. G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation regulates post-endocytic trafficking of the D2 dopamine receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 15038–15051.
- Namkung, Y., Dipace, C., Urizar, E., Javitch, J.A., Sibley, D.R., 2009. G protein-coupled receptor kinase-2 constitutively regulates D2 dopamine receptor expression and signaling independently of receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284, 34103–34115.

- Namkung, Y., Sibley, D.R., 2004. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 49533–49541.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Widerlov, E., Beckmann, H., Gerner, R., Manberg, P.J., Lindstrom, L., Prange, A.J., Jr, Gattaz, W.F., 1989. Neurotensin-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, depression, anorexia nervosa-bulimia, and premenstrual syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1, 16–20.
- Nicot, A., Rostène, W., Béroud, A., 1995. Differential expression of neurotensin receptor mRNA in the dopaminergic cell groups of the rat diencephalon and mesencephalon. *J. Neurosci. Res.* 40, 667–674.
- Norman, C., Beckett, S.R.G., Spicer, C.H., Ashton, D., Langlois, X., Bennett, G.W., 2008. Effects of chronic infusion of neurotensin and a neurotensin NT1 selective analogue PD149163 on amphetamine-induced hyperlocomotion. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 22, 300–307.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., Barak, L.S., 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 17201–17210.
- Radke, J.M., Owens, M.J., Ritchie, J.C., Nemeroff, C.B., 1998. Atypical antipsychotic drugs selectively increase neurotensin efflux in dopamine terminal regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11462–11464.
- Sawamoto, K., Nakao, N., Kakishita, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Yamamoto, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A., Itakura, T., Okano, H., 2001. Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J. Neurosci.* 21, 3895–3903.

- Sharma, R.P., Janicak, P.G., Bissette, G., Nemeroff, C.B., 1997. CSF neurotensin concentrations and antipsychotic treatment in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 154, 1019–1021.
- Shi, W.X., Bunney, B.S., 1992. Actions of neurotensin: a review of the electrophysiological studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 668, 129–145.
- Skinbjerg, M., Ariano, M.A., Thorsell, A., Heilig, M., Halldin, C., Innis, R.B., Sibley, D.R., 2009. Arrestin3 mediates D(2) dopamine receptor internalization. *Synapse* 63, 621–624.
- St-Gelais, F., Jomphe, C., Trudeau, L.-E., 2006. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci* 31, 229–245.
- St-Gelais, F., Legault, M., Bourque, M.-J., Rompré, P.-P., Trudeau, L.-E., 2004. Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J. Neurosci.* 24, 2566–2574.
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525.
- Uchida, S., Akaike, N., Nabekura, J., 2000. Dopamine activates inward rectifier K⁺ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology* 39, 191–201.
- 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.
- Vandenbulcke, F., Nouel, D., Vincent, J.P., Mazella, J., Beaudet, A., 2000. Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 17), 2963–2975.
- Vickery, R.G., von Zastrow, M., 1999. Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J. Cell Biol.* 144, 31–43.

- Watson, M.A., Yamada, M., Yamada, M., Cusack, B., Veverka, K., Bolden-Watson, C., Richelson, E., 1992. The rat neurotensin receptor expressed in Chinese hamster ovary cells mediates the release of inositol phosphates. *J. Neurochem.* 59, 1967–1970.
- Wolfe, B.L., Trejo, J., 2007. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8, 462–470.
- Wu, T., Li, A., Wang, H.L., 1995. Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res.* 683, 242–250.
- Wu, T., Wang, H.L., 1995. Protein kinase C mediates neurotensin inhibition of inwardly rectifying potassium currents in rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neurosci. Lett.* 184, 121–124.
- Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G., Ferguson, S.S., 1999. Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* 274, 10999–11006.

FOOTNOTES

We are grateful for the technical assistance provided by Marie-Josée Bourque. This work was supported by a CIHR (MOP-49591) grant to L-ET, Ontario Mental Health Foundation grant to PRA, by a FRSQ infrastructure grant to the GRSNC and by a graduate studentship from the CIHR to DT.

FIGURES

Figure 1

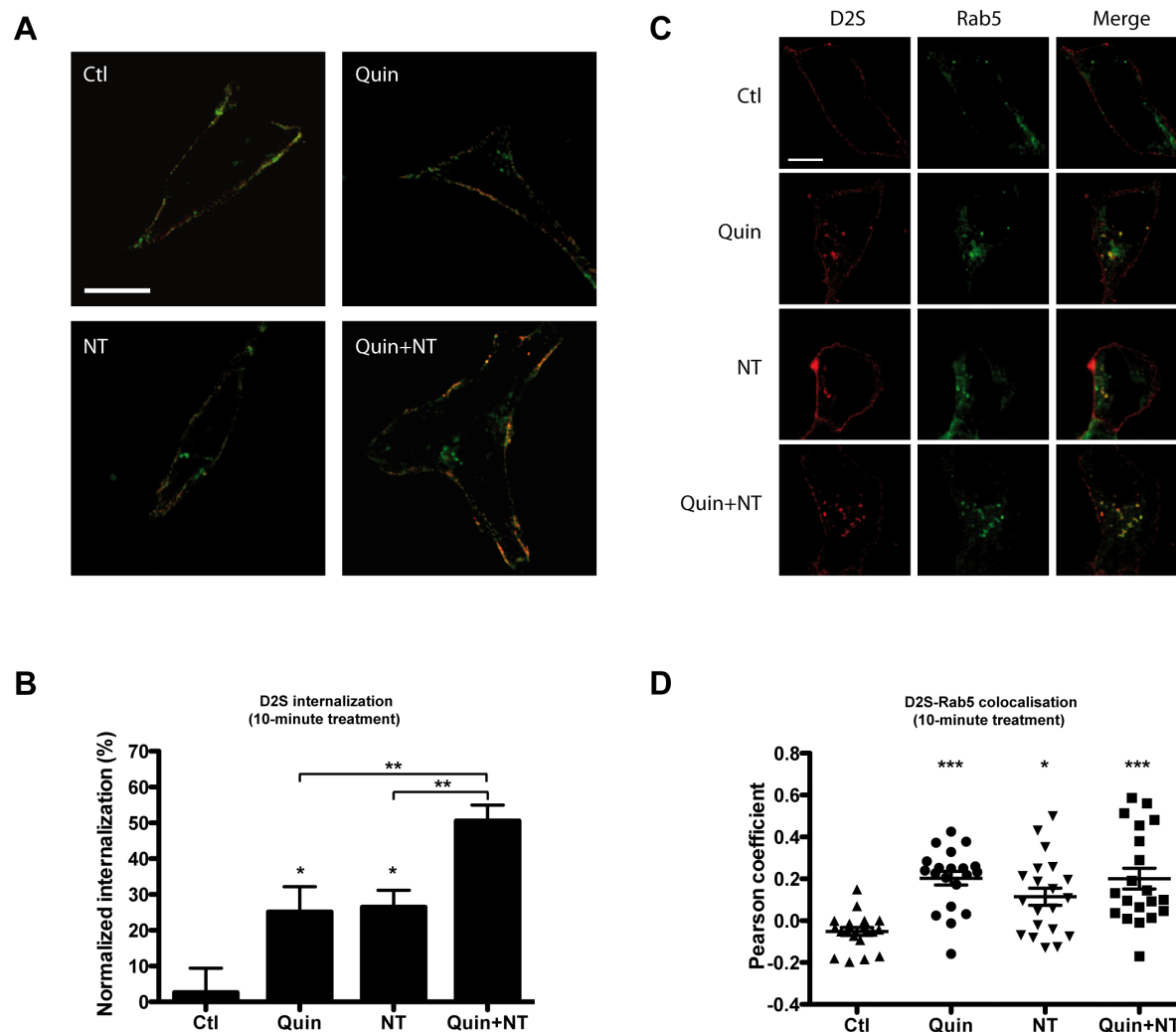


Figure 1: NT induces D2S internalization in transfected HEK-293 cells. HEK-293 cells transfected with D2S and NTR1 were exposed to receptor agonists (10 μ M Quin and/or 10 nM NT) for 10 minutes to measure membrane-labeled D2R internalization and colocalization with Rab5 by immunofluorescence. A: Immunolabeling against the flag epitope of membrane D2S-flag using 2 different secondary antibodies before and after permeabilization, such that the internalized signal appears in pure green and the membrane

signal appears in red and yellow. Scale bar = 15 μm . B: Quantification of D2S internalization treatment measured by immunofluorescence and normalized against the total signal of each cell (n=26 for Ctl, 29 for Quin, 37 for NT and 36 for Quin+NT; results from 3 separate experiments). C: Immunolabeling against the flag epitope of membrane D2S-flag (red) and GFP from cotransfected endosomal protein Rab5-GFP (green). Scale bar = 10 μm . D: Colocalization of D2S and Rab5 signals analysed by Pearson correlation coefficient following treatment (n = 20 for every group). (* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests)

Figure 2

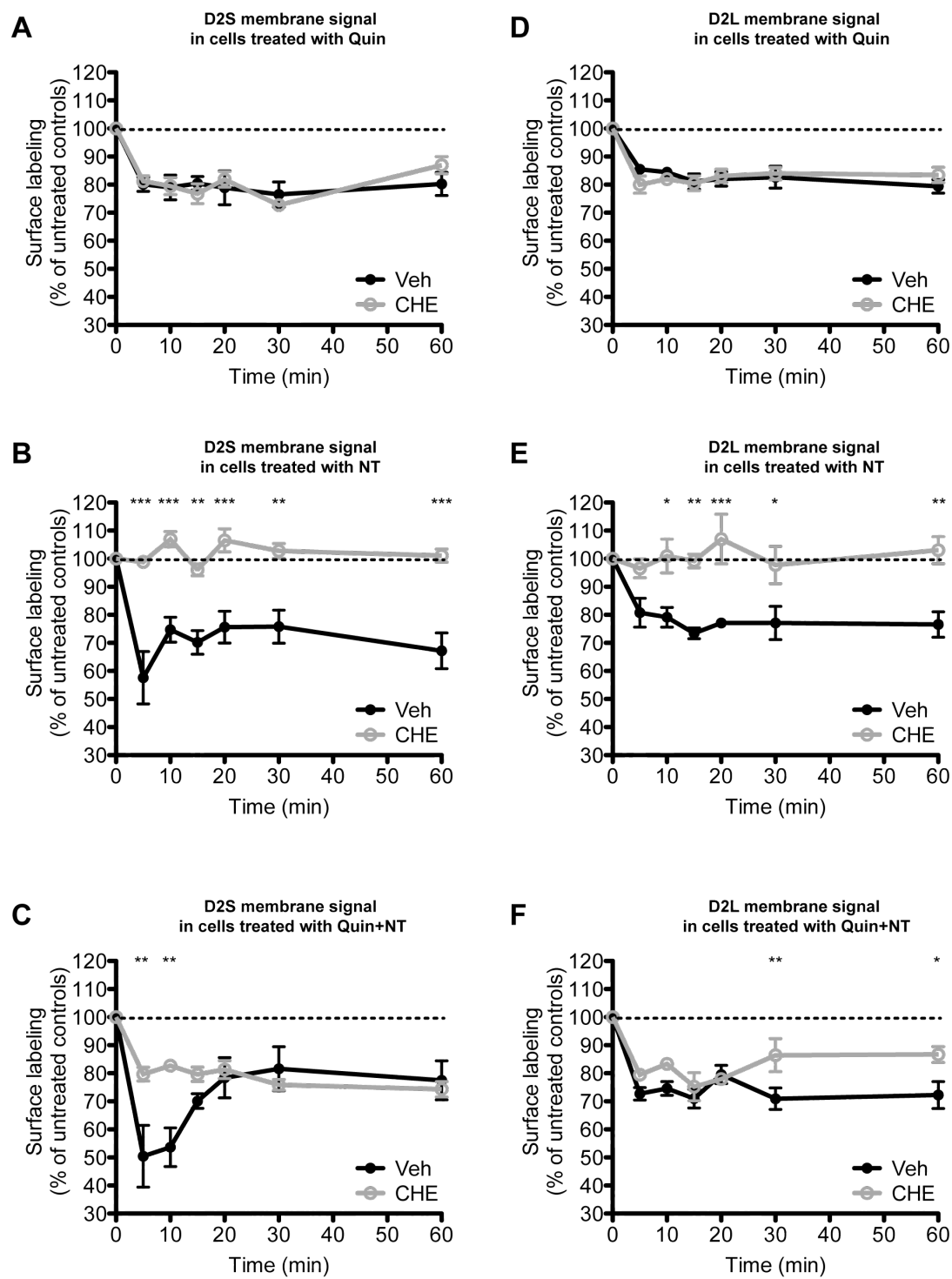


Figure 2: NT-induced D2R internalization in transfected HEK-293 cells is PKC-dependent. Time course of D2R internalization measured by ELISA as the loss of membrane signal. Black curves: vehicle pre-treatment (Veh). Gray curves: chelerythrine pre-treatment (CHE). A-C: Internalization profile of the D2S in response to Quin, NT and Quin+NT treatments respectively. D-F: Internalization profile of the D2L in response to Quin, NT and Quin+NT treatments respectively. (* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests, n=4-7 experiments)

Figure 3

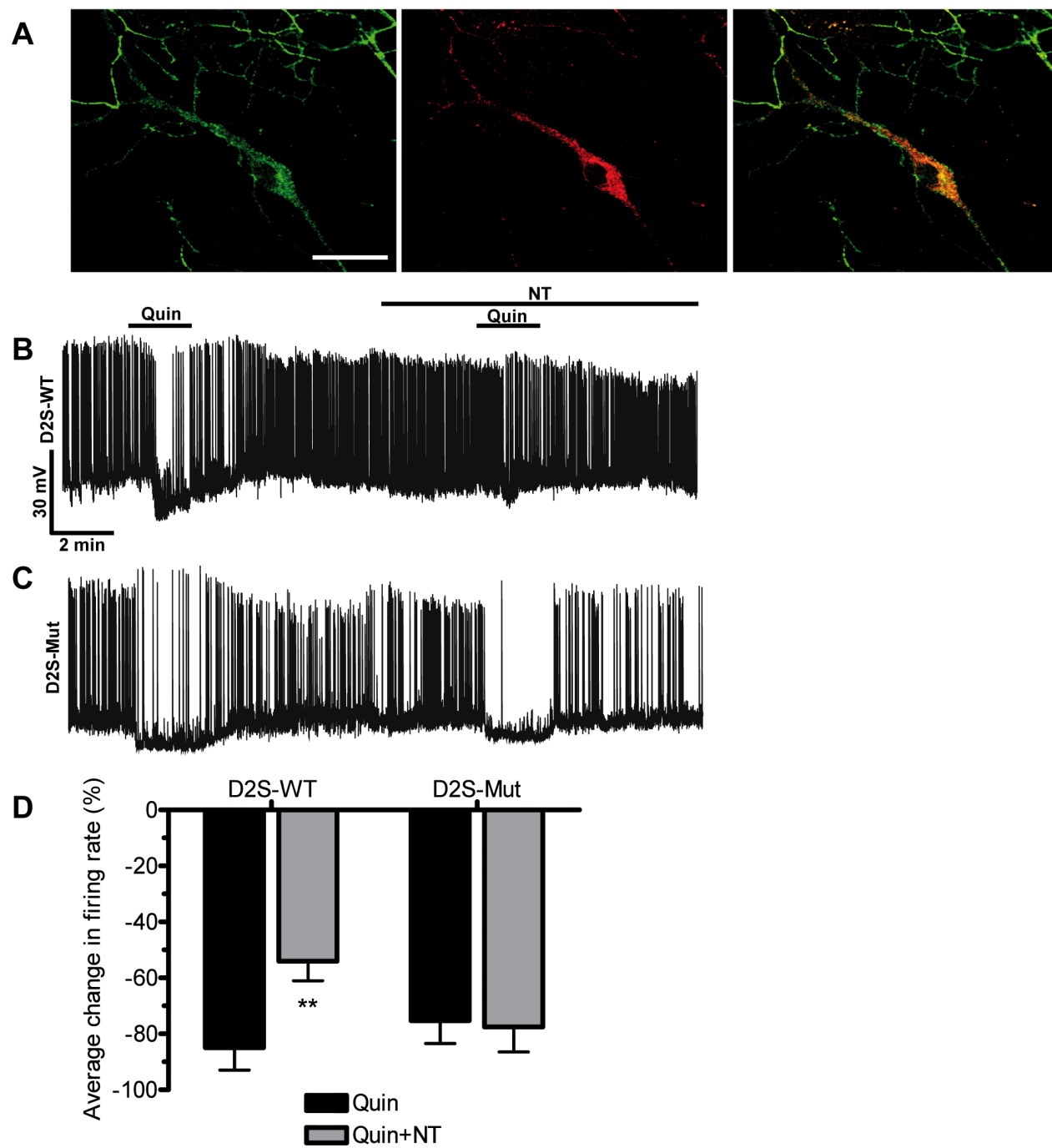


Figure 3: Mutation of D2S PKC phosphorylation sites prevents NT-mediated reduction in D2R function in cultured DA neurons. Patch-clamp whole-cell recordings of DA neurons in culture transfected with either a normal D2S receptor (D2S-WT) or a version in which three PKC phosphorylation sites (T225A, S228G and S229G) have been mutated (D2S-Mut). A: Example of a transfected cultured DA neuron identified by immunostaining against the DA transporter (green) and the flag epitope of D2S-WT (red). Scale bar = 25 μm . B: Example of a patch-clamp recording in a DA neuron transfected with D2S-WT following a typical NT treatment protocol. C: Same as B but in a neuron transfected with D2S-mut. D: Average effect of the D2 agonist Quin on firing rate in the absence (Quin) or presence of NT pre-application (Quin+NT) in the two transfection conditions of B and C. (** $p < 0.01$; two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests; $n = 7$ for D2S-WT and 5 for D2S-Mut)

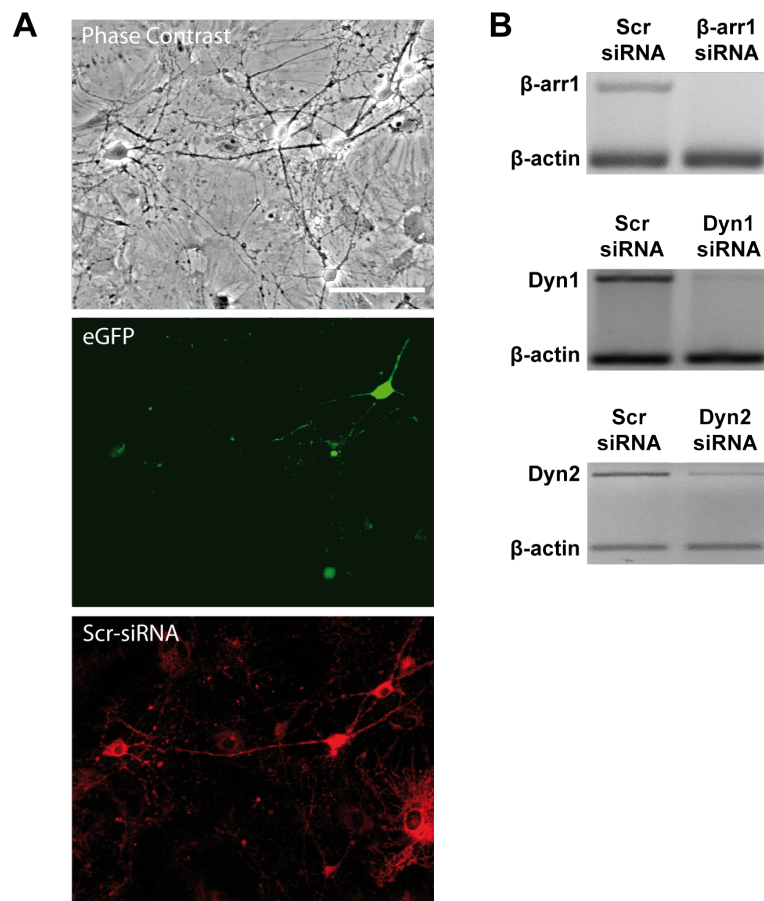
Figure 4

Figure 4: Knockdown of β -arr1, Dyn1 and Dyn2 in cultured DA neurons. A: Top: phase contrast image of a DA neuron culture. Middle: same field as A but showing eGFP expressed endogenously by DA neurons from transgenic TH-eGFP mice. At the bottom, same field as A and B but showing transfection with fluorescent scrambled siRNA molecules used for control (Scr). Scale bar = 100 μ m. B: Agarose gels showing the product of mRNA amplification by RT-PCR after RNA extraction from DA neuron cultures transfected with Scr and either β -arr1- (top) Dyn1- (middle) or Dyn2-targeting siRNA molecules (bottom). In every example, β -actin was also amplified to normalize the results of the knockdown.

Figure 5

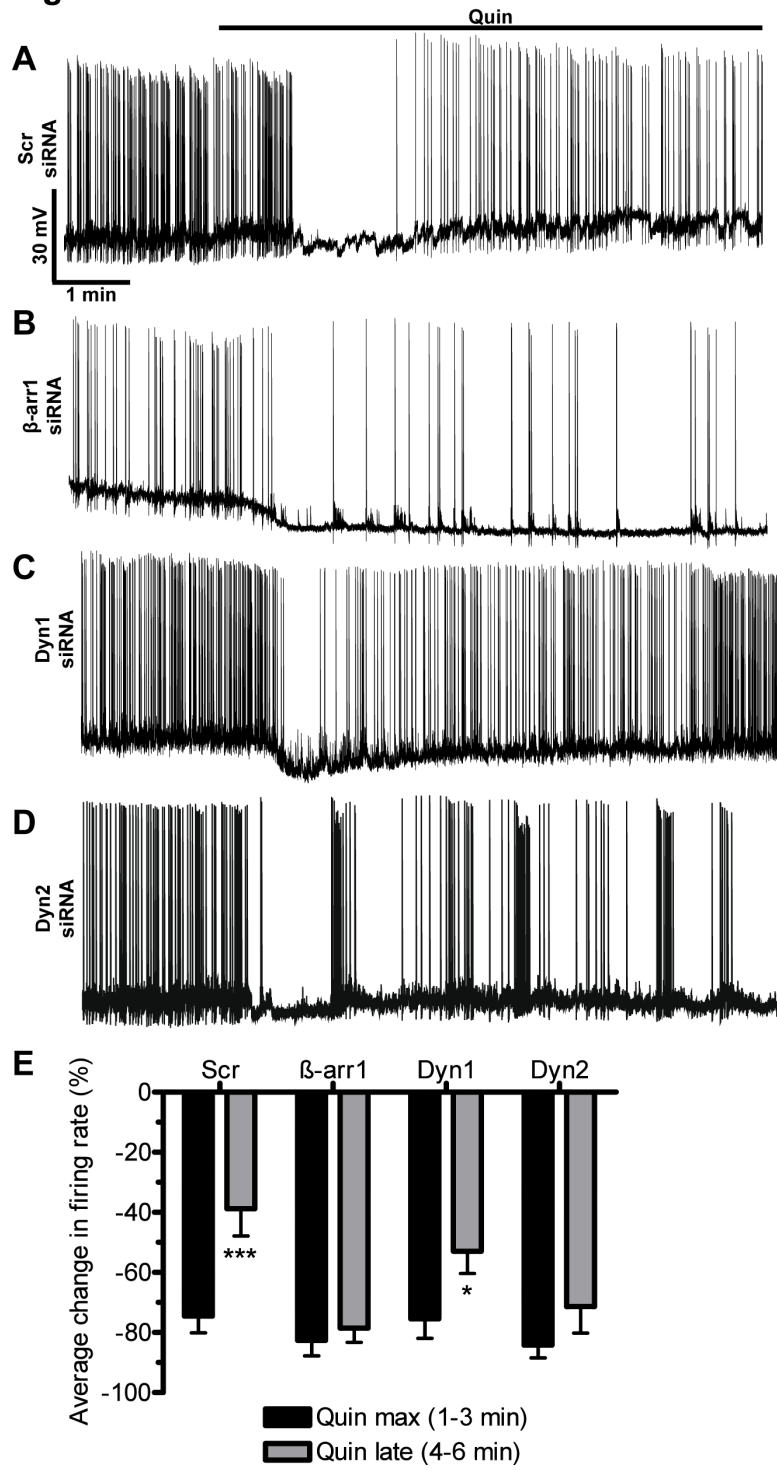


Figure 5: Knockdown of β -arr1 and Dyn2 but not Dyn1 prevents Quin-mediated reduction in D2R function in cultured DA neurons. Patch-clamp whole-cell recordings of DA neurons in culture transfected with siRNA molecules. A-D: Examples of prolonged Quin treatment protocols on recorded DA neurons transfected with Scr, β -arr1-, Dyn1- or Dyn2-targeting siRNA molecules, respectively. E: Comparison between the maximal initial effect of Quin (Quin max 1-3 min) and the late effects (Quin late 4-6 min) of this D2R agonist on spontaneous firing rate as a measure of D2R functional desensitization. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests, $n=16$ for Scr, $n=9$ for β -arr1, $n=8$ for Dyn1 and $n=9$ for Dyn2)

Figure 6

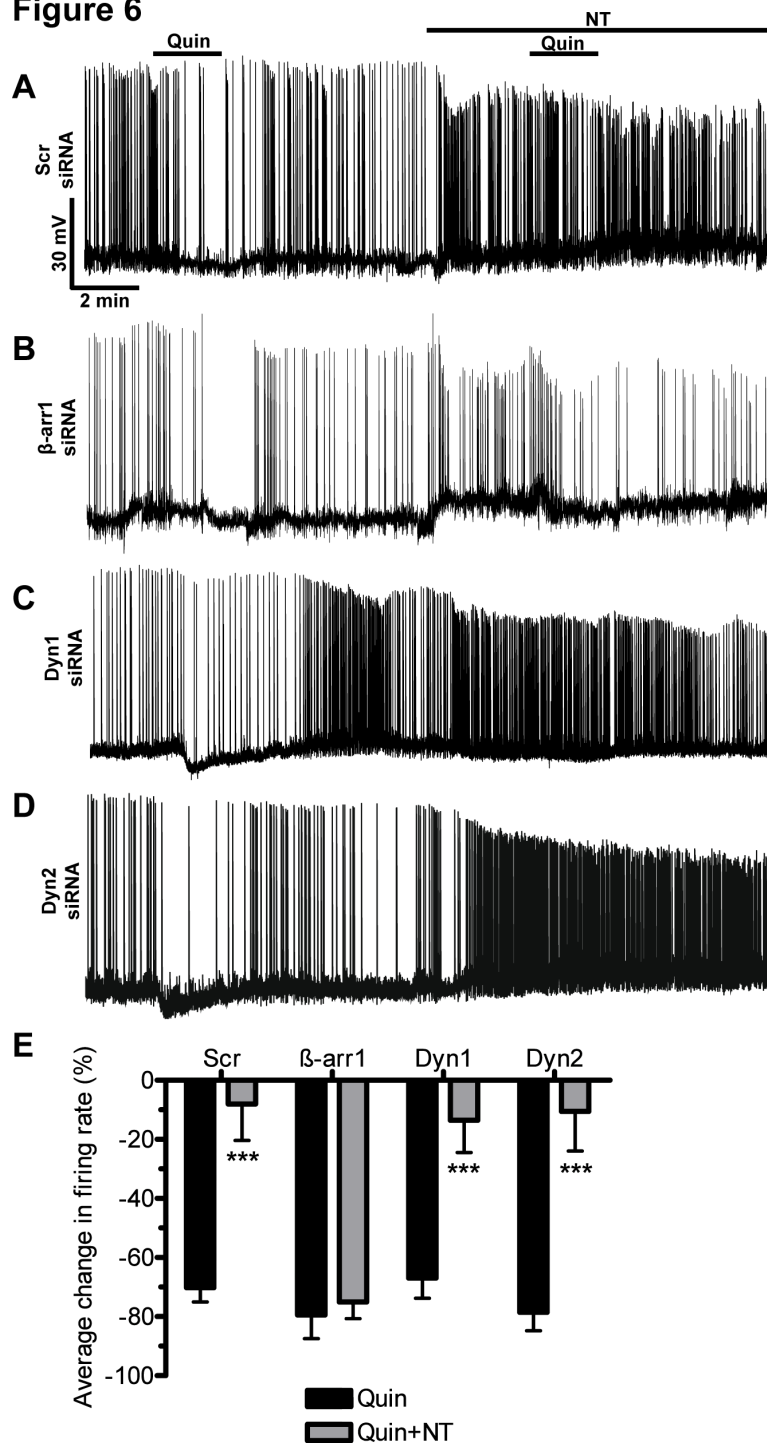


Figure 6: Knockdown of β -arr1 but not Dyn2 or Dyn1 prevents the ability of NT to reduce D2R function in cultured DA neurons. Patch-clamp whole-cell recordings of cultured DA neurons transfected with siRNA molecules. A-D: Examples of NT-treatment protocols on recorded DA neurons transfected with Scr, β -arr1-, Dyn1- or Dyn2-targeting siRNA molecules respectively. E: Summary diagram showing the ability of NT to reduce Quin-induced firing rate inhibition. The black bars show the initial effect of Quin alone (Quin), while the grey bars show the effect of Quin after pre-treatment with NT (Quin+NT). (* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests, n=5 for Scr, 7 for β -arr1, 5 for Dyn1 and 6 for Dyn2)

Article 2

Characterization of D1 and D2 dopamine receptor segregation in the developing striatum

Dominic Thibault^{*}, Fabien Loustalot^{*}, Marie-Josée Bourque and Louis-Éric Trudeau.

Department of Pharmacology, Neuroscience Research Group, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

*denotes equal contribution

Address correspondence to:

Louis-Eric Trudeau, Ph.D.

Department of pharmacology

Faculty of Medicine

Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec

H3C 3J7

Phone : 514-343-5692

ABSTRACT

The striatum is predominantly composed of medium spiny neurons (MSNs) that send their axons along two parallel pathways known as the direct and indirect pathways. MSNs from the direct pathway express high levels of D1 dopamine receptors, while MSNs from the indirect pathway express high levels of D2 dopamine receptors. There has been much debate over the extent of colocalization of these two major dopamine receptors in MSNs of adult animals. In addition, the ontogeny of the segregation process has never been investigated. In this paper, we crossed bacterial artificial chromosome *drd1a-tdTomato* and *drd2-GFP* reporter transgenic mice to track D1-D2 co-expression in the developing striatum as well as in striatal primary cultures. We show that segregation is already extensive at E18 and that the degree of co-expression further decreases at P0 and P14. Finally, we also demonstrate that cultured MSNs maintain their very high degree of D1-D2 segregation, thus validating them as a relevant *in vitro* model.

INTRODUCTION

The striatum is the input nucleus of the basal ganglia, a neuronal network crucial for action selection and motor control (Mink, 1996; Redgrave et al., 1999; Cisek and Kalaska, 2010). The vast majority of neurons that form the striatum are small GABAergic projection neurons called medium spiny neurons (MSNs). It is well accepted that MSNs send their axons in two parallel and mostly exclusive pathways: either to the external segment of the globus pallidus via the indirect pathway, or to the substantia nigra pars reticulata and the internal segment of the globus pallidus via the direct pathway (Kawaguchi, 1997; Smith et al., 1998; Wu et al., 2000; Bertran-Gonzalez et al., 2010). As their name implies, MSNs express a high density of dendritic spines with which afferent glutamatergic fibers from the cortex and the thalamus form excitatory synapses (Bolam et al., 2000). MSNs also receive important inputs from dopaminergic (DAergic) neurons of the substantia nigra pars compacta (Nicola et al., 2000; Gerfen and Surmeier, 2011; Rice et al., 2011; Surmeier et al., 2011). Although the extent and relevance of co-expression of D1 and D2 receptors in MSNs is still the subject of considerable debate (Hasbi et al., 2009, 2010), MSNs that form the direct pathway have consistently been found to express high amounts of D1 dopamine (DA) receptors and very little D2 DA receptors. Conversely, MSNs of the indirect pathway express high amounts of D2 DA receptors and very little D1 DA receptors (Hasbi et al., 2009; Gerfen et al., 1990; Meador-Woodruff et al., 1991; Weiner et al., 1991; Lester et al., 1993; Larson and Ariano, 1994; Le Moine and Bloch, 1995; Surmeier et al., 1996; Rashid et al., 2007). Much of the available data on D1/D2 co-expression in MSNs has been obtained in mature animals, leaving the establishment of the DA receptor segregation through development mostly unexplored (Bertran-Gonzalez et al., 2010). In addition, although MSN neurons in primary culture are a commonly used *in vitro* model, whether D1/D2 segregation is faithfully maintained in culture is unclear. For example, some groups have reported very high colocalization of D1 and D2 receptors *in vitro* with either binding assays (Wong et al., 1999) or immunolabeling (Hasbi et al., 2009; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2004), suggesting a loss of segregation *in vitro* (Bertran-Gonzalez et al., 2010). Due

to limitations in the sensitivity and selectivity of the techniques used to detect DA receptors in these previous studies, an examination of D1 and D2 gene expression using approaches such as transgenic reporter mice is warranted and could greatly clarify the issue.

Transgenic animals expressing reporter genes that encode fluorescent proteins, represent invaluable tools in the investigation of individual MSN populations (Valjent et al., 2009; Chan et al., 2012; Nelson et al., 2012). In the present study, we crossed *drd1a*-tdTomato and *drd2*-GFP bacterial artificial chromosomes (BAC) transgenic mice to examine D1 and D2 receptor gene expression both *in vivo* and *in vitro*. We found that *in vivo*, at embryonic day 18 (E18), at birth (P0) and at postnatal day 14 (P14), there is never more than about 10 % colocalization between the D1 and D2 reporter genes. Furthermore, we find a gradual decrease in the percentage of colocalization from E18 to P0 and P14, reaching levels under 5%. Additionally, we demonstrate that this segregation is maintained *in vitro*, independently of the identity of neuronal populations interacting with MSNs (mesencephalic and/or cortical neurons).

MATERIALS AND METHODS

Animals - BAC transgenic *drd1a*-tdTomato (Shuen et al., 2008) and *drd2*-GFP (Gong et al., 2003) mice, backcrossed on a C57BL/6 background, were maintained in individual colonies. Heterozygous animals from each strain were crossed to yield double-transgenic animals at the expected ratio of 25 % per litter. VGluT2^{f/f}

Brain slice preparation - For embryonic animals, gestating mice were anesthetized with halothane and quickly decapitated. Embryos were extracted and put in ice-cold physiological saline solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 6 sucrose and 10 glucose, adjusted at pH 7.35. P0 pups were cryoanesthetized, and P14 pups were anesthetized with halothane. All brains were quickly harvested upon anesthesia and maintained in ice-cold saline solution for assessment of genotype under a fluorescence microscope; only pups showing both red (tdTomato) and green (GFP) fluorescence were selected for experiments. Double-transgenic brains were immediately fixed in 4 % PFA for 48 hours at 4 °C. Coronal sections (100 µm thick) were cut in ice-cold PBS with a Leica VT1000s vibrating microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Acutely dissociated neurons – The dissociations were performed according to a previously described protocol (Mendez et al., 2008). Briefly, a block of dorsal striatum was manually dissected from double-transgenic brains that were harvested in the same manner as for slice preparation. For E18 and P0 brains, the striatal tissue block was incubated for 20 min at 37 °C in papain (Worthington Biochemicals) and then mechanically dissociated into a cell suspension. Striatal blocks from P14 brains were incubated for 30 min at 30 °C with trypsin in an oxygenated piperazine-N-N-bis(2-ethane sulfonic acid) (PIPES) solution containing (in mM): 120 NaCl, 2 KCl, 0.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 glucose, and 20 PIPES at pH 7.0. These blocks were then washed 2 times with an oxygenated PIPES solution containing 10 % fetal bovine serum, then left to rest at room temperature in an

oxygenated PIPES solution for 1 h before subsequent mechanical dissociation into a cell suspension. All striatal cell suspensions (E18, P0 and P14) were seeded on polyethyleneimine (PEI)-coated glass coverslips at a density ranging from 250 000 to 500 000 cells/mL, depending on yield, and maintained at room temperature for 15 min before fixation for 30 min in 4 % PFA.

Postnatal primary neuron cultures - Cultures were prepared according to a previously described protocol (Fasano et al., 2008). Four different types of cultures were prepared. Briefly, dissociated neurons from the dorsal striatum (double-transgenic) and/or cortex (wild-type) and/or ventral mesencephalon (wild-type) of P0-P2 animals were seeded on a monolayer of cortical astrocytes (wild-type) grown on poly-L-lysine-coated glass coverslips. The total seeded neuron density was always 240,000 cells/mL broken down as follows (in cells/mL): 240,000 striatal cells for monocultures (Mono); 140,000 striatal cells plus 100,000 cortical cells for co-cortical cultures (CoCx); 140,000 striatal cells plus 100,000 mesencephalic cells for co-mesencephalic cultures (CoMs); 40,000 striatal cells plus 100,000 mesencephalic cells, plus 100,000 cortical cells for triple cultures (3x). These cultures, incubated at 37 °C in 5 % CO₂, were maintained in Neurobasal medium enriched with 1% penicillin/streptomycin, 1% Glutamax, 2% B-27 supplement and 5% fetal bovine serum.

Immunostaining and image quantification - Brain sections, acutely dissociated neurons and primary cultured neurons were immunolabeled for tdTomato (D1-MSNs) and GFP (D2-MSNs) with the following antibodies: rabbit anti-RFP (Rockland, Gilbertsville, PA, USA, 1:500) detected with ALEXA 546 goat anti-rabbit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, 1:500) and chicken anti-GFP (Millipore, Billerica, MA, USA, 1:1000) detected with ALEXA 488 goat anti-chicken (Molecular Probes, 1:500). Images were captured with a laser scanning confocal microscope (FV1000 MPE, Olympus) equipped with multi-argon and helium/neon lasers. Quantifications in sections (P14 only), acutely dissociated neurons and cultured neurons were performed blindly by first evaluating neurons in individual

detection channels to assess the distribution of D1 and D2 MSN populations, followed by merging the single images to identify and count doubly-labeled neurons. Double-labeled neurons are thus included in the D1 and D2 MSN counts. The values shown always represent a percentage of the total number of counted fluorescent neurons, as only D1- and/or D2-labeled cells were counted.

Statistical analysis - Data are presented as mean \pm SEM. The level of statistical significance was established at $p < 0.05$ in one-way and two-way ANOVAs. Statistical outliers were excluded when they differed by more than two standard deviations above or below the mean (one P14 brain slice, two coverslips of acutely dissociated neurons and two coverslips of neuronal cultures were thus excluded from final analyses).

RESULTS

Quantification of labeled neurons in striatal sections – We first characterized tdTomato (D1-positive neurons) and GFP (D2-positive neurons) immunostaining in coronal brain sections of double-transgenic mice at E18, P0 and P14. In sections from P14 mice (Fig. 1A), 61.70 ± 1.03 % of dorsal striatal neurons were D1-positive and 39.81 ± 1.01 % were D2-positive (Fig. 1B, $n = 7$). Only a very small proportion of those were D1/D2-positive (1.51 ± 0.22 %). In brain sections prepared from E18 and P0 mice, the tdTomato signal to noise ratio in neuronal cell bodies was typically too low to obtain reliable quantifications of the proportion of immunopositive neurons (Fig. 1A).

Quantification of labeled neurons after acute dissociation – We immunostained acutely dissociated striatal neurons to further examine D1 and D2 reporter gene expression at earlier developmental time points. We found that in acutely dissociated P14 MSNs, 60.73 ± 0.66 % of dorsal striatal neurons were D1-positive and 42.70 ± 0.85 % were D2-positive (Fig. 2). Only 3.43 ± 0.61 % of those were D1/D2-positive. Although not statistically significant, there was a tendency for a more efficient detection of D1/D2-expressing MSNs in acutely dissociated neurons in comparison to brain sections ($p = 0.053$ for slices versus acutely dissociated, two-way ANOVA, $n = 7$), most likely because of the better signal to noise ratio. Extending this analysis to P0 and E18 tissue, we observed a significant decrease of the proportion of D1-expressing neurons as a function of age (79.99 ± 1.92 % at E18, 67.20 ± 1.21 % at P0 and 60.73 ± 0.66 % at P14, $p < 0.001$, one-way ANOVA, Fig. 2B). The opposite effect was observed for D2-expressing MSNs, with the proportion increasing as a function of age (29.46 ± 1.76 % at E18, 38.03 ± 1.59 % at P0 and 42.70 ± 0.85 % at P14, $p < 0.001$, one-way ANOVA, Fig. 2C). The proportion of D1-expressing MSNs at E18 was significantly higher than at P0 and P14, and P0 was also higher than P14, while the proportion of D2-expressing MSNs at E18 was significantly lower than at P0 and P14 ($p < 0.001$ for D1 at E18 versus P0 and P14, $p < 0.05$ for D1 at P0 versus P14, $p < 0.01$ for D2 at E18 versus P0 and P14, Bonferroni's multiple comparison test, $n = 8$ for E18, 15 for

P0 and 7 for P14). We also observed a decrease in the percentage of doubly-labeled D1/D2-expressing neurons at P0 and P14 compared to E18 (9.45 ± 0.75 % at E18, 5.24 ± 0.65 % at P0 and 3.43 ± 0.61 % at P14; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; $p < 0.001$ for E18 versus P0 and P14 in Bonferroni's multiple comparison test, $n = 8$ for E18, 15 for P0 and 7 for P14, Fig. 2D). Thus, our results indicate that there are more neurons that express D1 than D2 reporter constructs in double-transgenic mice at each time points examined, with a more important difference at the earliest time point (E18). Moreover, the level of D1/D2 co-expression decreased with age.

Quantification of labeled neurons in culture – The preservation of D1-D2 segregation *in vitro* has been previously questioned on many accounts (Shetreat et al., 1996; Wong et al., 1999; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2004; Hasbi et al., 2009). To resolve this controversy, we next examined reporter gene expression in primary cultured MSNs prepared from P0 double-transgenic mice. In order to determine if D1-D2 segregation was further influenced by neuronal interactions, we compared four different culture conditions: striatal neurons alone (Mono), striatal neurons with cortical neurons (CoCx), striatal neurons with mesencephalic neurons (CoMs) or striatal neurons with mesencephalic and cortical neurons (3x). Neurons were fixed at 14 days *in vitro* (DIV) and processed for tdTomato and GFP immunocytochemistry to count neurons that expressed either D1-, D2-driven fluorescent reporter proteins (Fig. 3A).

First, we observed that there was no significant difference in the percentage of tdTomato (D1)- and GFP (D2)-expressing neurons in the different culture conditions (D1: $p = 0.56$, Fig. 3B; D2: $p = 0.63$, Fig. 3C; one-way ANOVA, $n = 7-8$ culture coverslips per group). In fact, the approximate 60:40 ratio of tdTomato (D1)- and GFP (D2)-expressing neurons seen in brain sections and in acutely dissociated neurons at P14 was fully maintained between different culture conditions *in vitro* (Fig. 3). Second, the extent of fluorescent reporter colocalization in cultured neurons was very limited across culture types *in vitro* (Fig 3D), with values similar to those observed in acutely dissociated neurons at P14 (Fig. 2D). Although a tendency for reduced coexpression in cultures containing

mesencephalic dopamine neurons was observed, statistical analysis showed that there was no significant effect of the culture type (one-way ANOVA; $p = 0.40$, $n = 7-8$ culture coverslips per group). These results show that the segregation of D1 and D2 gene expression is essentially preserved *in vitro*.

DISCUSSION

In this study, we characterized D1 and D2 reporter gene expression in striatal neurons of *drd1a*-tdTomato/*drd2*-GFP double-transgenic mice of different ages and in several striatal culture conditions to assess the extent of D1-D2 DA receptor coexpression. Our first main result is that there is globally a higher proportion of neurons expressing the D1 than the D2 gene at all time points examined. Second, we found a decrease in the percentage of purely D1-expressing neurons to the profit of an increase of purely D2-expressing neurons in the striatum of P0 and P14 compared to E18 animals. Our third main result is that the shift from D1 to D2 reporter gene expression is accompanied by a decrease in the percentage of D1/D2 doubly-labeled neurons. Finally, we show that D1/D2 segregation is fully maintained in postnatal MSNs in primary culture, with colocalization of the fluorescent markers remaining below 5 %.

Over the years, there has been much debate over the exact degree of segregation between the direct and indirect projection pathways of MSNs, particularly concerning their selective expression of DA receptor subtypes (Gerfen et al., 1990; Meador-Woodruff et al., 1991; Weiner et al., 1991; Lester et al., 1993; Larson and Ariano, 1994; Le Moine and Bloch, 1995; Surmeier et al., 1996). Although striatal neurons expressing both receptors exist, leading to D1-D2 heteroreceptor formation with novel pharmacological properties (Rashid et al., 2007; Hasbi et al., 2009), the general consensus that has gradually emerged is that in the adult animal, most direct pathway striatonigral MSNs express high levels of D1 receptor while most indirect pathway striatopallidal MSNs express high levels of D2 receptor (Bertran-Gonzalez et al., 2010). Studies performed since the introduction of BAC *drd2*-GFP and *drd1a*-tdTomato transgenic mice have confirmed the high degree of D1-D2 dopamine receptor segregation in striatal neurons (Shuen et al., 2008; Ade et al., 2011). However, the initial establishment of this segregation during development had never been described before the present study.

In the present work, we reproduce previous data showing a general segregation between D1 and D2 receptor expression in the striatum. We also demonstrate that there is a

higher percentage of MSNs labeled with tdTomato than there are with GFP, and that difference is greater at E18 than P0 or P14. This result may appear to be in contradiction with a previous report showing that D2 receptor mRNA is more abundant than D1 receptor mRNA in the developing mouse striatum (Araki et al., 2007). However, it should be emphasized that our analysis was restricted to the percentage of cells that expressed D1- and D2-driven reporter proteins, while the actual level of D1 and D2 mRNA and protein levels were not measured. Interestingly, we noted that purely GFP-positive neurons at E18 generally exhibited much stronger fluorescence signal intensity than that seen in tdTomato-positive neurons (results not shown), thus suggesting that at early time points, although there are less D2-expressing neurons, those that express it do so at a higher level than those that express the D1 receptor. Our data also show that the decrease in the percentage of D1-positive neurons was accompanied by a gradual increase in D2-positive neurons and a decrease in D1/D2 fluorescent reporter protein colocalization from E18 to P0 and P14. Taken together, these results suggest the possibility that newly differentiated MSNs might express mostly the D1 receptor early on in development, until some of them start expressing gradually more of the D2 receptor and less of the D1, to eventually become purely D2 over time. An investigation of neurons prior to E18 would be useful to further evaluate this hypothesis.

What signals drive and maintain the differentiation of D1- and D2-expressing MSNs is presently undetermined. Many non-mutually exclusive possibilities should be considered, including the existence of an intrinsic genetic program, the production of local signals from cell populations inherent to the striatum or afferent innervation, or signals deriving from the establishment of MSN efferent projections to various target regions. Given the very early stage of segregation onset observed in the present study, the implication of intrinsic or local factors appears likely. Our observation that cultured MSNs, whether in monoculture or in mixed cultures with mesencephalic and/or cortical neurons, maintain D1-D2 segregation, is compatible with the hypothesis that DA receptor expression pattern is intrinsic to MSNs or at least becomes hardwired soon after its onset. Our findings are compatible with recent similar but qualitative observations made using the same double transgenic model (Swift et

al., 2011). However, our data are in apparent contradiction with previous studies showing colocalization of D1 and D2 receptors in 22 to 90 % of cultured striatal neurons from either embryonic or postnatal rats (Hasbi et al., 2009; Wong et al., 1999; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2004; Shetreat et al., 1996). Two main explanations can be considered to explain such differences. One possibility is that this contradiction results from a species difference: perhaps rat striatal neurons show less receptor segregation than mouse striatal neurons. Arguing against this possibility, previous *in situ* hybridization studies performed in rat provided strong evidence for extensive segregation of D1 and D2 receptor mRNA in separate cell populations (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1991; Le Moine and Bloch, 1995). Therefore, it is to be expected that neuronal cultures derived from rat striatum should also show extensive segregation. A second possibility, perhaps more likely, is that the higher rate of coexpression found in the studies performed in rat cultures may have resulted from a high rate of false positive signal resulting from the limited specificity of the classical immunocytochemistry or fluorophore-labeled receptor antagonist techniques used. In the present study, the distinction between cell bodies positive or negative for the reporter proteins was relatively straightforward, and was facilitated by the accumulation of the fluorescent reporter proteins inside neuronal cell bodies.

The comparison between D1 and D2 reporter expression across four different types of postnatal cultures revealed a tendency for reduced coexpression in cultures containing mesencephalic dopamine neurons. Although this did not reach statistical significance, this observation suggests a possible influence of DAergic neurons on the process of segregation. Further experiments will be required to further evaluate this hypothesis, but since DAergic innervation and detectable DA release in the rodent striatum occur during the prenatal period (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000; Ferrari et al., 2012), one can consider the possibility that DA or at least the presence of DAergic terminals might play a role in the development of striatal D1-D2 segregation. However, our results make it clear that the presence of DAergic or cortical neurons is not required for the maintenance of DA receptor expression pattern after birth.

REFERENCES

- Ade, K.K., Wan, Y., Chen, M., Gloss, B., Calakos, N., 2011. An Improved BAC Transgenic Fluorescent Reporter Line for Sensitive and Specific Identification of Striatonigral Medium Spiny Neurons. *Front Syst Neurosci* 5, 32.
- Aizman, O., Brismar, H., Uhlén, P., Zettergren, E., Levey, A.I., Forssberg, H., Greengard, P., Aperia, A., 2000. Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat. Neurosci.* 3, 226–230.
- Araki, K.Y., Sims, J.R., Bhide, P.G., 2007. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res.* 1156, 31–45.
- Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., Valjent, E., 2010. What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front Neuroanat* 4.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196 (Pt 4), 527–542.
- Chan, C.S., Peterson, J.D., Gertler, T.S., Glajch, K.E., Quintana, R.E., Cui, Q., Sebel, L.E., Plotkin, J.L., Shen, W., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Surmeier, D.J., 2012. Strain-Specific Regulation of Striatal Phenotype in *Drd2-eGFP* BAC Transgenic Mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 9124–9132.
- Cisek, P., Kalaska, J.F., 2010. Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 269–298.
- Fasano, C., Thibault, D., Trudeau, L.-E., 2008. Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3, Unit 3.21.
- Ferrari, D.C., Mdzomba, B.J., Dehorter, N., Lopez, C., Michel, F.J., Libersat, F., Hammond, C., 2012. Midbrain dopaminergic neurons generate calcium and sodium currents and release dopamine in the striatum of pups. *Front Cell Neurosci* 6, 7.

- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr, Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432.
- Gerfen, C.R., Surmeier, D.J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441–466.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., Heintz, N., 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425, 917–925.
- Hasbi, A., Fan, T., Alijaniam, M., Nguyen, T., Perreault, M.L., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2009. Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21377–21382.
- Hasbi, A., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2010. Heteromerization of dopamine D2 receptors with dopamine D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Curr Opin Pharmacol* 10, 93–99.
- Kawaguchi, Y., 1997. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci. Res.* 27, 1–8.
- Larson, E.R., Ariano, M.A., 1994. Dopamine receptor binding on identified striatonigral neurons. *Neurosci. Lett.* 172, 101–106.
- 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.
- Le Moine, C., Normand, E., Bloch, B., 1991. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4205–4209.

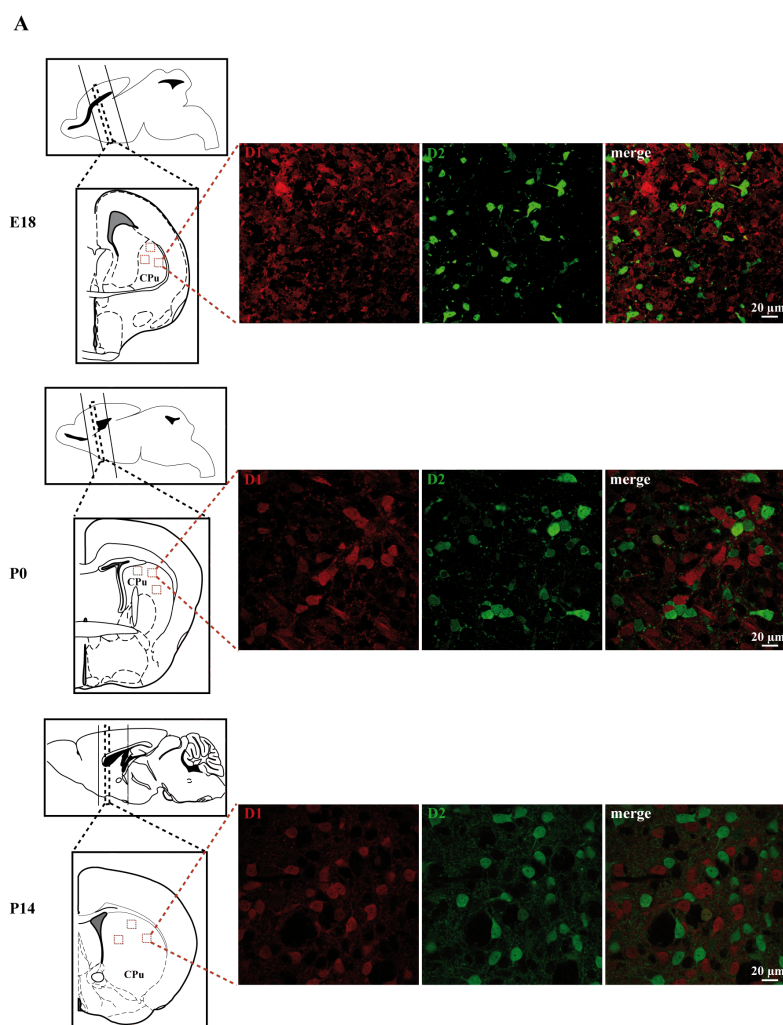
- Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lança, A.J., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2004. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* 279, 35671–35678.
- Lester, J., Fink, S., Aronin, N., DiFiglia, M., 1993. Colocalization of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in striatal neurons. *Brain Research* 621, 106–110.
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Healy, D.J., Kuehn, R., Zhou, Q.Y., Bunzow, J.R., Akil, H., Civelli, O., Watson, S.J., Jr, 1991. Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5, 231–242.
- Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Dal Bo, G., Bourdeau, M.L., Danik, M., Williams, S., Lacaille, J.-C., Trudeau, L.-E., 2008. Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J. Neurosci.* 28, 6309–6318.
- Mink, J.W., 1996. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.* 50, 381–425.
- Nelson, A.B., Hang, G.B., Grueter, B.A., Pascoli, V., Luscher, C., Malenka, R.C., Kreitzer, A.C., 2012. A Comparison of Striatum-Dependent Behaviors in Wild-Type and Hemizygous *Drd1a* and *Drd2* BAC Transgenic Mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 9119–9123.
- Nicola, S.M., Surmeier, J., Malenka, R.C., 2000. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 185–215.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Gulf Professional Publishing.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *Atlas of the Developing Mouse Brain: At E17.5, PO, and*. Academic Press.
- Perrone-Capano, C., Di Porzio, U., 2000. Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 679–687.

- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2007. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 654–659.
- Redgrave, P., Prescott, T.J., Gurney, K., 1999. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89, 1009–1023.
- Rice, M.E., Patel, J.C., Cragg, S.J., 2011. Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198, 112–137.
- 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.
- 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.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P., 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86, 353–387.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. *J. Comp. Neurol.* 199, 255–276.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3–18.
- Surmeier, D.J., Song, W.J., Yan, Z., 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 6579–6591.
- Swift, J.L., Godin, A.G., Doré, K., Freland, L., Bouchard, N., Nimmo, C., Sergeev, M., De Koninck, Y., Wiseman, P.W., Beaulieu, J.-M., 2011. Quantification of receptor tyrosine kinase transactivation through direct dimerization and surface density measurements in single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7016–7021.

- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., Girault, J.-A., 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538–547.
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B., Groenewegen, H.J., 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25, 857–887.
- 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.
- Wong, A.C., Shetreat, M.E., Clarke, J.O., Rayport, S., 1999. D1- and D2-like dopamine receptors are co-localized on the presynaptic varicosities of striatal and nucleus accumbens neurons in vitro. *Neuroscience* 89, 221–233.
- Wu, Y., Richard, S., Parent, A., 2000. The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci. Res.* 38, 49–62.

FIGURES

Figure 1



B Distribution of labeled neurons in P14 slices

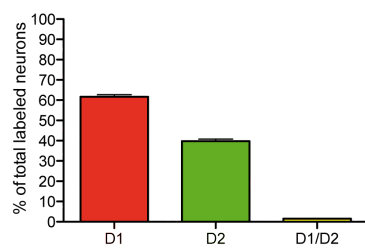


Figure 1: Distribution of D1 and D2 reporter proteins in mouse striatal sections reveals extensive segregation. Characterization of tdTomato (D1, red) and GFP (D2, green) immunolabeling in striatal sections prepared from E18, P0 and P14 double-transgenic mice. **A:** The brain atlas images (Paxinos and Franklin, 2004; Paxinos and Watson, 2007) on the left identify the approximate areas where acute slices were obtained. The confocal images shown on the right were obtained using a 60x objective. Although the tdTomato (D1, red) signal was relatively diffuse in E18 and P0 sections, at P14, immunopositive cell bodies could be easily identified. Double-labelled neurons were not frequently detected, as shown in the merge images on the right. **B:** Summary diagram presenting the results of quantifications performed in striatal sections from P14 animals showing the proportion of total labeled MSNs that express tdTomato (D1), GFP (D2) or both proteins (D1/D2).

Figure 2

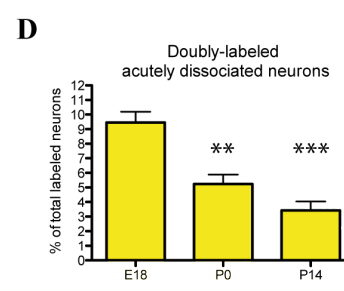
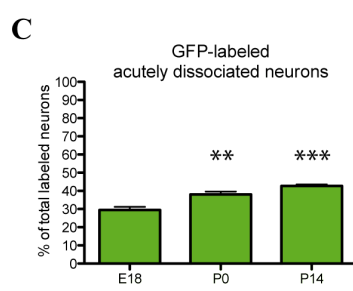
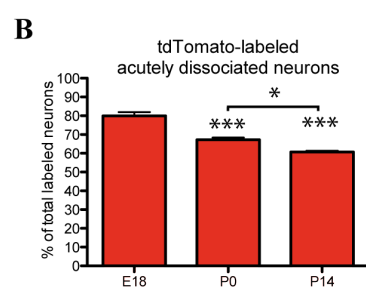
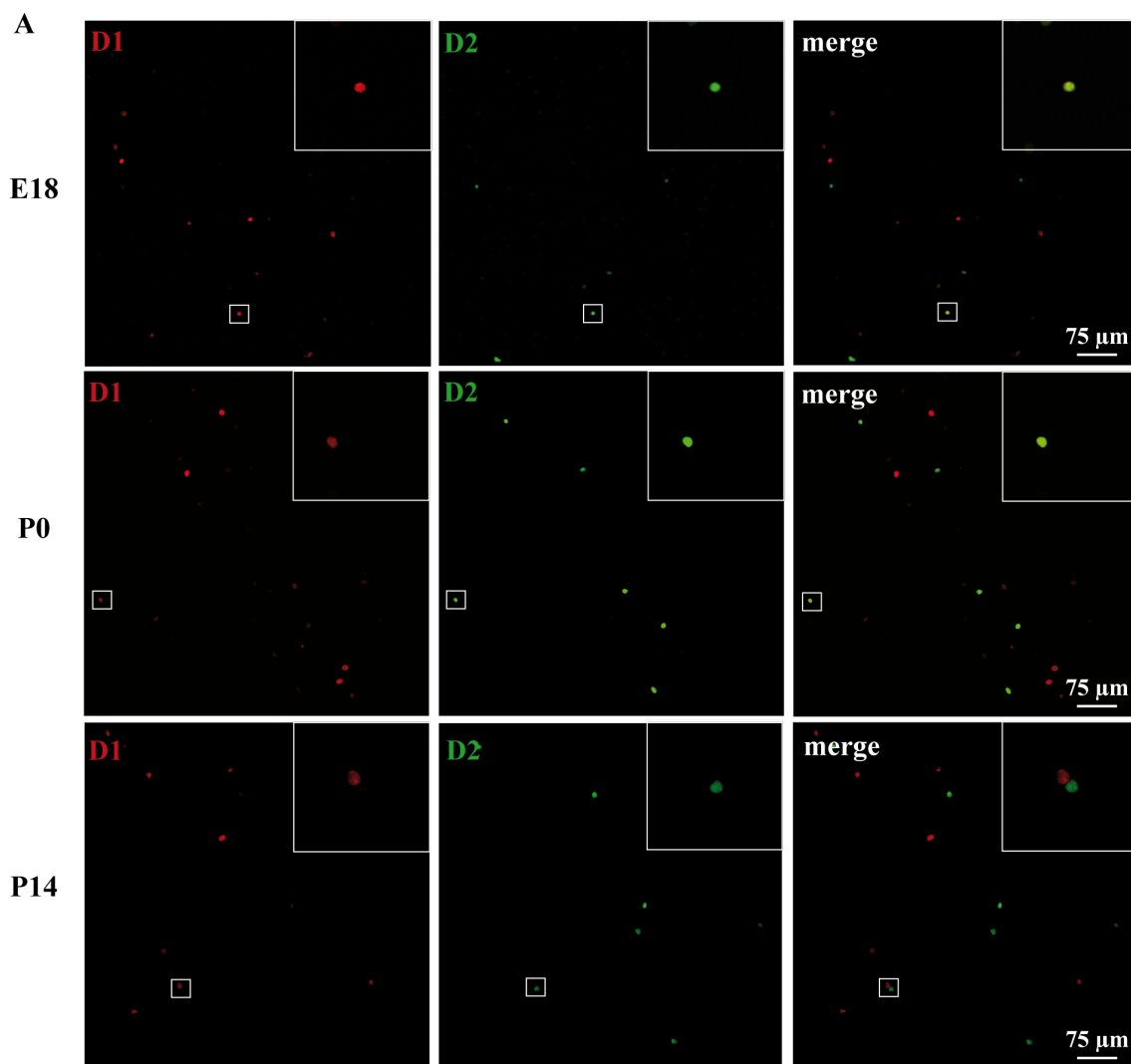


Figure 2: **Distribution of D1 and D2 reporter proteins in acutely dissociated mouse striatal sections reveals an age-dependent increase in segregation.** Characterization of tdTomato (D1, red) and GFP (D2, green) immunolabeling in neurons acutely dissociated from E18, P0 and P14 striatum from double-transgenic mice. **A:** Examples of acutely dissociated striatal neurons immunolabeled for tdTomato (D1, red) and GFP (D2, green). **B-D:** Summary diagrams presenting the results of quantifications performed from E18, P0 and P14 mice. **B:** tdTomato, **C:** GFP, **D:** both proteins.

Figure 3

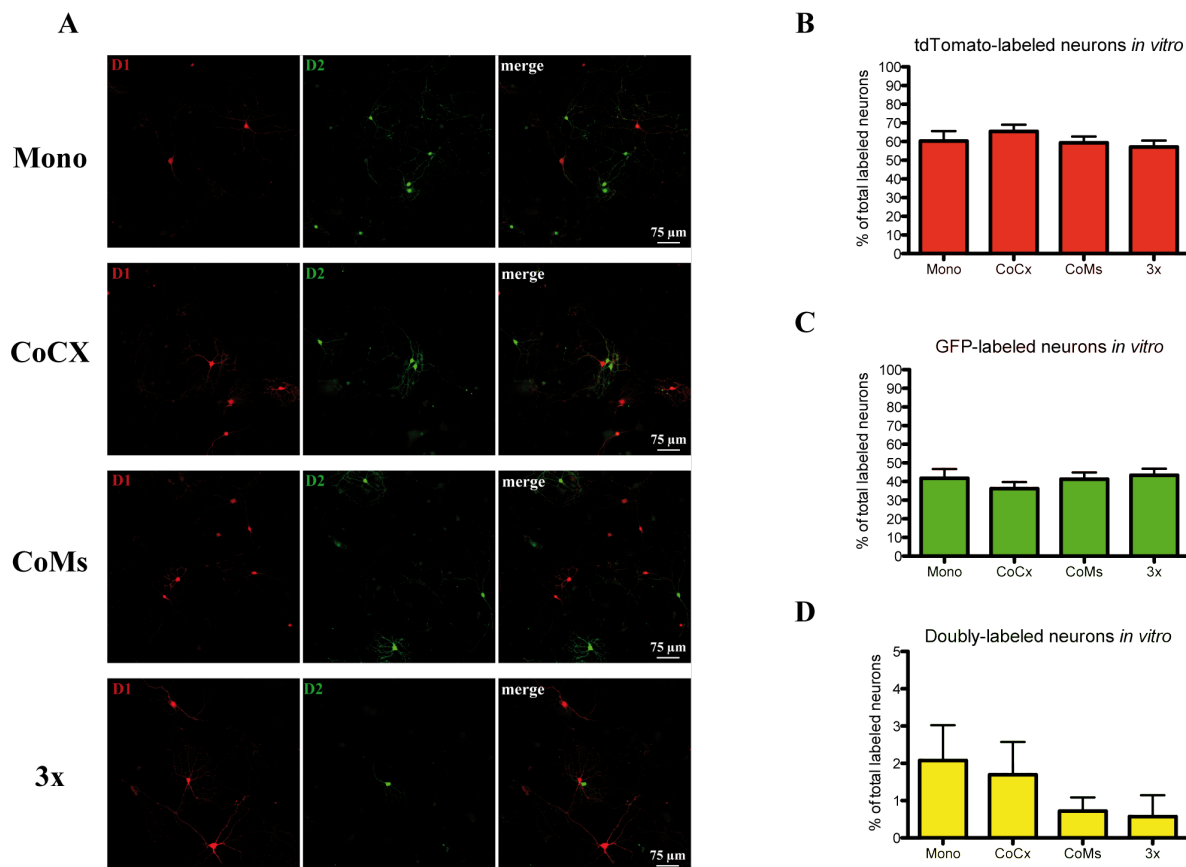


Figure 3: **Segregation of D1 and D2 reporter proteins is maintained in postnatal striatal neurons in primary culture.** Four types of culture conditions were compared: striatal neurons alone (**Mono**), striatal neurons cultured with cortical neurons (**CoCx**), striatal neurons cultured with mesencephalic neurons (**CoMs**), or mixed cultures containing striatal neurons, mesencephalic neurons and cortical neurons (**3x**). **A**: Examples of MSNs in different culture conditions labeled for tdTomato (D1, red) and GFP (D2, green) at 14 days *in vitro*. **B-D**: Summary diagrams showing the results of quantifications. **B**: tdTomato, **C**: GFP, **D**: both proteins.

Article 3

Glutamate from cortical and dopaminergic neurons promotes dendritic spine formation on medium spiny neurons expressing the D2 dopamine receptor

Dominic Thibault, Nicolas Giguère, Fabien Loustalot, Marie-Josée Bourque and Louis-Éric Trudeau.

Department of Pharmacology, Neuroscience Research Group, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Address correspondence to:

Louis-Eric Trudeau, Ph.D.

Department of pharmacology

Faculty of Medicine

Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec

H3C 3J7

Phone : 514-343-5692

ABSTRACT

The striatum is predominantly composed of medium spiny neurons (MSNs). These express a very high density of dendritic spines, which are the postsynaptic component of excitatory synapses formed with glutamatergic axon terminals originating from the cortex and thalamus. The striatum is also massively innervated by dopaminergic terminals arising from the ventral mesencephalon. Dopamine (DA) exerts a potent regulatory influence on mature striatal excitatory synapses, particularly on MSNs expressing the D2 DA receptor (D2-MSNs). Despite evidence showing embryonic innervation of the striatum by DAergic fibers and functional DA release at birth, the role of DA in the establishment of striatal circuitry has not been determined. In addition, the implications of the recently discovered glutamate co-phenotype of DA neurons in this context have not been examined. In the present study, we used *in vitro* primary co-culture models and show that the presence of mesencephalic DA neurons produces a large increase in the number of VGLUT2-positive terminals and functional glutamate synapses and a small increase in spine number in D2-MSNs. Furthermore, in the presence of mesencephalic neurons, the number of VGLUT1-positive terminals established on D2-MSNs by cortical neurons is reduced, due to an apparent competitive equilibrium in the total density of glutamatergic terminals on D2-MSN dendritic segments. Conditional knockout of VGLUT2 in DA neurons caused a major decrease in VGLUT2-positive terminals and decreased spine formation in D2-MSNs in mesencephalic co-cultures. While glutamate receptor antagonism greatly decreased spinogenesis in D2-MSNs cultured with both cortical and mesencephalic neurons, DA receptor blockade did not. Together, these results suggest that while DA itself has a dispensable role in synaptogenesis in MSNs, one role of glutamate-corelease by DA neurons may be to provide an early excitatory input to growing MSNs and facilitate early spinogenesis and synapse formation.

INTRODUCTION

The basal ganglia contain brain circuits involved in the selection, initiation and control of voluntary movements (Mink, 1996; Redgrave et al., 1999; Cisek and Kalaska, 2010). The input nucleus and main structure of this neuronal network is the striatum, composed by a very large majority of GABAergic projection neurons known as MSNs. These MSNs owe their name to the high density of spines that are found on their dendrites; these spines represent the postsynaptic component of excitatory synapses that form with glutamatergic axon terminals that arise in large part from the cortex and thalamus (Bolam et al., 2000). MSNs send their axons along two parallel and mostly exclusive efferent pathways: the striatonigral (direct) and striatopallidal (indirect) pathways (Smith et al., 1998; Wu et al., 2000; Bertran-Gonzalez et al., 2010). The striatum is also the principal target of substantia nigra pars compacta DA neurons. The abundant DA released by their terminals is a crucial regulator of striatal activity, particularly at the level of the excitatory synapses that form on MSNs (Shen et al., 2008; Gerfen and Surmeier, 2011; Surmeier et al., 2011). Importantly, the expression pattern of DA receptors in the striatum is essentially segregated, such that striatonigral MSNs express high amounts of D1 DA receptor and very little amounts D2, while striatopallidal MSNs express the opposite ratio (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1991; Meador-Woodruff et al., 1991; Weiner et al., 1991; Lester et al., 1993; Larson and Ariano, 1994; Surmeier et al., 1996; Shuen et al., 2008; Valjent et al., 2009; Ade et al., 2011). This segregation allows striatonigral and striatopallidal MSNs to be regulated by DA in very different manners in either normal or pathological conditions. A remarkable example of such plasticity was described in a mouse model of Parkinson's disease, where the depletion of DA induces a dramatic loss of dendritic spines and excitatory synapses on striatopallidal neurons, leaving striatonigral neurons practically intact (Day et al., 2006). Interestingly, this structural and functional plasticity in the striatum seems to be indirectly dependent on DA, since lesions of corticostriatal afferences prior to DA depletion prevents the spine loss in MSNs (Neely et al., 2007; Garcia et al., 2010). Moreover, the chronic depolarization of cortical and striatal neurons in culture induces a decrease in spine density

that mimics the consequence of DA depletion (Tian et al., 2010). Together, these studies suggest that DA is involved in a so-called homeostatic regulation of the corticostriatal network, where an increase in glutamatergic transmission caused by DA depletion would induce an equivalent down regulation of functional synaptic contacts.

DA afferents innervate the striatum at a very early stage of development (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000), and there is evidence that the DA release machinery is already functional at birth (Ferrari et al., 2012), prior to the bulk of synapse appearance that occurs during the second and third postnatal weeks (Sharpe and Tepper, 1998; Tepper et al., 1998). Interestingly, the mechanisms driving synaptogenesis in immature MSNs seem to be very different from the homeostatic regulation of excitatory synapses described in the mature striatum, since it was reported using *in vitro* models that the activity of cortical neurons has a positive influence on dendritic spines and synapse formation (Segal et al., 2003; Penrod et al., 2011), an observation confirmed recently *in vivo* (Kozorovitskiy et al., 2012). However, little is currently known about the role of DA neurons in the establishment of early striatal circuitry. It has been suggested that DA receptor activation can trigger the formation of filopodia and immature spines on developing MSN dendrites (Fasano et al., 2008). Nevertheless, it is unclear what role DA plays in the establishment of more mature synapses. In addition, the role of the glutamate co-phenotype of DA neurons in striatal spine formation has not been yet considered in this particular context; considering the early expression of the type 2 vesicular glutamate transporter (VGLUT2) in ventral tegmental area DA neurons (Dal Bo et al., 2004; Mendez et al., 2008; El Mestikawy et al., 2011), a role in initial synapse and spine formation in the striatum can be hypothesized.

In the present study, our main objective was to test the hypothesis that DA neurons contribute to the establishment of spines and excitatory synapses in the striatum through both glutamate and DA release. For this purpose, we took advantage of *in vitro* primary co-culture models and show that the presence of mesencephalic DA neurons produces a large

increase in the number of VGLUT2-positive terminals, functional glutamate synapses and a small increase in spine number in D2-MSNs. Furthermore, in the presence of both mesencephalic and cortical neurons, the number of VGLUT1-positive terminals established on D2-MSNs by cortical neurons is reduced, due to an apparent competitive equilibrium in the total density of glutamatergic terminals on D2-MSN dendritic segments. The conditional knockout of VGLUT2 in DA neurons caused a major loss of VGLUT2-positive terminals and decreased spine formation in D2-MSNs in mesencephalic co-cultures. Finally, while glutamate receptor antagonism greatly decreased synaptogenesis on D2-MSNs cultured with both cortical and mesencephalic neurons, DA receptor blockade did not. Together, these results suggest that while DA itself has a dispensable role in synaptogenesis in MSNs, one role of glutamate-corelease by DA neurons may be to provide an early excitatory input to growing MSNs and facilitate early spinogenesis and synapse formation.

MATERIALS AND METHODS

Animals - BAC transgenic *drd2*-GFP heterozygous mice (Gong et al., 2003), backcrossed on a C57BL/6 background, were crossed with C57BL/6 mice to yield an expected ratio of 50 % heterozygous *drd2*-GFP-positive pups and 50 % *drd2*-GFP-negative pups per litter. For experiments with the conditional knock-out (cKO) of VGLUT2 in DA neurons, *Vglut2^{fl/+;DAT-cre}* mice were crossed with *Vglut2^{fl/fl}* mice to produce *Vglut2^{fl/fl;DAT-cre}* cKO and *Vglut2^{fl/+;DAT-cre}* control mice (Bérubé-Carrière et al., 2012).

Cell culture - Cultures were prepared following slight variations of a previously described protocol (Fasano et al., 2008). Briefly, dissociated neurons from the dorsal striatum (*drd2*-GFP-positive) and/or ventral mesencephalon (*drd2*-GFP-negative, *Vglut2^{fl/fl;DAT-cre}* cKO or *Vglut2^{fl/+;DAT-cre}* control) and/or cortex (*drd2*-GFP-negative) of P0-P2 animals were seeded on a monolayer of cortical astrocytes (*drd2*-GFP-negative) grown on poly-L-lysine-coated glass coverslips. For the four different culture conditions, the total seeded neuron density was always 240 000 cells/mL divided as follows (in cells/mL): 240 000 striatal cells for monocultures (Mono); 140 000 striatal cells plus 100 000 mesencephalic cells for co-mesencephalic cultures (CoMs); 140 000 striatal cells plus 100 000 cortical cells for co-cortical cultures (CoCx); 40 000 striatal cells plus 100 000 mesencephalic cells and 100 000 cortical cells for triple cultures (3x). All cultures were incubated at 37 °C in 5 % CO₂ and maintained in Neurobasal medium enriched with 1 % penicillin/streptomycin, 1 % Glutamax, 2 % B-27 supplement and 5 % fetal bovine serum Invitrogen). For chronic drug treatment conditions, the following drugs were added to the culture medium on days 1, 5, 9 and 13 in different combinations of appropriate vehicles (water, ethanol or DMSO): SCH-23390 (SCH, D1-like receptor antagonist, 2 μM, Sigma-Aldrich), sulpiride (Sulp, D2-like receptor antagonist, 2 μM, Sigma-Aldrich), CNQX (AMPA receptor antagonist, 10 μM, Sigma-Aldrich) and CPP (NMDA receptor antagonist, 20 μM, Ascent Scientific). After 14 days in culture, cells were either used for electrophysiology or fixed in 4 % PFA for 30 min for immunostaining.

Immunostaining and image analysis - An anti-GFP primary antibody from rabbit (1:5000, Abcam), detected with an Alexa 488 goat anti-rabbit secondary antibody (1:500, Molecular Probes), was used to visualize dendrites and spines from D2-MSNs. The type 1 vesicular glutamate transporter (VGLUT1) and VGLUT2 were labeled with guinea pig (1:5000, Millipore) and mouse (1:4000, Millipore) primary antibodies respectively, coupled with Alexa 647 goat anti-guinea pig (1:500, Molecular Probes) and Alexa 546 goat anti-mouse (1:500, Molecular Probes). Confocal z-stack images were acquired on a laser scanning confocal microscope (FV1000 MPE, Olympus) equipped with multi-argon and helium/neon lasers and a 60x oil-immersion objective. Spine density analysis was performed using NeuronStudio software (Mount Sinai School of Medicine, (Rodriguez et al., 2008). Dendrites were traced automatically but spines were identified manually: 3-6 dendrites per neuron (secondary dendrites, or segments at least 50 μm from the soma) of at least 30 μm in length were first selected and straightened using ImageJ software (NIH) before analysis with NeuronStudio. VGLUT1 and VGLUT2 excitatory terminal analysis was performed with the ImageJ software by first applying a threshold value to obtain binary images, then counting continuous signal puncta of diameters between 0.5 and 5 μm with the *Particle Analysis* function.

Electrophysiology - Neuron culture coverslips were inserted in a recording chamber affixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 fluorescent microscope and gravitationally perfused with a physiological saline solution composed of (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 6 sucrose, 10 glucose. Whole-cell patch-clamp recordings were performed on GFP expressing cells using borosilicate pipettes (5.5-6.5 M Ω) filled with an intra-pipette solution composed of (in mM): 120 CsMeSO₃, 1.1 EGTA, 4 ATP (Mg salt), 0.3 GTP (tris salt), 10 HEPES, 5 NaCl, 10 TEA-Cl. The signal was amplified and controlled using a PC-505 patch-clamp amplifier (Warner), filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz and analyzed with pClamp10 software (Molecular Devices). Series resistance was compensated to approximately 70 % and membrane potential was always

adjusted to account for the calculated liquid junction potential (≈ 10 mV). Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded with the membrane voltage-clamped at -60 mV under perfusion of the physiological saline solution containing the sodium channel blocker tetrodotoxin (0.5 μ M, Alomone Labs) and the GABA_A receptor antagonist SR-95531 (2 μ M, Sigma-Aldrich). Analysis of mEPSCs was performed with MiniAnalysis software (Synaptic System).

Statistical analysis - Data are always presented as mean \pm SEM. The level of statistical significance was established at $p < 0.05$ in one-way ANOVAs and two-tailed t-tests performed with the Prism 5 software (GraphPad Software). Statistical outliers were excluded when they differed by more than two standard deviations above or below the mean.

RESULTS

Competitive equilibrium in the establishment of glutamate synapses onto cultured striatal neurons - We first characterized a culture system contain striatal, mesencephalic and cortical neurons in order to test the hypothesis that DA neurons contribute to the establishment of spines and excitatory synapses on D2-MSNs. We compared striatal monocultures (Mono) to co-cultures of striatal neurons together with mesencephalic and/or cortical neurons (CoMs, CoCx and 3x, see Materials and Methods, Fig. 1A), always at 14 days *in vitro*. In terms of spine density, all co-cultures yielded D2-MSNs with more spines per 10 μm of dendritic length than in monocultures (2.09 ± 0.09 for Mono, 2.66 ± 0.12 for CoMs, 3.77 ± 0.11 for CoCx and 3.00 ± 0.17 for 3x; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; $n = 76$ neurons for Mono, 78 for CoMs, 74 for CoCx and 78 for 3x; Fig. 1B). Interestingly, the CoCx condition clearly yielded the greatest spine density of all and was even significantly higher than the 3x condition, even though they both contain the same quantity of cortical neurons (Fig. 1B). For the mean spine head diameter, which is a common index of spine maturity (Yoshihara et al., 2009), all co-cultures were again significantly different from the Mono culture condition; in addition, the spine heads in the CoCx were significantly bigger than in the CoMs condition ($0.52 \pm 0.01 \mu\text{m}$ for Mono, 0.57 ± 0.01 for CoMs, 0.62 ± 0.01 for CoCx and 0.59 ± 0.01 for 3x; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; Fig. 1C).

We next evaluated the presynaptic component of excitatory synapses by quantifying the density of VGLUT1-positive axon terminals, arising from cortical glutamate neurons, and VGLUT2-positive terminals, arising from sub-cortical glutamatergic and DAergic neurons (El Mestikawy et al., 2011). We expected that in CoMs cultures, all excitatory terminals would be VGLUT2-positive, while in CoCx cultures, all excitatory terminals would be VGLUT1-positive. We also hypothesized that in 3x cultures, mesencephalic and cortical neurons should both innervate striatal neurons, leading to a higher total density of excitatory terminals. As expected, only VGLUT1-positive terminals and little if any VGLUT2-positive terminals were detected in CoCx cultures (Fig. 1D-E). Similarly, in CoMs cultures, only VGLUT2-positive terminals and little if any VGLUT1-positive

terminals were detected (Fig. 1D-E). Surprisingly, although in 3x cultures both VGLUT1 and VGLUT2-positive terminals were detected, the density of VGLUT1-positive terminals was lower than in the CoCx condition (1.69 ± 0.60 terminals per field for Mono, 1.12 ± 0.17 for CoMs, 79.67 ± 9.53 for CoCx and 45.70 ± 7.70 for 3x; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; $n = 74$ fields for Mono, 75 for CoMs, 92 for CoCx and 66 for 3x; Fig. 1E). Likewise, in 3x cultures, the density of VGLUT2-positive terminals was lower than in CoMs cultures (0.08 ± 0.04 terminals per field for Mono, 79.32 ± 6.25 for CoMs, 1.21 ± 0.25 for CoCx and 33.38 ± 4.32 for 3x; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; Fig. 1F). Moreover, the summation of all VGLUT1 and VGLUT2-positive terminals per field revealed that in each co-culture condition, a strikingly identical maximal number of glutamatergic terminals were established (1.77 ± 0.60 for Mono, 80.44 ± 6.20 for CoMs, 80.88 ± 9.61 for CoCx, 79.08 ± 9.39 for 3x; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; Fig. 1G). This result is suggestive of a competitive equilibrium between VGLUT1- and VGLUT2-positive terminals in the establishment of glutamatergic synapses onto D2-MSNs.

Finally, to provide a functional readout of synapse number and activity, we recorded from D2-MSNs and analyzed the frequency of spontaneous miniature glutamate-mediated excitatory synaptic currents (mEPSCs) (Fig. 1H). The frequency of mEPSCs in D2-MSNs was significantly higher in the CoMs and 3x conditions compared to the Mono condition, while the CoCx was not significantly different compared to the CoMs, 3x or Mono conditions (0.30 ± 0.14 Hz for Mono, 1.94 ± 0.54 for CoMs, 1.54 ± 0.34 for CoCx and 1.97 ± 0.40 for 3x; $p < 0.01$ in one-way ANOVA; Fig. 1H-I). These results reveal a relative mismatch between the density of spines, highest in the CoCx condition, and the number of axon terminals and mEPSCs, equivalent between the three co-culture conditions.

Glutamatergic terminals established by DA neurons contribute importantly to excitatory synapse formation onto D2-MSNs - Although mesencephalic DA neurons, in particular those of the ventral tegmental area, express VGLUT2 (Dal Bo et al., 2004; Mendez et al., 2008) and may contribute to the glutamatergic innervation of MSNs (Stuber et al., 2010; Tecuapetla et al., 2010), the mesencephalon also contains other non-DAergic glutamate

neurons (Mendez et al., 2008; Dobi et al., 2010; Yamaguchi et al., 2011). In order to test the hypothesis that, in the context of our CoMs condition, DAergic neurons represent an important source of glutamatergic terminals contacting D2-MSNs, we prepared similar cultures using cKO mice in which the *Vglut2* gene was selectively interrupted in DA neurons. We thus compared CoMs cultures containing striatal neurons from *drd2*-GFP-positive animals and mesencephalic neurons from either *Vglut2^{fl/+;DAT-cre}* (WT) or *Vglut2^{fl;DAT-cre}* cKO (cKO) animals. In support of an important contribution of DA neurons to excitatory synapse formation onto D2-MSNs, a striking reduction of the density of VGLUT2-positive terminals was detected in the cKO cultures (65.08 ± 8.15 terminals per field for WT and 7.00 ± 1.31 for KO; $p < 0.001$ in two-tailed t-test; $n = 37$ fields for WT and 33 for cKO; Fig. 2A-B). This was accompanied by a decrease in the density of spines in D2-MSNs of CoMs KO cultures in comparison to WT (2.98 ± 0.18 spines per $10 \mu\text{m}$ of dendrite for WT and 2.46 ± 0.16 for KO; $p < 0.05$ in two-tailed t-test; $n = 36$ neurons for WT and 35 for cKO, Fig. 2C-D), without any detectable change in spine head diameter ($0.46 \pm 0.01 \mu\text{m}$ for WT and 0.45 ± 0.01 for cKO; $p > 0.05$ in two-tailed t-test; Figure 2E). These results suggest that glutamatergic synapses established by DA neurons onto D2-MSNs have the potential to contribute to spine and synapse formation during the development of striatal synaptic circuits.

DA receptor activity is dispensable for excitatory synapse formation in D2-MSNs - In addition to their ability to increase excitatory synapse number by establishing VGLUT2-positive axon terminals, DA neurons could in principle enhance synaptogenesis through stimulation of DA receptors located on D2-MSNs. To test this hypothesis, we exposed 3x cultures chronically to the D2 receptor antagonist sulpiride (Sulp). Cultures were also exposed to the D1 receptor antagonist SCH23390 (SCH), since some D2-MSNs can express the D5 receptor (Surmeier et al., 1996). Our results show that DA receptor blockade failed to reduce spine density in D2-MSNs (4.15 ± 0.17 spines per $10 \mu\text{m}$ of dendrite for CTRL, 4.77 ± 0.15 for SCH, 4.49 ± 0.17 for Sulp and 4.37 ± 0.18 for SCH+Sulp; $p > 0.05$ in one-way ANOVA; $n = 76$ neurons for CTRL, 78 for SCH, 76 for

Sulp and 77 for SCH+Sulp; Fig. 3A-B). Spine head diameter was unchanged by Sulp or SCH in comparison to CTRL, although we found a significant difference between the Sulp and SCH conditions ($0.55 \pm 0.01 \mu\text{m}$ for CTRL, 0.55 ± 0.01 for SCH, 0.58 ± 0.01 for Sulp and 0.56 ± 0.01 for SCH+Sulp; $p < 0.01$ in one-way ANOVA; Fig. 3C).

Despite the fact that spine density was unchanged by D2 receptor blockade, Sulp-treated cultures displayed a higher number of VGLUT1-positive terminals (68.14 ± 7.53 per field for CTRL, 72.66 ± 8.65 for SCH and 153.08 ± 15.27 for Sulp and 103.84 ± 10.58 for SCH+Sulp; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; $n = 74$ fields for CTRL, 83 for SCH, 77 for Sulp and 91 for SCH+Sulp; Fig. 3D-E). A similar increase in VGLUT2-positive terminals was also induced by chronic D2 receptor blockade (25.16 ± 3.71 per field for CTRL, 30.81 ± 4.13 for SCH and 71.14 ± 6.73 for Sulp and 21.03 ± 3.07 for SCH+Sulp; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; Fig. 3F). The sum of all VGLUT1+VGLUT2-positive excitatory terminals was increased by Sulp (93.30 ± 9.23 terminals per field for CTRL, 103.47 ± 11.40 for SCH and 224.22 ± 16.42 for Sulp and 124.87 ± 12.06 for SCH+Sulp; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; Fig. 3G). Overall, our results with chronic DA receptor antagonism suggest that although these receptors are dispensable for the establishment of dendritic spines, the D2 receptor seems to regulate negatively axon terminal number.

Critical role of ionotropic glutamate receptors in striatal synapse formation - Following our finding that DA neurons enhance spine number and establish glutamatergic synapses on MSNs independently of DA receptor activity in 3x cultures, we aimed to determine the role of ionotropic glutamate receptors in inducing spine formation in this condition. Thus, we performed chronic treatments of these cultures with the AMPA receptor antagonist CNQX and/or the NMDA receptor antagonist CPP. Based on previous reports showing that the establishment of cortical synapses on striatal neurons is activity-dependent (Segal et al., 2003; Penrod et al., 2011), we hypothesized that glutamate receptor blockade would reduce spine density and synapse formation. Our data show that although CNQX or CPP alone did not alter spine density, combined blockade of AMPA and NMDA receptors significantly reduced spine density in D2-MSNs (3.95 ± 0.22 spines per $10 \mu\text{m}$ of dendrite for CTRL,

4.05 ± 0.21 for CNQX, 3.77 ± 0.16 for CPP and 2.14 ± 0.11 for CNQX+CPP; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; $n = 59$ neurons for CTRL, 58 for CNQX, 58 for CPP and 58 for CNQX+CPP, Fig. 4A-B). Spine head diameter was not significantly changed by either treatment in comparison to control even though small differences were found between CNQX and CPP or CNQX+CPP groups (0.60 ± 0.01 μm for CTRL, 0.62 ± 0.01 for CNQX, 0.58 ± 0.01 for CPP and 0.57 ± 0.01 for CNQX+CPP; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; Fig. 4C).

The combined blockade of AMPA and NMDA receptors also caused a substantial increase in the number of VGLUT1-positive terminals compared to CTRL (50.91 ± 4.68 terminals per field for CTRL, 55.46 ± 5.29 for CNQX, 67.27 ± 5.98 for CPP and 84.16 ± 8.54 for CNQX+CPP; $p < 0.01$ in one-way ANOVA; $n = 88$ fields for CTRL, 85 for CNQX, 91 for CPP and 86 for CPP+CNQX; Fig.4D-E), while all treatment groups showed significantly less VGLUT2-positive terminals compared to the CTRL condition (36.70 ± 3.81 terminals per field for CTRL, 24.55 ± 2.83 for CNQX, 18.22 ± 2.51 for CPP and 16.07 ± 2.12 for CNQX+CPP; $p < 0.001$ in one-way ANOVA; Fig. 4F). Interestingly, the increase in VGLUT1-positive terminals and the parallel decrease in VGLUT2-positive terminals amounted to a lack of significant difference in the total number of VGLUT1 or VGLUT2-positive terminals for all of the drug treatments (87.61 ± 6.61 terminals per field for CTRL, 80.01 ± 6.82 for CNQX, 85.49 ± 7.38 for CPP and 100.23 ± 9.45 for CNQX+CPP; $p > 0.05$ in one-way ANOVA, Fig. 4G). Taken together, our data suggest that ionotropic glutamate receptors play an important role in regulating spinogenesis and axon terminal development in striatal circuitry. While our results suggest that these receptors positively regulate spine density, axon terminal number appears to be under a form of homeostatic regulation that maintains a relatively stable density of excitatory terminals.

DISCUSSION

In the present study, our main objective was to determine the role of DA neurons in the formation of excitatory synapses onto D2-MSNs. Considering their dual neurotransmitter phenotype, our main hypothesis was that DA neurons could promote synaptogenesis through both DA receptor activation and by directly establishing glutamatergic synapses. Our first primary finding is that in the presence of mesencephalic neurons, dendritic spine density, axon terminal number and functional synapse formation on D2-MSNs are enhanced when compared to striatal monocultures, while cKO of VGLUT2 in DA neurons significantly reduces these effects. We also find that in the presence of mesencephalic and cortical neurons, the total number of excitatory terminals established onto D2-MSNs reaches a maximal density identical to that of mesencephalic or cortical neurons alone in a process through which VGLUT1- and VGLUT2-positive terminals seem to reach a state of equilibrium. However, contrary to our initial hypothesis, we find that D1 and D2 DA receptors are dispensable for the establishment of spines and excitatory synapses onto D2-MSNs. Finally, we find that ionotropic glutamate receptors play a critical role in the formation of spines, although blockade of these receptors does not reduce the total number of excitatory axon terminals and functional synapse formation.

DA represents a crucial modulator of glutamatergic synapses in the striatum (Shen et al., 2008; Gerfen and Surmeier, 2011; Surmeier et al., 2011) and DAergic signaling is involved in mature MSN spine maintenance (Ingham et al., 1989, 1993; Stephens et al., 2005; Zaja-Milatovic et al., 2005; Neely et al., 2007; Villalba et al., 2009; Garcia et al., 2010), particularly in D2-MSNs, as demonstrated in a mouse model of Parkinson's disease (Day et al., 2006). DAergic projections to the striatum are already present and active at birth in rodents (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000; Ferrari et al., 2012), preceding the postnatal establishment of glutamatergic excitatory connections (Sharpe and Tepper, 1998; Tepper et al., 1998). However, the role of DA neurons in the initial formation of striatal circuits has never been directly examined before. In the present study, we demonstrate that the presence of mesencephalic neurons, around 30 % of which are DA neurons (Fasano et al., 2008), stimulates the formation of spines and excitatory synapses onto D2-MSNs. After conditional deletion of the *Vglut2*

gene in DA neurons, the number of D2-MSN spines and VGLUT2-positive axon terminals are reduced, demonstrating for the first time that the glutamatergic co-phenotype of DA neurons has the potential to contribute to early excitatory synapse formation onto MSNs. This observation is compatible with the recent demonstration that in the same VGLUT2 cKO mice, the density of VGLUT2-positive axon terminals is reduced in the ventral striatum (Fortin et al., under revision). Although there is evidence for a purely glutamatergic VGLUT2-expressing population in the ventral tegmental area (Dobi et al., 2010), we show that the vast majority of VGLUT2-positive terminals are eliminated in the cKO CoMs cultures, indicating that DA neurons provide the bulk of these excitatory terminals. Interestingly, VGLUT2 expression by DAergic neurons is more abundant at early prenatal stages of development and after 6-hydroxy-DA lesions of DAergic nuclei (Dal Bo et al., 2008; Mendez et al., 2008). Furthermore, VGLUT2 cKO mice display behavioral changes and altered responses to psychostimulants, which are characteristic of abnormalities in basal ganglia function (Birgner et al., 2010; Hnasko et al., 2010). In light of these results, and since DAergic fibers innervate the striatum early in development (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000; Ferrari et al., 2012), it is conceivable that the glutamate released by mesostriatal afferents could produce a priming effect on spine and synapse formation, until cortical and thalamic glutamatergic afferents come in to generate the bulk of striatal synaptogenesis. Nevertheless, our data show clearly that cortical neurons are sufficient to stimulate spine growth from D2-MSNs. Moreover, because VGLUT2 has the potential to enhance vesicular packaging of DA through a process of vesicular synergy (Hnasko et al., 2010), it remains a possibility that the reduction in spine density in cKO CoMs cultures was due to reduced DA release. However, since we did not see any effect of DA receptor antagonism on spine density, but a major effect of glutamatergic receptor blockade, it would seem more plausible to assume that glutamate released by DA neurons is most critical in stimulating spine formation in MSNs.

We discovered that the sum of mesencephalic and cortical glutamatergic inputs in 3x cultures leads to the same maximal number of axon terminals compared to the CoMs or

CoCx conditions. Interestingly, there was a notable mismatch between axon terminal number and spine density in these different culture models: spine density was lower in 3x cultures and in CoMs than in CoCx cultures, but excitatory terminal number was the same across all co-culture conditions. Notably, mEPSC recordings were better correlated with axon terminal number than spine density. Together with the previous observation that cortical VGLUT1-positive terminals almost always form synapses on MSN dendritic spines, while thalamic VGLUT2-positive excitatory terminals establish a substantial proportion (20-30 %) of their synapses on dendritic shafts (Moss and Bolam, 2008; Smith et al., 2009), it may be hypothesized that DAergic VGLUT2-positive terminals establish many of their synapses on dendritic shafts and not on spines. This could explain why synaptic activity in the different culture conditions examined here correlated better with the total excitatory terminal number rather than with spine density. It will be necessary to perform ultrastructural analyses of these VGLUT1 and VGLUT2 synapses *in vivo* to extend the present work and assess this new hypothesis. As a technical limitation, it should be emphasized that in order to maintain a constant total cell density across all culture conditions, the amount of striatal neurons in the co-cultures used in the present study was adjusted such that the ratio of cortical or mesencephalic neurons to striatal neurons was higher in 3x cultures than in the CoCx or CoMs cultures. In theory, this should have led to an increased potential for excitatory synapse formation in the 3x cultures. The fact that total excitatory terminal number was the same in 3x cultures compared to CoCx or CoMs suggests that this was not a major problem and actually argues for a possible ceiling effect in the total excitatory synapse load per unit of D2-MSN dendrite.

Our findings do not confirm our initial hypothesis that DA receptor activation is a factor positively contributing to spine formation and excitatory synapse formation onto D2-MSNs. Rather, D2 receptor blockade lead to an increase in the number of excitatory VGLUT1- and VGLUT2-positive terminals. This observation suggests that D2 receptors perhaps negatively regulate the development of excitatory inputs to the striatum. This possibility is in line with another study showing that chronic activation of the D2 receptor can decrease the formation of DAergic and glutamatergic synapses established by cultured

DA neurons (Fasano et al., 2010). Our results are also compatible with previous work showing that the selective elimination of DAergic neurons in models of Parkinson's disease causes an increase in striatal excitatory terminals (Ingham et al., 1993; Raju et al., 2008; Villalba and Smith, 2011) as well as the loss of MSN dendritic spines via an indirect dysregulation of glutamatergic transmission (Neely et al., 2007; Garcia et al., 2010). It has also previously been shown that pharmacological blockade or genetic deletion of the D2 receptor increase the density of DAergic terminals in the striatum (Parish et al., 2001, 2002; Tinsley et al., 2009). Surprisingly, the increase in axon terminal number induced by chronic D2 receptor blockade in the present study was not accompanied by any change in spine density. This mismatch is presently unexplained, but it is possible that D2 receptor blockade perturbs the normal equilibrium between axon terminal and spine development, leading to the accumulation of superfluous terminals that cannot establish functional contacts with spines. Additional anatomical and physiological data will be required to solve this paradox. The selective perturbation of DA receptors on pre- and postsynaptic elements would be ideal to define the specific mechanisms involved.

In the present work, we find that the combined blockade of AMPA and NMDA glutamate receptors greatly reduces spine density. This observation is compatible with previous work showing that cortical glutamate neurons and their activity play an important role in excitatory synaptogenesis in striatal cultures (Segal et al., 2003; Penrod et al., 2011) and *in vivo* (Kozorovitskiy et al., 2012). Surprisingly, we found that spine loss was not accompanied by a reduction in the number of excitatory axon terminals: VGLUT1-positive axon terminals increased in number, while VGLUT2-positive axon terminals decreased in number, resulting in a constant total number of excitatory terminals. It thus seems that AMPA and NMDA blockade induces a complex combination of pre- and postsynaptic effects, in line with previously reported evidence showing increased axonal sprouting in hippocampal neurons treated with NMDA receptor antagonists (McKinney et al., 1999). The observation of a decrease in the number of VGLUT2-positive terminals is also compatible with recent work showing that stimulation of both AMPA and NMDA receptors in DAergic neurons promotes axonal growth and branching (Schmitz et al., 2009). Again,

ultrastructural analysis would be beneficial to see if glutamatergic receptor antagonists induce a synaptic reorganization from spines to dendritic shafts, which could account for the discrepancy between spine and axon terminal number.

In summary, our data suggest that while DA itself has a dispensable role in synaptogenesis in D2-MSNs, the early establishment VGLUT2-positive axon terminals by DA neurons may facilitate early spinogenesis in this MSN population, maybe priming synapse formation for the subsequent establishment of cortical and thalamic inputs. Further work will be required to validate this model *in vivo*. Moreover, we have not examined the contribution of VGLUT3-expressing striatal cholinergic interneurons (Gras et al., 2002, 2005; Ding et al., 2010; Higley et al., 2011) as a possible source of glutamate release onto D2-MSNs. Future work will need to examine this additional source of glutamatergic terminals to obtain a more complete picture of the contribution of glutamate co-transmission to synapse formation in the striatum. Finally, considering the inability of both D1 and D2 DA receptors to influence spine and synapse formation in our model, it is possible that our results can be also extended to D1-MSNs. However, it should be considered that besides DA receptor expression, these two MSN populations show other functional differences, such as in their intrinsic excitability (Day et al., 2008), and thus, the mechanisms regulating their synaptogenesis might also differ.

REFERENCES

- Ade, K.K., Wan, Y., Chen, M., Gloss, B., Calakos, N., 2011. An Improved BAC Transgenic Fluorescent Reporter Line for Sensitive and Specific Identification of Striatonigral Medium Spiny Neurons. *Front Syst Neurosci* 5, 32.
- Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., Valjent, E., 2010. What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front Neuroanat* 4.
- 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.
- Birgner, C., Nordenankar, K., Lundblad, M., Mendez, J.A., Smith, C., le Grevès, M., Galter, D., Olson, L., Fredriksson, A., Trudeau, L.-E., Kullander, K., Wallén-Mackenzie, A., 2010. VGLUT2 in dopamine neurons is required for psychostimulant-induced behavioral activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 389–394.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196 (Pt 4), 527–542.
- Cisek, P., Kalaska, J.F., 2010. Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 269–298.
- Dal Bo, G., Bérubé-Carrière, N., Mendez, J.A., Leo, D., Riad, M., Descarries, L., Lévesque, D., Trudeau, L.-E., 2008. Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156, 59–70.
- Dal Bo, G., St-Gelais, F., Danik, M., Williams, S., Cotton, M., Trudeau, L.-E., 2004. Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J. Neurochem.* 88, 1398–1405.

- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., Mugnaini, E., Deutch, A.Y., Sesack, S.R., Arbuthnott, G.W., Surmeier, D.J., 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251–259.
- Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J.L., Tian, X., Surmeier, D.J., 2008. Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J. Neurosci.* 28, 11603–11614.
- Ding, J.B., Guzman, J.N., Peterson, J.D., Goldberg, J.A., Surmeier, D.J., 2010. Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron* 67, 294–307.
- Dobi, A., Margolis, E.B., Wang, H.-L., Harvey, B.K., Morales, M., 2010. Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 30, 218–229.
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, A., Fortin, G.M., Descarries, L., Trudeau, L.-E., 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 204–216.
- Fasano, C., Bourque, M.-J., Haber, M., Murai, K. K., Trudeau, L.-E., 2008. The presence of dopaminergic neurons increases dendritic spine formation by striatal medium spiny neurons in culture. *Neuroscience Meeting Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.
- Fasano, C., Thibault, D., Trudeau, L.-E., 2008. Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3, Unit 3.21.
- 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.

- Ferrari, D.C., Mdzomba, B.J., Dehorter, N., Lopez, C., Michel, F.J., Libersat, F., Hammond, C., 2012. Midbrain dopaminergic neurons generate calcium and sodium currents and release dopamine in the striatum of pups. *Front Cell Neurosci* 6, 7.
- Fortin, G. M., Bourque, M.-J., Mendez, J. A., Leo, D., Nordenankar, K., Birgner, C., Arvidsson, E., Rymar, V. V., Bérubé-Carrière, N., Claveau, A.-M., Descarries, L., Sadikot, A. F., Wallén-Mackenzie, A., Trudeau, L.-E. Glutamate co-release promotes growth and survival of midbrain dopamine neurons. Under revision.
- Garcia, B.G., Neely, M.D., Deutch, A.Y., 2010. Cortical regulation of striatal medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism: modulation of glutamate release reverses dopamine depletion-induced dendritic spine loss. *Cereb. Cortex* 20, 2423–2432.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr, Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432.
- Gerfen, C.R., Surmeier, D.J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441–466.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., Heintz, N., 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425, 917–925.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., El Mestikawy, S., 2002. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 5442–5451.
- Gras, C., Vinatier, J., Amilhon, B., Guerci, A., Christov, C., Ravassard, P., Giros, B., El Mestikawy, S., 2005. Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacology* 49, 901–911.
- Higley, M.J., Gittis, A.H., Oldenburg, I.A., Balthasar, N., Seal, R.P., Edwards, R.H., Lowell, B.B., Kreitzer, A.C., Sabatini, B.L., 2011. Cholinergic interneurons mediate

- fast VGlut3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS ONE* 6, e19155.
- Hnasko, T.S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G.Y., Sulzer, D., Palmiter, R.D., Rayport, S., Edwards, R.H., 2010. Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron* 65, 643–656.
- Ingham, C.A., Hood, S.H., Arbuthnott, G.W., 1989. Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.* 503, 334–338.
- Ingham, C.A., Hood, S.H., van Maldegem, B., Weenink, A., Arbuthnott, G.W., 1993. Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Exp Brain Res* 93, 17–27.
- Kozorovitskiy, Y., Saunders, A., Johnson, C.A., Lowell, B.B., Sabatini, B.L., 2012. Recurrent network activity drives striatal synaptogenesis. *Nature* 485, 646–650.
- Larson, E.R., Ariano, M.A., 1994. Dopamine receptor binding on identified striatonigral neurons. *Neurosci. Lett.* 172, 101–106.
- Le Moine, C., Normand, E., Bloch, B., 1991. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4205–4209.
- Lester, J., Fink, S., Aronin, N., DiFiglia, M., 1993. Colocalization of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in striatal neurons. *Brain Research* 621, 106–110.
- McKinney, R.A., Lüthi, A., Bandtlow, C.E., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1999. Selective glutamate receptor antagonists can induce or prevent axonal sprouting in rat hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11631–11636.
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Healy, D.J., Kuehn, R., Zhou, Q.Y., Bunzow, J.R., Akil, H., Civelli, O., Watson, S.J., Jr, 1991. Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5, 231–242.
- Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Dal Bo, G., Bourdeau, M.L., Danik, M., Williams, S., Lacaille, J.-C., Trudeau, L.-E., 2008. Developmental and target-dependent

- regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J. Neurosci.* 28, 6309–6318.
- Mink, J.W., 1996. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.* 50, 381–425.
- Moss, J., Bolam, J.P., 2008. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J. Neurosci.* 28, 11221–11230.
- Neely, M.D., Schmidt, D.E., Deutch, A.Y., 2007. Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 149, 457–464.
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 16, 787–794.
- Penrod, R.D., Kourrich, S., Kearney, E., Thomas, M.J., Lanier, L.M., 2011. An embryonic culture system for the investigation of striatal medium spiny neuron dendritic spine development and plasticity. *J. Neurosci. Methods* 200, 1–13.
- Perrone-Capano, C., Di Porzio, U., 2000. Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 679–687.
- Raju, D.V., Ahern, T.H., Shah, D.J., Wright, T.M., Standaert, D.G., Hall, R.A., Smith, Y., 2008. Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1647–1658.
- Redgrave, P., Prescott, T.J., Gurney, K., 1999. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89, 1009–1023.
- Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dickstein, D.L., Hof, P.R., Wearne, S.L., 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS ONE* 3, e1997.

- Schmitz, Y., Luccarelli, J., Kim, M., Wang, M., Sulzer, D., 2009. Glutamate controls growth rate and branching of dopaminergic axons. *J. Neurosci.* 29, 11973–11981.
- Segal, M., Greenberger, V., Korkotian, E., 2003. Formation of dendritic spines in cultured striatal neurons depends on excitatory afferent activity. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2573–2585.
- Sharpe, N.A., Tepper, J.M., 1998. Postnatal development of excitatory synaptic input to the rat neostriatum: an electron microscopic study. *Neuroscience* 84, 1163–1175.
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321, 848–851.
- 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.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P., 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86, 353–387.
- Smith, Y., Raju, D., Nanda, B., Pare, J.-F., Galvan, A., Wichmann, T., 2009. The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Res. Bull.* 78, 60–68.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. *J. Comp. Neurol.* 199, 255–276.
- Stephens, B., Mueller, A.J., Shering, A.F., Hood, S.H., Taggart, P., Arbuthnott, G.W., Bell, J.E., Kilford, L., Kingsbury, A.E., Daniel, S.E., Ingham, C.A., 2005. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132, 741–754.
- Stuber, G.D., Hnasko, T.S., Britt, J.P., Edwards, R.H., Bonci, A., 2010. Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J. Neurosci.* 30, 8229–8233.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3–18.

- Surmeier, D.J., Song, W.J., Yan, Z., 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 6579–6591.
- 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.
- Tepper, J.M., Sharpe, N.A., Koós, T.Z., Trent, F., 1998. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev. Neurosci.* 20, 125–145.
- Tian, X., Kai, L., Hockberger, P.E., Wokosin, D.L., Surmeier, D.J., 2010. MEF-2 regulates activity-dependent spine loss in striatopallidal medium spiny neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 94–108.
- Tinsley, R.B., Bye, C.R., Parish, C.L., Tziotis-Vais, A., George, S., Culvenor, J.G., Li, Q.-X., Masters, C.L., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., 2009. Dopamine D2 receptor knockout mice develop features of Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 66, 472–484.
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., Girault, J.-A., 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538–547.
- Villalba, R.M., Lee, H., Smith, Y., 2009. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurol.* 215, 220–227.
- Villalba, R.M., Smith, Y., 2011. Differential structural plasticity of corticostriatal and thalamostriatal axo-spinous synapses in MPTP-treated Parkinsonian monkeys. *J. Comp. Neurol.* 519, 989–1005.
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B., Groenewegen, H.J., 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25, 857–887.

- 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.
- Wu, Y., Richard, S., Parent, A., 2000. The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci. Res.* 38, 49–62.
- Yamaguchi, T., Wang, H.-L., Li, X., Ng, T.H., Morales, M., 2011. Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J. Neurosci.* 31, 8476–8490.
- Yoshihara, Y., De Roo, M., Muller, D., 2009. Dendritic spine formation and stabilization. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 146–153.
- Zaja-Milatovic, S., Milatovic, D., Schantz, A.M., Zhang, J., Montine, K.S., Samii, A., Deutch, A.Y., Montine, T.J., 2005. Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology* 64, 545–547.

FIGURES

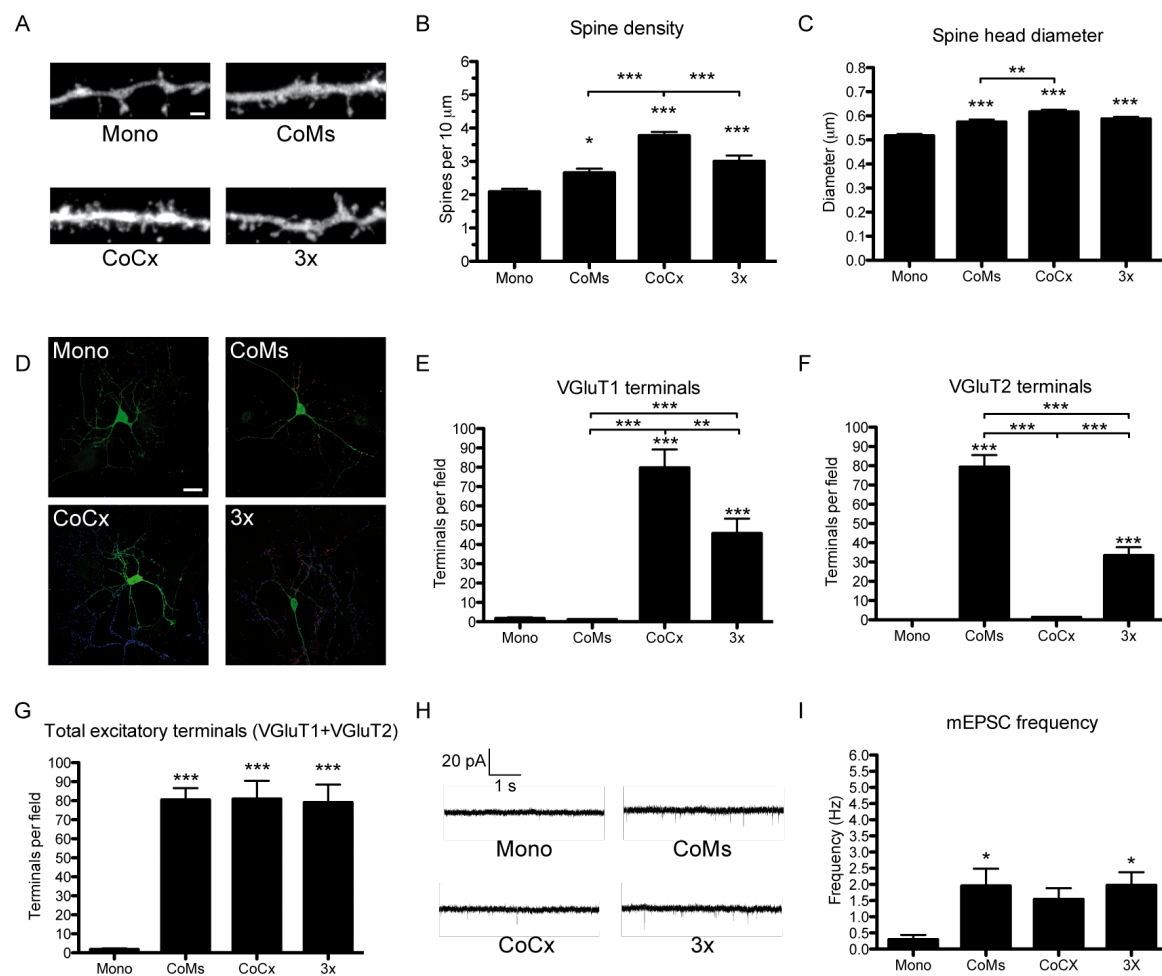


Figure 1: Analysis of four different culture conditions. **A:** Example of GFP-labeled D2-MSN dendrites in different culture conditions (scale bar = 2 μm). **B:** Spine density analysis of the different culture conditions presented as the average number of spines per 10 μm of dendritic segment. **C:** Average spine head diameter of the different culture conditions. **D:** Examples of a D2-MSN stained for GFP (green) with labeling for VGLUT1 (blue) and VGLUT2 (red) in the different culture conditions (scale bar = 25 μm). **E:** Quantification of the VGLUT1 signal presented as the number of VGLUT1-positive terminals per field in the different culture conditions. **F:** Quantification of the VGLUT2 signal presented as the

number of VGLUT2-positive terminals per field in the different culture conditions. G: Quantification of the total excitatory terminals presented as the sum of VGLUT1- and VGLUT2-positive terminals per field in the different culture conditions. H: Examples of voltage-clamp recordings of D2-MSNs in the different culture conditions. I: mEPSC frequency analysis of D2-MSNs recorded in the different culture conditions presented in Hz. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ in Bonferroni's multiple comparison test after one-way ANOVAs)

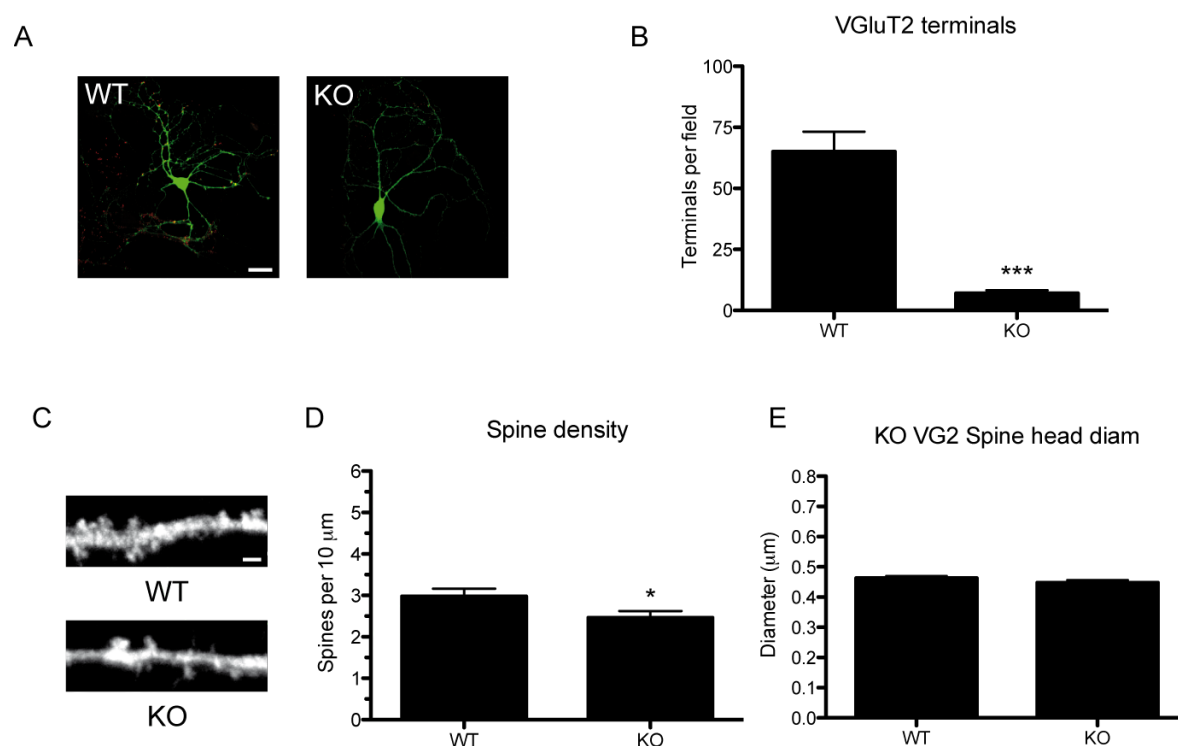


Figure 2: Analysis of CoMs cultures with a cKO of VGLUT2 in DAergic neurons. A: Examples of a D2-MSN stained for GFP (green) with labeling for VGLUT2 (red) in the different culture conditions (scale bar = 25 μm). B: Quantification of the VGLUT2 signal presented as the number of VGLUT2-positive terminals per field in the different culture conditions. C: Example of GFP-labeled D2-MSN dendrites in different culture conditions (scale bar = 2 μm). D: Spine density analysis of the different culture conditions presented as the average number of spines per 10 μm of dendritic segment. E: Average spine head diameter of the different culture conditions. F: Sholl analysis curves representing the number of dendritic branchings per intervals of distance from the cell soma of D2-MSNs in the different culture conditions. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ in two-tailed t-tests)

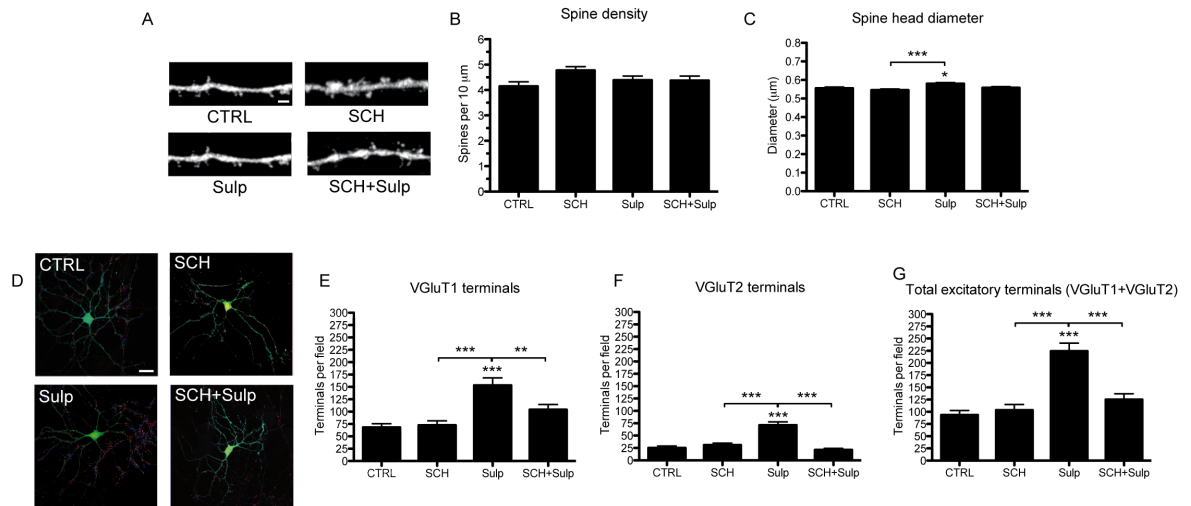


Figure 3: Analysis of 3x culture condition after chronic treatments with DAergic receptor antagonists. A: Example of GFP-labeled D2-MSN dendrites in different treatment conditions (scale bar = 2 μm). B: Spine density analysis of the different treatment conditions presented as the average number of spines per 10 μm of dendritic segment. C: Average spine head diameter of the different treatment conditions. D: Examples of a D2-MSN stained for GFP (green) with labeling for VGLUT1 (blue) and VGLUT2 (red) in the different treatment conditions (scale bar = 25 μm). E: Quantification of the VGLUT1 signal presented as the number of VGLUT1-positive terminals per field in the different treatment conditions. F: Quantification of the VGLUT2 signal presented as the number of VGLUT2-positive terminals per field in the different treatment conditions. G: Quantification of the total excitatory terminals presented as the sum of VGLUT1- and VGLUT2-positive terminals per field in the different treatment conditions. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ in Bonferroni's multiple comparison test after one-way ANOVAs)

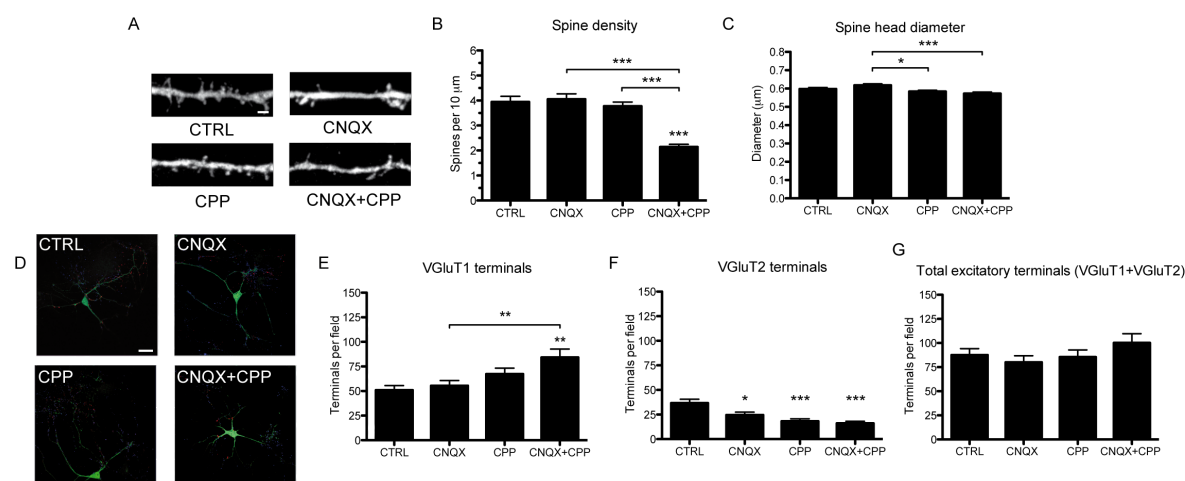


Figure 4: Analysis of 3x culture condition after chronic treatments with glutamatergic receptor antagonists. A: Example of GFP-labeled D2-MSN dendrites in different treatment conditions (scale bar = 2 μm). B: Spine density analysis of the different treatment conditions presented as the average number of spines per 10 μm of dendritic segment. C: Average spine head diameter of the different treatment conditions. D: Examples of a D2-MSN stained for GFP (green) with labeling for VGLUT1 (blue) and VGLUT2 (red) in the different treatment conditions (scale bar = 25 μm). E: Quantification of the VGLUT1 signal presented as the number of VGLUT1-positive terminals per field in the different treatment conditions. F: Quantification of the VGLUT2 signal presented as the number of VGLUT2-positive terminals per field in the different treatment conditions. G: Quantification of the total excitatory terminals presented as the sum of VGLUT1- and VGLUT2-positive terminals per field in the different treatment conditions. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ in Bonferroni's multiple comparison test after one-way ANOVAs)

Discussion

Depuis sa découverte, la DA a généré un grand intérêt dans la communauté scientifique. Les maladies entraînées par le dérèglement du système DAergique frappent l'imaginaire par l'ampleur de leurs symptômes et par la grande complexité de leurs mécanismes physiopathologiques. Malgré les pas de géants accomplis au cours des dernières quelques 55 années d'étude de la DA, il semble que les points de questionnement se succèdent toujours plus rapidement que les connaissances. Les travaux de cette thèse s'inscrivent donc dans cet effort collectif pour une meilleure compréhension du fascinant système DAergique. Nous nous sommes d'abord intéressés à la physiologie présynaptique des neurones DAergiques, en étudiant la régulation de l'autorécepteur D2 par la NT dans ce qui constitue le premier article de cette thèse. Ensuite, nous nous sommes tournés vers l'expression et les fonctions des récepteurs DAergiques au niveau postsynaptique, en étudiant l'établissement de la ségrégation D1/D2 dans le striatum puis le rôle de la DA dans la formation des synapses excitatrices sur les MSNs.

1: Interaction fonctionnelle entre le NTR1 et l'autorécepteur D2

Dans le premier article de cette thèse, nous avons décrit le mécanisme de désensibilisation hétérologue à l'origine de la capacité bien connue de la NT à inhiber la fonction de l'autorécepteur D2. D'abord, nos résultats démontrent que l'activation du NTR1 induit une internalisation du D2S et du D2L qui dépendent de la PKC dans des cellules HEK-293 transfectées avec ces récepteurs. Nous démontrons aussi que l'activation du NTR1 provoque une internalisation du D2S de façon plus importante et avec une cinétique plus rapide que celle du D2L. De plus, un inhibiteur à large spectre de la PKC bloque complètement l'internalisation des deux isoformes par la NT, sans affecter l'internalisation

homologue induite par un agoniste D2. La transfection d'un récepteur D2 muté sur ses sites de phosphorylation par la PKC dans des neurones DAergiques en culture bloque complètement les effets de la NT sur la fonction de l'autorécepteur mesurée par électrophysiologie. Finalement, nous démontrons que l'inhibition par ARN interférents de la β -arr1 ou de la Dyn2 diminue la désensibilisation fonctionnelle homologue de l'autorecepteur D2, mais que seul l'inhibition de la β -arr1 diminue significativement les effets de la NT sur celui-ci.

1.1 Désensibilisations homologue et hétérologue dans les HEK-293

Nos résultats démontrent que l'activation du NTR1 entraîne l'internalisation hétérologue des deux isoformes du récepteur D2. Nous avons limité notre étude à l'interaction D2-NTR1 parce que le NTR2, bien que présent dans les neurones DAergiques, ne semble pas être responsable des effets de la NT sur la fonction de l'autorécepteur D2 (Jomphe et al., 2006). La chélérythrine, inhibiteur à large spectre de la PKC, inhibe d'ailleurs les effets de la NT sans pour autant affecter l'internalisation homologue des récepteurs de la DA. Ce résultat est compatible avec une démonstration précédente que l'inhibition de la PKC n'altère pas la phosphorylation du récepteur D2L induite par un agoniste D2 dans des cellules HEK-293 (Namkung et Sibley, 2004). S'il semble que les internalisations homologue et hétérologue du D2 impliquent des mécanismes distincts, nos données nous portent à croire qu'il existe tout de même une certaine interaction fonctionnelle dans ces processus. En effet, il semble que la stimulation simultanée des récepteurs D2 et NTR1 n'entraîne pas une internalisation parfaitement additive du D2S ni du D2L. Ceci nous suggère que l'internalisation homologue du D2 pourrait affecter négativement sa capacité d'internalisation hétérologue induite par la NT. Puisque l'internalisation du D2 induite par son agoniste fait typiquement appel à l'intervention des kinases GRKs (Ito et al., 1999; Iwata et al., 1999; Kim et al., 2001; Namkung et al., 2009a, 2009b), il est concevable que le recrutement des GRKs par le D2 suite à son activation bloque l'accessibilité des sites de phosphorylation par la PKC. Toutefois, une autre

explication possible découle d'une étude précédente qui a montré que la stimulation du récepteur D2 peut entraîner une inhibition de la fonction du NTR1, et donc une diminution de l'activation de la PKC par la NT (Jomphe et al., 2006). Ces données pourraient donc expliquer pourquoi l'activation du D2 et du NTR1 ne produit pas d'effets additifs, mais les détails de l'interaction bidirectionnelle entre ces deux récepteurs demeurent encore aujourd'hui mal connus.

1.2 Différences entre les deux isoformes du récepteur D2

Nous avons aussi montré que les deux isoformes du récepteur D2 sont régulés de manières différentes par la NT: celle-ci provoque une internalisation du D2S en deux temps, qui se caractérise par une phase rapide et d'amplitude importante, pour ensuite se stabiliser à des valeurs plus modestes, alors que le D2L ne s'internalise que modérément et de façon très stable durant la période de stimulation par la NT. La différence d'amplitude dans l'internalisation du D2S et du D2L induite par la NT s'explique probablement par leurs différentes sensibilités à la phosphorylation par la PKC. En effet, les 29 acides aminés qui sont présents seulement dans la structure du D2L agissent comme site de pseudo-substrat, réduisant l'accessibilité des sites de phosphorylation par la PKC (Liu et al., 1992; Morris et al., 2007). Cette différence dans l'efficacité de la phosphorylation par la PKC du D2S et du D2L pourrait donc expliquer la différence d'amplitude maximale de l'internalisation des récepteurs D2 induite par la NT. Par ailleurs, le fait que l'internalisation du D2S ne soit pas stable dans le temps s'expliquerait potentiellement par le fait que la réponse maximale de la NT est contrecarrée par une internalisation massive et rapide des récepteurs NTR1 suite à leur activation (Botto et al., 1998; Vandenbulcke et al., 2000).

1.3 Phosphorylation directe du récepteur D2 par la PKC

Dans cet article, nous avons étudié l'interaction NTR1-D2 aussi bien dans un modèle d'expression hétérologue que dans des neurones DAergiques en culture. Dans le premier cas, nous avons directement mesuré l'internalisation du récepteur D2 dans des cellules HEK-293; dans le second, nous avons utilisé la mesure de l'inhibition du taux de décharges spontanée des neurones DAergiques par l'activation de l'autorécepteur comme lecture de l'activité du récepteur D2. Dans les deux cas, nos données démontrent que la PKC représente l'élément clé de la signalisation faisant le lien entre l'activation du récepteur NTR1 et l'inhibition de la fonction du D2. Étant donné que l'activation du D2 dans les neurones DAergiques entraîne l'ouverture de canaux potassiques (Lacey et al., 1987; Missale et al., 1998) et que le NTR1 régule négativement les canaux potassiques à rectification entrante par la PKC (Wu et Wang, 1995; Cathala et Paupardin-Tritsch, 1997), la modulation opposée des conductances potassiques par la DA et la NT représentait un mécanisme potentiel pour expliquer l'interaction fonctionnelle entre le NTR1 et le D2. Toutefois, nos résultats suggèrent qu'il ne s'agit probablement pas d'un élément essentiel, puisque nous démontrons que la surexpression d'un récepteur D2 muté sur des sites de phosphorylation critiques de la PKC (T225A, S228G et S229G) dans des neurones DAergiques bloque complètement l'interaction fonctionnelle entre le D2 et le NTR1. Les sites de phosphorylation S228 et S229 sont associés spécifiquement à l'internalisation du D2 induite par la PKC, et non à sa désensibilisation fonctionnelle (Namkung et Sibley, 2004), ce qui suggère que le mécanisme d'interaction entre le D2 et le NTR1 passerait davantage par une séquestration membranaire du D2 plutôt que par une désensibilisation fonctionnelle. De plus, il est important de souligner que d'autres sites de phosphorylation par la PKC (T352, T354 and S355) sont aussi présents sur le D2 (Namkung et Sibley, 2004). Même si ces sites sont probablement phosphorylés par la PKC suite à une application de NT, il semble que leur rôle soit minimal dans l'interaction fonctionnelle entre le D2 et le NTR1 puisque les mutations de T225, S228 et S229 sont suffisantes pour la bloquer complètement. Toutefois, des expériences supplémentaires seront nécessaires afin

de déterminer le rôle précis de ces différents sites de phosphorylation dans la régulation du D2 par la NT. En plus d'être la conséquence du site de pseudo-substrat, la cinétique particulière de l'internalisation du D2S induite par la NT comparée à celle du D2L pourrait effectivement dépendre de différents sites de phosphorylation et, ainsi, devenir un élément important dans la compréhension des effets pré- et postsynaptiques de la NT.

1.4 Protéines impliquées dans le mécanisme d'interaction NTR1-D2

Nos enregistrements du taux de décharge spontanée des neurones DAergiques en réponse à l'activation de l'autorécepteur D2 après l'inhibition de l'expression de β -arr1, Dyn1 et Dyn2 par ARNs interférents confirment certains résultats déjà publiés. En effet, comme nos données l'indiquent, la désensibilisation fonctionnelle homologue du D2 présynaptique dépend de la β -arr1 et de la Dyn2, mais pas de la Dyn1 (Vickery et Von Zastrow, 1999; Zhang et al., 1999; Oakley et al., 2000; Kim et al., 2001; Kabbani et al., 2004). Nous n'avons pas examiné l'influence de β -arr2 dans la désensibilisation fonctionnelle homologue de l'autorécepteur D2 puisque nous ne l'avons pas détecté dans nos cultures de neurones mésencéphaliques, ce qui est compatible avec d'autres données sur l'expression des arrestines dans le mésencéphale (Gurevich et al., 2002). Toutefois, d'autres travaux ont démontré l'implication de β -arr2 dans une nouvelle forme de signalisation et pour l'internalisation du D2 dans les neurones striataux (Beaulieu et al., 2005; Skinbjerg et al., 2009). Ainsi, nos données s'insèrent très bien dans l'hypothèse selon laquelle il y aurait une différence dans la régulation de la désensibilisation du récepteur D2 pré- ou postsynaptique (Usiello et al., 2000; Lindgren et al., 2003) qui dépend, dans ce cas-ci, des éléments de signalisation exprimés dans les neurones de la région étudiée.

1.5 Désensibilisation fonctionnelle et/ou internalisation?

Nous démontrons que seule l'inhibition de l'expression de β -arr1 réduit l'habilité de la NT à diminuer la fonction de l'autorécepteur D2 dans les neurones DAergiques, ce qui ajoute un autre argument en faveur d'une désensibilisation hétérologue comme principal mécanisme à l'origine de l'interaction fonctionnelle entre les récepteurs NTR1 et D2. En effet, même si Dyn2 semble impliquée dans la désensibilisation fonctionnelle homologue du D2, son inhibition n'a pas affecté l'interaction NTR1-D2 dans les neurones DAergiques. Ce résultat peut paraître surprenant étant donné que l'internalisation hétérologue du D2L est bloquée par l'utilisation de protéines agissant comme dominant-négatifs des arrestines ou des dynamines dans des cellules HEK-293 (Namkung et Sibley, 2004), suggérant un rôle significatif des dynamines dans l'internalisation du D2 induite par la PKC. Toutefois, des différences techniques importantes doivent être considérées pour expliquer cette discordance, telles que la différence de modèle expérimental (neurones DAergiques en cultures versus cellules HEK-293), l'isoforme étudié (D2S versus D2L) et, plus particulièrement, le décours temporel de l'expérience (3 minutes d'application de NT versus 2 heures de traitement avec un activateur chimique de la PKC). Ainsi, il est possible que nos résultats fonctionnels illustrent les effets aigus de la NT, qui pourraient dépendre de mécanismes qui ne sont pas tout à fait semblable à ceux des effets à plus long terme. Par ailleurs, même si nos résultats dans les cellules HEK-293 nous indiquent que la NT peut entraîner l'internalisation du D2, nos données fonctionnelles provenant d'enregistrements électrophysiologiques de neurones DAergiques pourraient dépendre d'une désensibilisation fonctionnelle *et/ou* d'une séquestration membranaire du D2, toutes les deux entraînées par la phosphorylation directe du récepteur par la PKC. Nous proposons donc le mécanisme suivant: suite à l'activation du NTR1, la PKC phosphoryle le récepteur D2 pour provoquer une première étape de désensibilisation fonctionnelle qui dépend de la β -arr1, ce qui correspondrait à l'effet observé en électrophysiologie dans les neurones DAergiques. Par la suite, lors d'une activation soutenue du NTR1, il pourrait y avoir internalisation du récepteur D2, tel que révélé par les expériences avec les cellules HEK-293, probablement

par un mécanisme impliquant la β -arr1 et la Dyn2. Afin de valider le modèle proposé ici, il serait envisageable de comparer les effets d'applications courtes (comme nous l'avons déjà fait ici) et prolongées (au-delà de 15 minutes) de NT sur des neurones DAergiques dont l'expression de la Dyn2 aurait été inhibée par ARN interférent. Dans ce contexte, nous nous attendrions à ce que le rôle de la Dyn2 soit révélé par le traitement prolongé.

1.6 Pertinence de nos données dans un contexte pathologique

Dans leur ensemble, nos résultats proposent un nouveau mécanisme d'interaction par lequel la NT régule négativement la fonction de l'autorécepteur D2, grâce à une désensibilisation hétérologue qui découle d'une phosphorylation directe du D2 par la PKC. Il semble important de souligner que nos données ont été obtenues grâce à l'étude de cellules hétérologues ou de neurones DAergiques en culture primaire. Bien que fort utiles pour manipuler aisément certains facteurs tels que l'expression de gènes et l'activité des récepteurs par des méthodes pharmacologiques et moléculaires, ces modèles expérimentaux comportent des différences évidentes avec le contexte *in vivo*, ce qui fait qu'une confirmation de nos résultats dans un contexte plus physiologique permettrait d'élargir nos conclusions avec plus de validité.

La NT est reconnue comme un important modulateur du système DAergique (Binder et al., 2001) et, en ce sens, a été souvent examinée en relation avec des pathologies associées à la DA comme la toxicomanie, la maladie de Parkinson et la schizophrénie. Par exemple, plusieurs études ont démontré un lien important entre la signalisation des récepteurs de la NT et l'induction d'une sensibilité accrue aux amphétamines (Panayi et al., 2005, 2002; Rompré and Perron, 2000; Rompré, 1997). Plus récemment, un mécanisme d'inhibition via la PKC des fonctions de l'autorécepteur D2 par la DA (*DA inhibition reversal*), ce qui pourrait être potentiellement impliqué dans la sensibilisation aux drogues d'abus (Nimitvilai et al., 2012a), a été reproduit par un traitement à la NT (Nimitvilai et al., 2012b). Des travaux supplémentaires seront toutefois nécessaires afin de déterminer s'il

s'agit là du même mécanisme de phosphorylation directe du récepteur D2 par la PKC dévoilé par nos résultats. Au sujet de la maladie de Parkinson, certains travaux ont démontré une diminution des sites de liaisons de la NT dans le striatum de cerveaux *post mortem* (Chinaglia et al., 1990; Fernandez et al., 1994). En se basant sur nos résultats, il semble possible d'envisager que ce phénomène soit une forme de compensation pour contrer les effets inhibiteurs de la NT sur l'activité du D2 dans un contexte où la dégénérescence des afférences DAergiques entraîne une hyperactivité des MSNs de la voie striatopallidale. De plus, il semble que l'excitabilité des MSNs et la transmission glutamatergique corticostriatale puisse être modulée négativement par un antagoniste sélectif du NTR1, offrant une nouvelle avenue thérapeutique pour accompagner le traitement classique à la L-DOPA (Ferraro et al., 2008, 2012). En effet, l'utilisation d'un tel antagoniste serait éventuellement plus profitable durant les stades avancés de la maladie de Parkinson: si beaucoup de neurones DAergiques sont encore présent, l'antagoniste pourrait avoir un effet négatif sur le tonus DAergique endogène, ce qui aggraverait potentiellement les symptômes moteurs.

D'autre part, il a été rapporté que certaines cohortes de patients schizophrènes démontrent une concentration en NT plus faible que la normale dans leur liquide céphalorachidien, et un traitement avec des antipsychotiques normalise ces concentrations de façon parallèle à l'amélioration des symptômes cliniques (Nemeroff et al., 1989; Garver et al., 1991; Sharma et al., 1997). Chez le rat, la surexpression du NTR1 par infection virale dans le noyau accumbens diminue grandement l'hyperlocomotion et le déficit de filtrage sensoriel (*pre-pulse inhibition* ou PPI), deux réponses comportementales induites par des traitements avec des amphétamines ou de la dizocilpine (antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA) et associées à certains des symptômes majeurs de la schizophrénie (Cáceda et al., 2005). Récemment, il a été démontré que des animaux chez lesquels le gène encodant le NTR1 a été inactivé démontrent une plus grande libération de DA dans le striatum à l'état basal ainsi qu'en réponse à un traitement aux amphétamines, de même qu'une importante réduction de l'amélioration du PPI et du réflexe de surprise auditive (*acoustic startle reflex*) normalement induite par des molécules homologues de le

NT (Feifel et al., 2010b; Liang et al., 2010). Différentes molécules agissant comme agonistes des récepteurs de la NT ont attiré passablement d'attention à titre de nouveaux candidats potentiels pour la pharmacothérapie de la schizophrénie (Kinkead et Nemeroff, 2002; Boules et al., 2007; Li et al., 2010). D'ailleurs, certains ont même émis l'hypothèse que les propriétés antipsychotiques de la NT pourraient découler directement d'une combinaison de ses effets sur les récepteurs D2 pré- et postsynaptiques (Binder et al., 2001; Cáceda et al., 2006; Boules et al., 2007). Nos résultats démontrant une capacité de la NT à réguler le D2S et le D2L avec une amplitude et un décalage temporel différents dans les cellules HEK-293 sont très pertinents dans ce contexte, puisqu'ils fournissent une nouvelle base mécanistique pour expliquer comment la NT pourrait influencer différemment la signalisation du D2 pré- et post-synaptique. En effet, des données anatomiques et fonctionnelles ont suggéré que le D2L serait responsable principalement des effets postsynaptiques du récepteur D2, alors que le D2S serait plutôt le principal autorécepteur exprimé par les neurones DAergiques (Khan et al., 1998; Usiello et al., 2000; Lindgren et al., 2003). Même si nos expériences électrophysiologiques montrant que la NT produit la désensibilisation fonctionnelle hétérologue du D2 via la PKC et la β -arr1 n'ont examiné que le récepteur D2 présynaptique, d'autres travaux ont démontré que la NT pouvait aussi réguler négativement la fonction du D2 au niveau postsynaptique dans le striatum et d'autres régions du cerveau (Beauregard et al., 1992; Li et al., 1994; Díaz-Cabiale et al., 2002). Ainsi, tel que suggéré par nos résultats avec les cellules HEK-293, il est possible que la NT régule les récepteurs D2 pré- et postsynaptiques par un mécanisme similaire, mais avec une magnitude et un décalage temporel différents, ce qui pourrait aussi être important pour les effets antipsychotiques de la NT. Cette possibilité, qui reste évidemment à démontrer, pourrait éventuellement servir de nouvelle base pour mieux comprendre le mécanisme des effets antipsychotiques de la NT ainsi que de permettre de développer des approches pharmacologiques plus efficaces et sélectives contre les symptômes de la schizophrénie.

2: Établissement et maintien de la ségrégation de l'expression des récepteurs D1 et D2 dans le striatum

Dans le cadre du deuxième volet de ce programme de doctorat, nous nous sommes tournés vers la cible principale des projections DAergiques: le striatum. Le deuxième article de cette thèse s'est intéressé à l'étude de l'expression et de la ségrégation des récepteurs de la DA dans cette région du cerveau au cours du développement à l'aide de souris transgéniques *drd1a*-tdTomato/*drd2*-GFP qui expriment des gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur des gènes des récepteurs D1 et D2 de la DA. Notre premier résultat majeur consiste en la démonstration d'une proportion plus élevée de neurones striataux exprimant le D1 que le D2 à tous les âges examinés (E18, P0 et P14). En deuxième lieu, nous avons observé une baisse graduelle du pourcentage de neurones exprimant seulement le D1 au profit de neurones exprimant seulement le D2 dans le striatum à P0 et P14 comparés à E18. Nos observations ont montré que cette transition est aussi accompagnée d'une diminution du pourcentage de neurones striataux exprimant les deux récepteurs. Nous montrons finalement que la ségrégation D1/D2 semble complètement maintenue dans des cultures primaires de MSNs post-nataux, la colocalisation entre les marqueurs ne dépassant jamais les 5 %.

2.1 Ségrégation D1/D2 dans le striatum à différents âges

Depuis plusieurs années, l'étendue précise de la ségrégation entre les projections directes et indirectes des MSNs a nourri un débat considérable, particulièrement en ce qui a trait à leur expression des sous-types de récepteurs de la DA (Gerfen et al., 1990; Meador-Woodruff et al., 1991; Weiner et al., 1991; Lester et al., 1993; Larson and Ariano, 1994; Le Moine and Bloch, 1995; Surmeier et al., 1996). Bien qu'il existe un certain degré de colocalisation D1/D2 dans les MSNs, menant à la remarquable formation d'hétéromères D1-D2 possédant une cascade de signalisation et une pharmacologie particulières (Rashid et al., 2007; Hasbi et al., 2009), le consensus général demeure tout de même que, chez

l'animal adulte, la majorité des MSNs de la voie directe expriment un niveau élevé de récepteur D1 et très peu de D2, alors que la majorité des MSNs de la voie indirecte expriment un niveau élevé de récepteur D2 et très peu de D1 (Bertran-Gonzalez et al., 2010). Les études réalisées depuis l'introduction des souris BAC transgéniques *drd2*-GFP et *drd1a*-tdTomato ont largement confirmé l'importante ségrégation D1/D2 présente dans les MSNs matures (Shuen et al., 2008; Ade et al., 2011). Toutefois, les détails de l'établissement de cette ségrégation au cours du développement n'ont jamais été décrits avant nos travaux. Par ailleurs, certains travaux ont suggéré que cette ségrégation disparaissait une fois les MSNs mis en culture (Shetreat et al., 1996; Wong et al., 1999; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2004; Hasbi et al., 2009). Cette possibilité impliquerait que le maintien et/ou l'établissement du profil d'expression des récepteurs DAergiques serait dépendant d'un ou plusieurs facteurs extrinsèques. En soit, cette propriété est intéressante d'un point de vue de l'ontogénie du système nerveux, mais aussi dans un contexte où, éventuellement, la ségrégation des récepteurs DAergiques pourrait aussi être modifiée chez l'adulte par la modulation de ces mêmes facteurs extrinsèques. D'autre part, de toute évidence, une perte de la ségrégation des récepteurs D1 et D2 dans le striatum en culture cellulaire diminuerait grandement l'utilité des modèles *in vitro* afin d'étudier la fonction des MSNs. Une bonne connaissance des facteurs pouvant influencer le maintien ou l'établissement de cette ségrégation offrirait des bases utiles pour palier ce genre de problèmes et mieux profiter de l'utilité des modèles *in vitro*.

Dans le deuxième article de cette thèse, nous reproduisons des résultats antérieurs montrant une ségrégation générale de l'expression des récepteurs D1 et D2 dans le striatum. Nous démontrons aussi qu'il existe un pourcentage plus important de neurones exprimant le gène rapporteur du récepteur D1 (la tdTomato) que de neurones exprimant le gène rapporteur du récepteur D2 (la GFP), et que cette différence est plus élevée à E18 qu'à P0 ou P14. Ces données peuvent paraître en conflit avec une étude qui rapportait une expression plus abondante de l'ARN du récepteur D2 que celui du D1 dans le striatum en développement (Araki et al., 2007). Cependant, il est nécessaire de préciser que notre analyse s'est limitée à la quantification du pourcentage de cellules exprimant les protéines

fluorescentes sous le contrôle des gènes rapporteurs *drd2*-GFP et *drd1a*-tdTomato, et non à la quantification exacte de l'ARN ou des protéines des récepteurs D1 et D2. De plus, notons que nous avons remarqué une fluorescence beaucoup plus intense dans les neurones purement GFP-positifs que dans les neurones tdTomato-positifs à E18 (données non présentées), ce qui suggère qu'à cette étape du développement, malgré que le pourcentage de neurones D2-positifs soit plus faible, le niveau d'expression du D2 par neurone est probablement supérieur à celui du D1. D'autre part, notre analyse a révélé que la baisse du pourcentage de neurones D1-positifs était accompagnée d'une augmentation graduelle des neurones D2-positifs ainsi qu'une diminution des neurones doublement marqués de E18 à P0 et P14. Pris ensemble, ces résultats suggèrent la possibilité que les MSNs nouvellement différenciés pourraient exprimer majoritairement le récepteur D1 tôt dans le développement du striatum, jusqu'à ce que certains d'entre eux commencent à exprimer graduellement plus de récepteur D2 et moins de D1, pour éventuellement devenir purement D2. Ainsi, selon cette hypothèse, la co-expression D1/D2 représenterait en réalité une étape de transition entre le phénotype D1 et le phénotype D2. Une investigation plus détaillée à des âges inférieurs à E18 serait toutefois primordiale pour évaluer cette possibilité plus à fond. Il est aussi envisageable que l'expression transitoire de cette colocalisation soit cruciale dans le développement normal du striatum. En effet, il est probable que la co-expression des récepteurs D1 et D2 dans les mêmes cellules entraîne la formation d'hétéromères D1/D2, dont la signalisation permet, entre autres choses, une augmentation de la synthèse et de la relâche de BDNF, associée à une plus grande croissance neuronale dans le striatum (Rashid et al., 2007; Hasbi et al., 2009; Perreault et al., 2010). Puisque les fibres DAergiques innervent déjà le striatum durant la période embryonnaire (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000), la fenêtre d'expression de la co-expression D1/D2 par les MSNs se situe dans une période où elle est susceptible de contribuer positivement au développement du striatum. Une technique génétique d'inhibition conditionnelle du récepteur D1 dans les neurones exprimant le promoteur du gène du récepteur D2, ou vice-versa, permettrait d'inhiber sélectivement la coexpression de ces deux

récepteurs dans les mêmes neurones, ce qui nous permettrait d'en étudier les conséquences développementales.

2.2 Mécanismes d'induction et de maintien de la ségrégation D1/D2

Les éléments responsables de l'établissement et du maintien de la différenciation des MSNs exprimant le récepteur D1 ou le D2 sont présentement inconnus. Plusieurs possibilités non mutuellement exclusives peuvent toutefois être considérées: programmation génétique intrinsèque, signalisation par l'intermédiaire de facteurs sécrétés localement ou facteurs reliés à l'établissement de connexions afférentes et/ou efférentes. Étant donné la nature précoce de la ségrégation telle qu'observée dans notre étude, des facteurs intrinsèques ou locaux semblent être les candidats les plus probables. Dans nos expériences, nous avons observé un maintien évident de la ségrégation des récepteurs D1 et D2 par des MSNs en culture, quels que soient les autres types cellulaires présents avec les neurones striataux en culture mixte (neurones corticaux et/ou mésencéphaliques). Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une programmation intrinsèque du phénotype d'expression des récepteurs de la DA ou, à tout le moins, avec la possibilité que le patron d'expression devienne irréversible après son induction au cours du développement. Malgré que nos données sur la ségrégation en culture soient dans la même veine que celles d'une étude qualitative récente utilisant le même modèle génétique d'un croisement des animaux BAC transgéniques *drd2*-GFP et *drd1a*-tdTomato (Swift et al., 2011), elles sont toutefois en contradiction apparente avec un bon nombre de travaux précédents qui démontrent plutôt une grande colocalisation de l'expression des récepteurs D1 et D2 (de 22 à 90 %) dans des MSNs embryonnaires ou postnataux de rat en culture (Shetreat et al., 1996; Wong et al., 1999; Aizman et al., 2000; Lee et al., 2004; Hasbi et al., 2009). Une explication potentielle réside peut-être dans l'espèce étudiée: il est possible que les neurones striataux de rats exhibent une plus faible ségrégation que les neurones striataux de souris. Cependant, d'autres travaux chez le rat ont aussi rapporté une ségrégation importante des ARN des récepteurs D1 et D2 grâce à des expériences d'hybridation *in situ* (Gerfen et al., 1990; Le

Moine et al., 1991; Le Moine and Bloch, 1995). Donc, si des différences d'espèces sont à l'origine de ces résultats incongrus de ségrégation en culture, il s'agirait probablement d'une différence au niveau des mécanismes de maintien. Une autre possibilité, peut-être plus plausible, serait plutôt en lien avec les techniques d'analyses effectuées. En effet, un haut niveau de colocalisation pourrait résulter d'une présence élevée de faux positifs, provenant de la sélectivité perfectible des anticorps utilisés en immunocytochimie classique ou des ligands couplés à des fluorophores dans les expériences de liaisons. Il est notoire que les anticorps dirigés contre les récepteurs de la DA sont peu spécifiques et sélectifs, particulièrement en immunocytochimie. Bien que la technique utilisée dans nos travaux ne soit certes pas sans failles, nous jugeons que l'accumulation des protéines fluorescentes rapporteuses de l'expression des gènes du D1 et du D2 facilite grandement la délimitation et la distinction entre un corps cellulaire positif ou négatif. Mentionnons finalement que la comparaison entre l'expression des gènes rapporteurs du D1 et du D2 dans les quatre types différents de cultures primaires de neurones postnataux a révélé une légère tendance à la baisse de la colocalisation dans les cultures contenant des neurones mésencéphaliques. Bien que ce résultat ne soit pas statistiquement significatif, celui-ci suggère la possibilité que les afférences DAergiques puissent influencer la ségrégation D1/D2 dans les MSNs, surtout si l'on considère la présence très précoce des terminaisons DAergiques dans le striatum et la relâche de DA détectable au cours de la période prénatale (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000; Ferrari et al., 2012). Toutefois, nos résultats indiquent très clairement que la présence de neurones DAergiques et corticaux n'est pas nécessaire au maintien de l'expression des récepteurs de la DA dans les neurones striataux postnataux en culture. Ainsi, nous estimons qu'il est peu probable que l'établissement de la ségrégation *in vivo* dépende de facteurs extrinsèques tels que la transmission glutamatergique et DAergique, bien qu'il sera important d'effectuer des expériences similaires chez des animaux en développement afin de confirmer nos observations *in vitro*. D'ailleurs, il sera éventuellement bénéfique d'ajouter des études de colocalisation des récepteurs D1 et D2 chez les primates: de telles données sont présentement absentes de la littérature.

3: Rôle des neurones DAergiques dans la formation des synapses excitatrices sur les MSNs exprimant le récepteur D2

Dans le dernier article de cette thèse, nous avons exploré certains mécanismes pouvant contribuer à la formation des synapses excitatrices dans le striatum, particulièrement sur les MSNs exprimant le récepteur DAergique D2 (MSN-D2). Plus précisément, notre objectif principal était de déterminer le rôle des neurones DAergiques dans l'établissement des synapses excitatrices sur les MSN-D2. Étant donné la capacité de certains neurones DAergiques à utiliser aussi bien la DA que le glutamate comme neurotransmetteur, notre hypothèse était que ceux-ci pouvaient contribuer à la synaptogénèse des MSN-D2 grâce à la DA libérée, mais aussi en établissant des contacts synaptiques glutamatergiques. Notre premier résultat principal démontre qu'en présence de neurones mésencéphaliques, la densité d'épines dendritiques, le nombre de terminaisons axonales excitatrices et la quantité de synapses fonctionnelles sur les MSN-D2 augmentent par rapport à la condition de monocultures striatales, alors que l'interruption conditionnelle (cKO) du gène de VGLUT2 dans les neurones DAergiques diminue significativement cet effet. De plus, nous démontrons que la présence combinée de neurones mésencéphaliques et corticaux en culture avec les D2-MSNs entraîne l'atteinte d'un plateau maximal de terminaisons excitatrices, identique à celui atteint par la présence de neurones mésencéphaliques ou corticaux seuls, dans un processus qui semble dépendre d'un état d'équilibre entre les terminaisons VGLUT1- et VGLUT2-positives. Contrairement à nos prévisions initiales, nos résultats indiquent que l'activité des récepteurs DAergiques n'est pas nécessaire à l'établissement des épines dendritiques et des synapses excitatrices sur les MSN-D2. Finalement, nous démontrons que l'activité des récepteurs ionotropes du glutamate joue un rôle important dans la formation des épines dendritiques des MSN-D2, bien que l'antagonisme de ces récepteurs n'affecte pas le nombre total de terminaisons excitatrices ni la formation de synapses fonctionnelles.

3.1 Effet des neurones DAergiques: rôle du glutamate?

La DA représente un modulateur crucial des synapses glutamatergiques dans le striatum (Shen et al., 2008; Gerfen et Surmeier, 2011; Surmeier et al., 2011) et la signalisation des récepteurs DAergiques est impliquée dans le maintien des épines dendritiques des MSNs matures (Ingham et al., 1989; Stephens et al., 2005; Zaja-Milatovic et al., 2005; Neely et al., 2007; Villalba et al., 2009; Garcia et al., 2010), notamment pour les MSN-D2, tel que démontré dans des modèles de la maladie de Parkinson chez la souris (Day et al., 2006). Les projections axonales DAergiques innervent le striatum très tôt dans le développement et sont capables de relâcher de la DA dès la naissance chez le rongeur (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000; Ferrari et al., 2012), précédant ainsi l'établissement postnatal des afférences excitatrices glutamatergiques (Sharpe et Tepper, 1998; Tepper et al., 1998). Toutefois, le rôle des neurones DAergiques dans la formation initiale des connexions striatales n'a jamais été investigué auparavant. De plus, considérant les nombreux travaux récents démontrant que certains neurones DAergiques expriment le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT2 et utilisent le glutamate comme second neurotransmetteur (Dal Bo et al., 2004; Mendez et al., 2008; Stuber et al., 2010; Tecuapetla et al., 2010; Fortin et al., 2012), une question importante est de savoir si la formation de synapses glutamatergiques par les neurones DAergiques a un rôle à jouer dans la formation d'épines par les MSNs et plus globalement dans la régulation de la formation des synapses excitatrices dans la circuiterie du striatum. La relâche de glutamate par les neurones DAergiques n'a été démontrée jusqu'ici chez l'animal adulte que dans la voie mésolimbique (Stuber et al., 2010), mais l'expression abondante de VGLUT2 dans les neurones DAergiques embryonnaires (Mendez et al., 2008; Fortin et al., 2012) laisse présager une fonction potentielle de la cotransmission glutamatergique dans le développement de la circuiterie des ganglions de la base. Dans le dernier article de cette thèse, nous démontrons que la présence de neurones mésencéphaliques, dont environ 30 % sont des neurones DAergiques (Fasano et al., 2008), stimule la formation des épines et des

synapses excitatrices sur les MSN-D2 dans un modèle de co-culture contenant à la fois des neurones mésencéphaliques et striataux (CoMs). En l'absence de l'expression de VGLUT2 spécifiquement dans les neurones DAergiques, le nombre de terminaisons immunopositives pour VGLUT2 est drastiquement réduit et la densité d'épines dendritiques sur les D2-MSN diminue significativement dans des cultures de type CoMs. Ceci démontre pour la première fois que le co-phénotype glutamatergique des neurones DAergiques permet une contribution potentielle des afférences DAergiques à la formation des synapses excitatrices dans le striatum en développement. Cette observation est compatible avec la démonstration récente que chez la souris cKO VGLUT2, la densité des terminaisons immunopositives pour VGLUT2 est réduite dans le striatum ventral (Fortin et al., 2012). Bien que certains travaux aient identifié une population de neurones purement glutamatergiques dans l'ATV (Dobi et al., 2010), nous démontrons que la vaste majorité des terminaisons VGLUT2-positives sont éliminées dans nos cultures CoMs préparées à partir des animaux cKO, indiquant que les neurones DAergiques sont à l'origine de la plus grande partie de ces terminaisons excitatrices. D'ailleurs, il apparaît important de souligner que l'expression de VGLUT2 dans les neurones DAergiques est plus abondante durant la période de développement embryonnaire ainsi qu'après des lésions des noyaux DAergiques induites par la 6-hydroxy-DA (Dal Bo et al., 2008; Mendez et al., 2008). De plus, la souris cKO VGLUT2 possède des anomalies comportementales et une réponse anormale aux psychostimulants, des caractéristiques associées à des anomalies dans le circuit des ganglions de la base (Birgner et al., 2010; Hnasko et al., 2010). À la lumière de ces résultats, de nos données démontrant clairement que la présence de neurones corticaux est suffisante pour la formation d'épines dendritiques dans les MSN-D2 en culture CoCx, et compte tenu de l'innervation précoce du striatum par les fibres DAergiques durant le développement embryonnaire (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988; Perrone-Capano and Di Porzio, 2000; Ferrari et al., 2012), il serait envisageable que le glutamate libéré par les afférences mésostriatales puisse être impliqué dans un effet d'amorçage initial (« priming ») de la formation des épines dendritiques et des synapses excitatrices, jusqu'à ce que les afférences glutamatergiques corticales entrent en jeu plus tard, après la naissance, pour

entraîner la majeure partie de la synaptogénèse striatale. Puisque que la présence de VGLUT2 dans les neurones DAergiques permet une augmentation de l'emmagasinage vésiculaire de la DA par le biais du mécanisme de synergie vésiculaire (Hnasko et al., 2010), il demeure possible que la réduction de la densité des épines dendritiques dans les cultures CoMs réalisées à partir d'animaux cKO VGLUT2 soit la conséquence d'une diminution de la libération de DA. Pour exclure cette possibilité, il nous faudrait effectuer des traitements pharmacologiques à l'aide d'antagonistes des récepteurs DAergiques dans les cultures CoMs et en étudier les effets sur la formation des épines dendritiques. Or, comme nous l'avons démontré, puisque le blocage chronique du récepteur D2 entraîne une augmentation du nombre de terminaisons immunopositives pour VGLUT2 dans les cultures 3x, il serait aussi nécessaire de vérifier ce paramètre afin de s'assurer qu'un effet du traitement antagoniste D2 ne serait pas la conséquence d'un plus grand nombre de terminaisons excitatrices. Néanmoins, comme nous n'avons vu dans la condition de cultures triples (culture 3x: striatum, mésencéphale et cortex) aucun effet du blocage chronique des récepteurs DAergiques, mais un effet majeur du blocage des récepteurs glutamatergiques, il semble plus plausible d'envisager que le glutamate relâché par les neurones DAergiques soit la source de l'effet positif sur la formation des épines dendritiques dans les cultures CoMs. Alternativement, un traitement chronique en culture CoMs avec des antagonistes des récepteurs glutamatergiques permettrait d'amener d'autres renseignements utiles sur l'importance de la signalisation glutamatergique induite par le glutamate libéré principalement des neurones DAergiques, étant donné que les neurones purement glutamatergiques du mésencéphale contribue minimalement au total des terminaisons excitatrices dans cette condition. Une étude *in vivo* de la densité des synapses excitatrices corticales et thalamiques dans le striatum des animaux cKO serait aussi nécessaire afin de valider nos résultats: nous nous attendons à ce que le cKO diminue la densité absolue de synapses fonctionnelles ou, à tout le moins, ralentisse significativement leur formation.

3.2 Équilibre des afférences excitatrices et corrélation avec l'activité électrique

Nos résultats démontrent que la présence combinée de neurones striataux, mésencéphaliques et corticaux dans la condition 3x produit la même densité de terminaisons excitatrices que dans les co-cultures striatales contenant seulement les neurones mésencéphaliques (CoMs) ou corticaux (CoCx), et ce pour un nombre semblable de neurones mésencéphaliques et corticaux à l'ensemencement. Ceci suggère l'existence d'un possible équilibre compétitif dans l'établissement des afférences excitatrices, un concept qui rejoint en quelque sorte celui de la plasticité homéostatique proposée suite à des observations effectuées dans des neurones striataux matures (Neely et al., 2007; Garcia et al., 2010; Tian et al., 2010). Par ailleurs, la fréquence des mEPSCs corrèle davantage avec la quantité de terminaisons excitatrices qu'avec la densité d'épines dendritiques. Puisque les afférences corticales immunopositives pour VGLUT1 forment presque exclusivement des synapses sur les épines des MSNs, alors que les afférences thalamiques immunopositives pour VGLUT2 établissent une proportion substantielle de leurs synapses (20-30 %) sur les dendrites des MSNs (Moss et Bolam, 2008; Smith et al., 2009a), il est possible que plusieurs terminaisons immunopositives pour VGLUT2 des neurones DAergiques dans notre culture 3x s'établissent sur les dendrites plutôt que sur les épines. Ceci constitue une hypothèse pouvant expliquer la plus grande corrélation de l'activité synaptique avec le nombre de terminaisons axonales plutôt qu'avec la densité d'épines dendritiques. Toutefois, il sera nécessaire d'effectuer une analyse de l'ultrastructure de ces synapses VGLUT1- et VGLUT2-positives afin de vérifier cette possibilité. Alternativement, la DA pourrait être impliquée dans un mécanisme d'élagage des synapses superflues dans la condition 3x: il est possible que les épines surnuméraires dans la condition CoCx ne forme pas de synapses fonctionnelles, ou seulement des contacts relativement peu efficaces. Ainsi, la présence de neurones DAergiques dans les cultures 3x pourrait entraîner le maintien des synapses plus efficaces et/ou l'élimination des synapses moins efficaces. Un marquage immunocytochimique des densités postsynaptiques et des

récepteurs glutamatergiques AMPA nous permettrait de vérifier si toutes les épines dendritiques de la condition CoCx possèdent les mêmes caractéristiques fonctionnelles que celles de la condition 3x. Par ailleurs, mentionnons qu'afin de maintenir une densité cellulaire totale constante et une contribution identique des populations mésencéphaliques et corticales entre toutes les différentes conditions de culture, il a été nécessaire d'ajuster la quantité de neurones striataux en conséquence. Ainsi, le rapport du nombre de neurones mésencéphaliques ou corticaux sur le nombre de neurones striataux varie considérablement: il est le plus élevé dans les cultures 3x, ce qui, en théorie, aurait pu augmenter le potentiel de formation de synapses excitatrices sur les MSN-D2 de la culture 3x. Toutefois, le fait que le total des terminaisons excitatrices soit le même entre toutes les co-cultures nous indique qu'il ne s'agissait pas d'un problème majeur.

3.3 Signalisation DAergique versus glutamatergique

Les résultats obtenus suite au blocage chronique des récepteurs DAergiques dans la culture 3x vont à l'encontre de notre hypothèse initiale suggérant que l'activité de ces récepteurs pourrait contribuer à la formation des épines dendritiques et des synapses excitatrices sur les MSN-D2. Nous avons plutôt observé que l'antagonisme du récepteur D2 provoque une augmentation du nombre de terminaisons immunopositives pour VGLUT1 ou VGLUT2, ce qui suggère que le récepteur D2 puisse réguler négativement le développement des afférences excitatrices dans le striatum. Cette possibilité est en accord avec des travaux qui montrent que l'activation chronique du récepteur D2 peut diminuer la formation de synapses DAergiques et glutamatergiques établies par des neurones DAergiques en culture (Fasano et al., 2010). Nos résultats sont aussi compatibles avec la démonstration que l'élimination sélective des neurones DAergiques dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson entraîne une augmentation des terminaisons excitatrices dans le striatum (Ingham et al., 1993; Raju et al., 2008; Villalba et Smith, 2011) ainsi qu'une perte indirecte des épines dendritiques sur les MSNs par le dérèglement de la transmission glutamatergique (Neely et al., 2007; Garcia et al., 2010). Le blocage

pharmacologique du D2 ou son ablation génétique augmente aussi la densité des terminaisons DAergiques dans le striatum (Parish et al., 2001, 2002; Tinsley et al., 2009). Étonnamment, l'augmentation importante du nombre de terminaisons excitatrices par l'antagonisme chronique du récepteur D2 dans nos cultures 3x n'a pas entraîné de conséquence sur la formation d'épines dendritiques. Cette incongruité demeure présentement inexplicée, mais il est possible que l'antagonisme du récepteur D2 perturbe l'équilibre s'établissant normalement entre les terminaisons excitatrices et la formation des synapses, menant à l'accumulation de terminaisons superflues qui ne peuvent établir de contacts fonctionnels avec les dendrites ou les épines. Aussi, étant donné la quantité relativement faible de neurones striataux dans la culture 3x, il serait envisageable que l'essentiel de ces nouvelles terminaisons forment des synapses sur des neurones qui ne sont pas des MSNs; une visualisation plus détaillée de l'ultrastructure de ces terminaisons permettrait de voir si elles se trouvent effectivement en contact avec d'autres neurones. De plus, le fait que cette augmentation des terminaisons excitatrices ne soit pas présente dans la condition de traitement SCH+Sulp suggère qu'il s'agisse en fait davantage d'un déséquilibre de la signalisation DAergique plutôt que d'un effet sélectivement lié au D2. Il serait intéressant de comparer les effets d'un traitement chronique de cultures CoCx avec des agonistes sélectifs des récepteurs D1 et D2; ceci nous permettrait de préciser si l'activation du D1, conjointement à l'inactivation du D2, est nécessaire à l'augmentation des terminaisons excitatrices. Finalement, une perturbation sélective de la signalisation du D2 dans les MSNs, les neurones DAergiques ou les neurones corticaux serait avantageuse afin de décortiquer les effets pré- et postsynaptiques qui semblent se confondre de manière insondable dans notre modèle.

Nous avons aussi démontré que le blocage combiné des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA réduit la formation des épines dendritiques dans nos cultures 3x. Cette observation est compatible avec des travaux précédents qui montrent que les neurones glutamatergiques corticaux et leur activité jouent un rôle important dans la synaptogénèse excitatrice dans des cultures striatales (Segal et al., 2003; Penrod et al., 2011) et *in vivo* (Kozorovitskiy et al., 2012). Étonnamment, nos résultats indiquent que la perte d'épines

dendritiques n'est pas accompagnée par une réduction des terminaisons excitatrices: les terminaisons immunopositives pour VGLUT1 sont plus nombreuses et les terminaisons immunopositives pour VGLUT2 moins nombreuses, pour un total constant de terminaisons excitatrices. Il semble encore ici que l'antagonisme pharmacologique des récepteurs AMPA et NMDA produise une combinaison complexe d'effets pré- et postsynaptiques. Par ailleurs, ces données concordent avec une étude démontrant une diminution du bourgeonnement axonal dans des neurones d'hippocampe traités avec des antagonistes des récepteurs NMDA (McKinney et al., 1999), ainsi que des résultats récents montrant que l'activation des récepteurs AMPA et NMDA dans des neurones DAergiques promeut la croissance et l'arborisation des axones (Schmitz et al., 2009). Ici encore, une analyse de l'ultrastructure synaptique permettrait de déterminer si une réorganisation des synapses excitatrices s'est effectuée, se relocalisant des épines aux dendrites, ce qui pourrait expliquer nos résultats.

En résumé, nos données suggèrent qu'alors que la DA elle-même ne semble pas jouer un rôle essentiel dans la synaptogénèse excitatrice sur les MSN-D2, il est possible que la présence précoce de terminaisons DAergiques immunopositives pour VGLUT2 dans le striatum en développement puisse faciliter la formation des épines dendritiques en préparant la venue pour les afférences glutamatergiques corticales et thalamiques qui n'atteignent le striatum qu'après la naissance. Il sera toutefois nécessaire d'explorer cette possibilité *in vivo* afin de comprendre le véritable impact de la libération de glutamate par les neurones DAergiques dans l'établissement des circuits striataux. Par ailleurs, une limitation importante de notre étude est que nous n'avons pas examiné le rôle du glutamate libéré par les interneurons cholinergiques du striatum, eux qui expriment le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT3 tôt dans le développement ainsi que chez l'adulte (Gras et al., 2002, 2005; Ding et al., 2010; Higley et al., 2011). Il a été démontré qu'une application focalisée de glutamate sur une dendrite de MSN immature est suffisante pour provoquer très rapidement la croissance *de novo* d'une épine dendritique (Kozorovitskiy et al., 2012). Si le glutamate libéré par les terminaisons DAergiques qui innervent le striatum peut stimuler la formation d'épines dendritiques dans les MSNs, il est certainement possible que le glutamate libéré *in situ* par les interneurons cholinergiques puisse également

contribuer à ce phénomène. Ainsi, nous nous attendons à ce qu'on cKO de l'expression de VGLUT3 dans les interneurones cholinergiques diminue aussi la formation des épines dendritiques des MSNs au moins au cours du développement, mais il est difficile de prédire si l'effet sera plus ou moins important que celui d'un cKO de VGLUT2 dans les afférences DAergiques. Notons toutefois que l'expression de VGLUT3 atteint un sommet après la naissance vers le 10^e jour postnatal, ce qui peut éventuellement diminuer son importance sur la synaptogénèse striatale *in vivo*. Finalement, considérant l'absence d'influence de la signalisation DAergique sur la synaptogénèse des MSN-D2, les résultats de notre étude peuvent probablement être étendus aux MSN-D1, même si des différences au niveau de l'excitabilité intrinsèque de ces deux populations de MSNs (Day et al., 2008) pourrait probablement influencer leur synaptogénèse respective.

Conclusion

Bien que les principales voies DAergiques du cerveau soient bien décrites au point de vue anatomique (Björklund et Dunnett, 2007), l'expression très étendue et variée des 5 types de récepteurs DAergiques par les différentes populations de neurones cibles permet une variété remarquable d'effets de la DA. Les travaux de cette thèse avaient pour objectif d'étudier des phénomènes qui se voulaient, à la base, soit principalement pré- ou postsynaptiques. Cette classification apparaît aujourd'hui un peu naïve, et nos principaux résultats témoignent avec éloquence de l'aspect indissociable des effets pré- et postsynaptiques de la DA.

Les données obtenues dans le premier article de cette thèse ont caractérisé le mécanisme de désensibilisation hétérologue du récepteur D2 présynaptique par la NT. En effet, nous avons démontré une différence dans les effets de la NT sur les deux isoformes du récepteur D2: le D2S, majoritairement présynaptique, subit une internalisation massive dans les 10 premières minutes de traitement à la NT, pour se stabiliser à un niveau plus modeste par la suite; et le D2L, majoritairement postsynaptique, subit une internalisation modeste et stable durant toute la durée de traitement à la NT. Ainsi, même si nos travaux fonctionnels ont porté sur les détails du mécanisme d'interaction dans les neurones DAergiques, il est possible que le D2L postsynaptique soit régulé par un mécanisme semblable, mais avec une amplitude et une cinétique différente. Cette possibilité de nuance entre les effets présynaptiques et postsynaptiques de la NT représente un élément critique dans la compréhension de ses effets globaux sur le système DAergique et une piste intéressante à exploiter dans la manipulation sélective des récepteurs D2 pré- ou postsynaptiques.

Un autre exemple de l'aspect indissociable du point de vue pré- et postsynaptique dans l'étude de la transmission DAergique est illustré par les résultats du dernier article de

cette thèse: nous avons observé une corrélation entre le nombre de terminaisons glutamatergiques et le nombre de synapses excitatrices sur des MSN-D2 en culture. Or, notre manipulation des récepteurs DAergiques et glutamatergiques dans le but d'identifier le rôle de leur signalisation postsynaptique dans la formation des épines dendritiques et des synapses fonctionnelles a entraîné une combinaison complexe d'effets pré- et postsynaptiques. Celle-ci a rendu considérablement plus difficile l'interprétation des résultats, mais atteste clairement de la grande complexité du système étudié.

Une démarche scientifique efficace consiste généralement à élaborer des expériences pouvant mettre en jeu un nombre de variables aussi limité que possible, afin de pouvoir interpréter les résultats en établissant des liens de causalité simples et intelligibles. Comme la plupart des systèmes biologiques dépendent de l'interaction complexe de nombreux facteurs, il faut souvent se résoudre à choisir entre un modèle expérimental simple mais artificiel, ou valide mais incompréhensible. Ce dilemme est un défi quotidien pour le chercheur, et je me considère privilégié d'avoir goûté autant à sa douceur qu'à son amertume. Que ce soit pour le rôle potentiel de la NT dans le traitement de la schizophrénie, ou l'influence des neurones DAergiques sur les synapses excitatrices du striatum dans le contexte éventuel de la maladie de Parkinson, j'espère humblement que les travaux de cette thèse contribueront à faciliter la compréhension globale des fonctions et dysfonctions fascinantes du système dopaminergique du cerveau.

Bibliographie

- Ade, K.K., Wan, Y., Chen, M., Gloss, B., Calakos, N., 2011. An Improved BAC Transgenic Fluorescent Reporter Line for Sensitive and Specific Identification of Striatonigral Medium Spiny Neurons. *Front Syst Neurosci* 5, 32.
- 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.
- Akaike, A., Ohno, Y., Sasa, M., Takaori, S., 1987. Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate nucleus neurons in vitro. *Brain Res.* 418, 262–272.
- Alexander, M.J., Leeman, S.E., 1998. Widespread expression in adult rat forebrain of mRNA encoding high-affinity neurotensin receptor. *J. Comp. Neurol.* 402, 475–500.
- Allen, J.M., Cross, A.J., Yeats, J.C., Ghatei, M.A., McGregor, G.P., Close, S.P., Pay, S., Marriott, A.S., Tyers, M.B., Crow, T.J., 1986. Neuropeptides and dopamine in the marmoset. Effect of treatment with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6 tetrahydropyridine (MPTP): an animal model for Parkinson's disease? *Brain* 109 (Pt 1), 143–157.
- Anglade, P., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., Hirsch, E., 1996. Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 5, 121–128.
- Araki, K.Y., Sims, J.R., Bhide, P.G., 2007. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res.* 1156, 31–45.
- Bamford, N.S., Robinson, S., Palmiter, R.D., Joyce, J.A., Moore, C., Meshul, C.K., 2004. Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J. Neurosci.* 24, 9541–9552.
- Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217.

- Beaulieu, J.-M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2005. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122, 261–273.
- Beaulieu, J.-M., Tirotta, 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.
- Beauregard, M., Ferron, A., Descarries, L., 1992. Opposite effects of neurotensin on dopamine inhibition in different regions of the rat brain: an iontophoretic study. *Neuroscience* 47, 613–619.
- Bertler, A., Rosengren, E., 1959. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 15, 10–11.
- 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.
- Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., Valjent, E., 2010. What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front Neuroanat* 4.
- Betarbet, R., Porter, R.H., Greenamyre, J.T., 2000. GluR1 glutamate receptor subunit is regulated differentially in the primate basal ganglia following nigrostriatal dopamine denervation. *J. Neurochem.* 74, 1166–1174.
- Binder, E.B., Kinkead, B., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2001. Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol. Rev.* 53, 453–486.
- Birgner, C., Nordenankar, K., Lundblad, M., Mendez, J.A., Smith, C., Le Grevès, M., Galter, D., Olson, L., Fredriksson, A., Trudeau, L.-E., Kullander, K., Wallén-Mackenzie, A., 2010. VGLUT2 in dopamine neurons is required for psychostimulant-induced behavioral activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 389–394.

- Bissette, G., Nemeroff, C.B., Decker, M.W., Kizer, J.S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., 1985. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 17, 324–328.
- Björklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194–202.
- Blank, T., Nijholt, I., Teichert, U., Kügler, H., Behrsing, H., Fienberg, A., Greengard, P., Spiess, J., 1997. The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14859–14864.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196 (Pt 4), 527–542.
- Botto, J.M., Chabry, J., Sarret, P., Vincent, J.P., Mazella, J., 1998. Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 585–590.
- Boudin, H., Pélaprat, D., Rostène, W., Beaudet, A., 1996. Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J. Comp. Neurol.* 373, 76–89.
- Boudin, H., Pélaprat, D., Rostène, W., Pickel, V.M., Beaudet, A., 1998. Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra. *J. Neurosci.* 18, 8473–8484.
- Boules, M., Shaw, A., Fredrickson, P., Richelson, E., 2007. Neurotensin agonists: potential in the treatment of schizophrenia. *CNS Drugs* 21, 13–23.
- Bourne, J., Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 381–386.
- Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Grandy, D.K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A., Civelli, O., 1988. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336, 783–787.

- Cáceda, R., Kinkead, B., Nemeroff, C.B., 2006. Neurotensin: role in psychiatric and neurological diseases. *Peptides* 27, 2385–2404.
- Cáceda, R., Kinkead, B., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2005. Virally mediated increased neurotensin 1 receptor in the nucleus accumbens decreases behavioral effects of mesolimbic system activation. *J. Neurosci.* 25, 11748–11756.
- Calabresi, P., Mercuri, N.B., Sancesario, G., Bernardi, G., 1993. Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease. *Brain* 116 (Pt 2), 433–452.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Di Filippo, M., 2007. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 30, 211–219.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., 1963. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 20, 140–144.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., Waldek, B., 1958. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127, 471.
- Carlsson, A., Waters, N., Holm-Waters, S., Tedroff, J., Nilsson, M., Carlsson, M.L., 2001. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 237–260.
- Cathala, L., Paupardin-Tritsch, D., 1997. Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J. Physiol. (Lond.)* 503 (Pt 1), 87–97.
- Centonze, D., Grande, C., Saulle, E., Martin, 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.
- Cepeda, C., Buchwald, N.A., Levine, M.S., 1993. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9576–9580.

- Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., Le Fur, G., Ferrara, P., Caput, D., 1996. Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett.* 386, 91–94.
- Chien, P.Y., Farkas, R.H., Nakajima, S., Nakajima, Y., 1996. Single-channel properties of the nonselective cation conductance induced by neurotensin in dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 14917–14921.
- Chinaglia, G., Probst, A., Palacios, J.M., 1990. Neurotensin receptors in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: an autoradiographic study in basal ganglia. *Neuroscience* 39, 351–360.
- Cho, E.-Y., Cho, D.-I., Park, J.H., Kurose, H., Caron, M.G., Kim, K.-M., 2007. Roles of protein kinase C and actin-binding protein 280 in the regulation of intracellular trafficking of dopamine D3 receptor. *Mol. Endocrinol.* 21, 2242–2254.
- Cisek, P., Kalaska, J.F., 2010. Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 269–298.
- Dahlstrom, A., Fuxe, K., 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL* 232:1–55.
- Dal Bo, G., Bérubé-Carrière, N., Mendez, J.A., Leo, D., Riad, M., Descarries, L., Lévesque, D., Trudeau, L.-E., 2008. Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156, 59–70.
- Dal Bo, G., St-Gelais, F., Danik, M., Williams, S., Cotton, M., Trudeau, L.-E., 2004. Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J. Neurochem.* 88, 1398–1405.
- Dani, J.A., Zhou, F.-M., 2004. Selective dopamine filter of glutamate striatal afferents. *Neuron* 42, 522–524.
- Davenport, H.W., 1991. Early history of the concept of chemical transmission of the nerve impulse. *Physiologist* 34, 129, 178–190.

- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., Mugnaini, E., Deutch, A.Y., Sesack, S.R., Arbuthnott, G.W., Surmeier, D.J., 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251–259.
- Day, M., Wokosin, D., Plotkin, J.L., Tian, X., Surmeier, D.J., 2008. Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J. Neurosci.* 28, 11603–11614.
- De Camilli, P., Macconi, D., Spada, A., 1979. Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature* 278, 252–254.
- Deary, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T., Jr, Bates, M.D., Caron, M.G., 1990. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347, 72–76.
- Díaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., Narváez, J.A., Finetti, S., Antonelli, T., Tanganelli, S., Ferraro, L., 2002. Neurotensin-induced modulation of dopamine D2 receptors and their function in rat striatum: counteraction by a NTR1-like receptor antagonist. *Neuroreport* 13, 763–766.
- Ding, J., Peterson, J.D., Surmeier, D.J., 2008. Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive properties. *J. Neurosci.* 28, 6483–6492.
- Ding, J.B., Guzman, J.N., Peterson, J.D., Goldberg, J.A., Surmeier, D.J., 2010. Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron* 67, 294–307.
- Dobi, A., Margolis, E.B., Wang, H.-L., Harvey, B.K., Morales, M., 2010. Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 30, 218–229.
- Dobner, P.R., Barber, D.L., Villa-Komaroff, L., McKiernan, C., 1987. Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3516–3520.

- Doig, N.M., Moss, J., Bolam, J.P., 2010. Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J. Neurosci.* 30, 14610–14618.
- Einhorn, L.C., Gregerson, K.A., Oxford, G.S., 1991. D2 dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactotrophs: whole-cell and single-channel recording. *J. Neurosci.* 11, 3727–3737.
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, A., Fortin, G.M., Descarries, L., Trudeau, L.-E., 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 204–216.
- Engber, T.M., Boldry, R.C., Kuo, S., Chase, T.N., 1992. Dopaminergic modulation of striatal neuropeptides: differential effects of D1 and D2 receptor stimulation on somatostatin, neuropeptide Y, neurotensin, dynorphin and enkephalin. *Brain Res.* 581, 261–268.
- Erdtmann-Vourliotis, M., Mayer, P., Ammon, S., Riechert, U., Höllt, V., 2001. Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 95, 129–137.
- Farkas, R.H., Chien, P.Y., Nakajima, S., Nakajima, Y., 1996. Properties of a slow nonselective cation conductance modulated by neurotensin and other neurotransmitters in midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurophysiol.* 76, 1968–1981.
- Farkas, R.H., Chien, P.Y., Nakajima, S., Nakajima, Y., 1997. Neurotensin and dopamine D2 activation oppositely regulate the same K⁺ conductance in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci. Lett.* 231, 21–24.
- 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.

- Fasano, C., Thibault, D., Trudeau, L.-E., 2008. Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3, Unit 3.21.
- Fassio, A., Evans, G., Grisshammer, R., Bolam, J.P., Mimmack, M., Emson, P.C., 2000. Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology* 39, 1430–1442.
- Fatt, P., Katz, B., 1950. Some observations on biological noise. *Nature* 166, 597–598.
- Fawaz, C.S., Martel, P., Leo, D., Trudeau, L.-E., 2009. Presynaptic action of neurotensin on dopamine release through inhibition of D(2) receptor function. *BMC Neurosci* 10, 96.
- Feifel, D., Goldenberg, J., Melendez, G., Shilling, P.D., 2010a. The acute and subchronic effects of a brain-penetrating, neurotensin-1 receptor agonist on feeding, body weight and temperature. *Neuropharmacology* 58, 195–198.
- Feifel, D., Pang, Z., Shilling, P.D., Melendez, G., Schreiber, R., Button, D., 2010b. Sensorimotor gating in neurotensin-1 receptor null mice. *Neuropharmacology* 58, 173–178.
- Fernandez, A., De Ceballos, M.L., Jenner, P., Marsden, C.D., 1994. Neurotensin, substance P, delta and mu opioid receptors are decreased in basal ganglia of Parkinson's disease patients. *Neuroscience* 61, 73–79.
- Fernandez, A., Jenner, P., Marsden, C.D., De Ceballos, M.L., 1995. Characterization of neurotensin-like immunoreactivity in human basal ganglia: increased neurotensin levels in substantia nigra in Parkinson's disease. *Peptides* 16, 339–346.
- Ferrari, D.C., Mdzomba, B.J., Dehorter, N., Lopez, C., Michel, F.J., Libersat, F., Hammond, C., 2012. Midbrain dopaminergic neurons generate calcium and sodium currents and release dopamine in the striatum of pups. *Front Cell Neurosci* 6, 7.
- Ferraro, L., O'Connor, W.T., Beggiato, S., Tomasini, M.C., Fuxe, K., Tanganelli, S., Antonelli, T., 2012. Striatal NTS1, dopamine D2 and NMDA receptor regulation of pallidal GABA and glutamate release--a dual-probe microdialysis study in the

- intranigral 6-hydroxydopamine unilaterally lesioned rat. *Eur. J. Neurosci.* 35, 207–220.
- Ferraro, L., Tomasini, M.C., Mazza, R., Fuxe, K., Fournier, J., Tanganelli, S., Antonelli, T., 2008. Neurotensin receptors as modulators of glutamatergic transmission. *Brain Res Rev* 58, 365–373.
- Fortin, G.M., Bourque, M.-J., Mendez, J.A., Leo, D., Nordenankar, K., Birgner, C., Arvidsson, E., Rymar, V.V., Bérubé-Carrière, N., Claveau, A.-M., Descarries, L., Sadikot, A.F., Wallén-Mackenzie, Å., Trudeau, L.-É., 2012. Glutamate corelease promotes growth and survival of midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* 32, 17477–17491.
- Freneau, R.T., Jr, Voglmaier, S., Seal, R.P., Edwards, R.H., 2004. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 27, 98–103.
- Fulton, S., Thibault, D., Mendez, J.A., Lahaie, N., Tirotta, E., Borrelli, E., Bouvier, M., Tempel, B.L., Trudeau, L.-E., 2011. Contribution of Kv1.2 voltage-gated potassium channel to D2 autoreceptor regulation of axonal dopamine overflow. *J. Biol. Chem.* 286, 9360–9372.
- Gainetdinov, R.R., Bohn, L.M., Sotnikova, T.D., Cyr, M., Laakso, A., Macrae, A.D., Torres, G.E., Kim, K.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Premont, R.T., 2003. Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* 38, 291–303.
- Gainetdinov, R.R., Bohn, L.M., Walker, J.K., Laporte, S.A., Macrae, A.D., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Premont, R.T., 1999. Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron* 24, 1029–1036.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 107–144.

- Garcia, B.G., Neely, M.D., Deutch, A.Y., 2010. Cortical regulation of striatal medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism: modulation of glutamate release reverses dopamine depletion-induced dendritic spine loss. *Cereb. Cortex* 20, 2423–2432.
- Garver, D.L., Bissette, G., Yao, J.K., Nemeroff, C.B., 1991. Relation of CSF neurotensin concentrations to symptoms and drug response of psychotic patients. *Am J Psychiatry* 148, 484–488.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr, Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432.
- Gerfen, C.R., Surmeier, D.J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441–466.
- Gerfen, C.R., Young, W.S., 3rd, 1988. Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460, 161–167.
- Gertler, T.S., Chan, C.S., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28, 10814–10824.
- Gingrich, J.A., Caron, M.G., 1993. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 299–321.
- 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.
- Goulet, M., Morissette, M., Grondin, R., Falardeau, P., Bédard, P.J., Rostène, W., Di Paolo, T., 1999. Neurotensin receptors and dopamine transporters: effects of MPTP lesioning and chronic dopaminergic treatments in monkeys. *Synapse* 32, 153–164.
- Grace, A.A., Bunney, B.S., 1985. Low doses of apomorphine elicit two opposing influences on dopamine cell electrophysiology. *Brain Res.* 333, 285–298.
- Grandy, D.K., Zhang, Y.A., Bouvier, C., Zhou, Q.Y., Johnson, R.A., Allen, L., Buck, K., Bunzow, J.R., Salon, J., Civelli, O., 1991. Multiple human D5 dopamine receptor

- genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 9175–9179.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., El Mestikawy, S., 2002. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 5442–5451.
- Gras, C., Vinatier, J., Amilhon, B., Guerci, A., Christov, C., Ravassard, P., Giros, B., El Mestikawy, S., 2005. Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacology* 49, 901–911.
- Greengard, P., 2001. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294, 1024–1030.
- Greengard, P., Allen, P.B., Nairn, A.C., 1999. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23, 435–447.
- Greif, G.J., Lin, Y.J., Liu, J.C., Freedman, J.E., 1995. Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression. *J. Neurosci.* 15, 4533–4544.
- Gurevich, E.V., Benovic, J.L., Gurevich, V.V., 2002. Arrestin2 and arrestin3 are differentially expressed in the rat brain during postnatal development. *Neuroscience* 109, 421–436.
- Håkansson, K., Galdi, S., Hendrick, J., Snyder, G., Greengard, P., Fisone, G., 2006. Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D2 receptors. *J. Neurochem.* 96, 482–488.
- Hallett, P.J., Spoelgen, R., Hyman, B.T., Standaert, D.G., Dunah, A.W., 2006. Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J. Neurosci.* 26, 4690–4700.
- Hamm, H.E., Gilchrist, A., 1996. Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 189–196.
- Hanley, J.G., 2008. AMPA receptor trafficking pathways and links to dendritic spine morphogenesis. *Cell Adh Migr* 2, 276–282.

- Hanyaloglu, A.C., Von Zastrow, M., 2008. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 537–568.
- Hasbi, A., Fan, T., Alijaniam, M., Nguyen, T., Perreault, M.L., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2009. Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21377–21382.
- Hernández-Echeagaray, E., Starling, A.J., Cepeda, C., Levine, M.S., 2004. Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary? *Eur. J. Neurosci.* 19, 2455–2463.
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., Surmeier, D.J., 2000. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J. Neurosci.* 20, 8987–8995.
- 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.
- Higley, M.J., Gittis, A.H., Oldenburg, I.A., Balthasar, N., Seal, R.P., Edwards, R.H., Lowell, B.B., Kreitzer, A.C., Sabatini, B.L., 2011. Cholinergic interneurons mediate fast VGluT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS ONE* 6, e19155.
- Hnasko, T.S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G.Y., Sulzer, D., Palmiter, R.D., Rayport, S., Edwards, R.H., 2010. Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron* 65, 643–656.
- Hökfelt, T., Everitt, B.J., Theodorsson-Norheim, E., Goldstein, M., 1984. Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J. Comp. Neurol.* 222, 543–559.

- Hornykiewicz, O., 1958. The action of dopamine on the arterial blood pressure of the guinea-pig. *Br J Pharmacol Chemother* 13, 91–94.
- Hornykiewicz, O., 1966. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18, 925–964.
- Hornykiewicz, O., 2002. Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. *Mov. Disord.* 17, 501–508.
- Inanobe, A., Yoshimoto, Y., Horio, Y., Morishige, K.I., Hibino, H., Matsumoto, S., Tokunaga, Y., Maeda, T., Hata, Y., Takai, Y., Kurachi, Y., 1999. Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J. Neurosci.* 19, 1006–1017.
- Ingham, C.A., Hood, S.H., Arbuthnott, G.W., 1989. Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.* 503, 334–338.
- Ingham, C.A., Hood, S.H., Taggart, P., Arbuthnott, G.W., 1998. Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Neurosci.* 18, 4732–4743.
- Ingham, C.A., Hood, S.H., Van Maldegem, B., Weenink, A., Arbuthnott, G.W., 1993. Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Exp Brain Res* 93, 17–27.
- Ito, K., Haga, T., Lamah, J., Sadée, W., 1999. Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur. J. Biochem.* 260, 112–119.
- Iversen, S.D., Iversen, L.L., 2007. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188–193.
- Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K., Haga, T., 1999. Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur. J. Biochem.* 263, 596–602.
- Jomphe, C., Lemelin, P.-L., Okano, H., Kobayashi, K., Trudeau, L.-E., 2006. Bidirectional regulation of dopamine D2 and neurotensin NTS1 receptors in dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2789–2800.

- Kabbani, N., Jeromin, A., Levenson, R., 2004. Dynamin-2 associates with the dopamine receptor signalplex and regulates internalization of activated D2 receptors. *Cell. Signal.* 16, 497–503.
- Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P., Levenson, R., 2002. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J. Neurosci.* 22, 8476–8486.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H., 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360–368.
- Katz, B., Miledi, R., 1965. Release of acetylcholine from a nerve terminal by electric pulses of variable strength and duration. *Nature* 207, 1097–1098.
- Kebabian, J.W., Calne, D.B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93–96.
- Kebabian, J.W., Greengard, P., 1971. Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science* 174, 1346–1349.
- Kebabian, J.W., Petzold, G.L., Greengard, P., 1972. Dopamine-sensitive adenylyl cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the “dopamine receptor”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2145–2149.
- Khan, Z.U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., De la Calle, A., Goldman-Rakic, P.S., 1998. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7731–7736.
- Kim, K.M., Nakajima, Y., Nakajima, S., 1995. G protein-coupled inward rectifier modulated by dopamine agonists in cultured substantia nigra neurons. *Neuroscience* 69, 1145–1158.
- Kim, K.M., Valenzano, K.J., Robinson, S.R., Yao, W.D., Barak, L.S., Caron, M.G., 2001. Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* 276, 37409–37414.
- Kinkead, B., Nemeroff, C.B., 2002. Neurotensin: an endogenous antipsychotic? *Curr Opin Pharmacol* 2, 99–103.
- Kisilevsky, A.E., Mulligan, S.J., Altier, C., Iftinca, M.C., Varela, D., Tai, C., Chen, L., Hameed, S., Hamid, J., Macvicar, B.A., Zamponi, G.W., 2008. D1 receptors

physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron* 58, 557–570.

Kislauskis, E., Bullock, B., McNeil, S., Dobner, P.R., 1988. The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J. Biol. Chem.* 263, 4963–4968.

Kitabgi, P., 2006. Functional domains of the subtype 1 neurotensin receptor (NTS1). *Peptides* 27, 2461–2468.

Kozorovitskiy, Y., Saunders, A., Johnson, C.A., Lowell, B.B., Sabatini, B.L., 2012. Recurrent network activity drives striatal synaptogenesis. *Nature* 485, 646–650.

Kuzhikandathil, E.V., Yu, W., Oxford, G.S., 1998. Human dopamine D3 and D2L receptors couple to inward rectifier potassium channels in mammalian cell lines. *Mol. Cell. Neurosci.* 12, 390–402.

Lacey, M.G., Mercuri, N.B., North, R.A., 1987. Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J. Physiol. (Lond.)* 392, 397–416.

Lan, H., Liu, Y., Bell, M.I., Gurevich, V.V., Neve, K.A., 2009a. A dopamine D2 receptor mutant capable of G protein-mediated signaling but deficient in arrestin binding. *Mol. Pharmacol.* 75, 113–123.

Lan, H., Teeter, M.M., Gurevich, V.V., Neve, K.A., 2009b. An intracellular loop 2 amino acid residue determines differential binding of arrestin to the dopamine D2 and D3 receptors. *Mol. Pharmacol.* 75, 19–26.

Langley, J.N., 1905. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J. Physiol. (Lond.)* 33, 374–413.

Larson, E.R., Ariano, M.A., 1994. Dopamine receptor binding on identified striatonigral neurons. *Neurosci. Lett.* 172, 101–106.

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.
- Le Moine, C., Normand, E., Bloch, B., 1991. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4205–4209.
- Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lança, A.J., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2004. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* 279, 35671–35678.
- Lester, J., Fink, S., Aronin, N., DiFiglia, M., 1993. Colocalization of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in striatal neurons. *Brain Research* 621, 106–110.
- Li, X.M., Hedlund, P.B., Fuxe, K., 1994. Strong effects of NT/NN peptides on DA D2 receptors in rat neostriatal sections. *Neuroreport* 5, 1621–1624.
- Li, Z., Boules, M., Williams, K., Peris, J., Richelson, E., 2010. The novel neurotensin analog NT69L blocks phencyclidine (PCP)-induced increases in locomotor activity and PCP-induced increases in monoamine and amino acids levels in the medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 1311, 28–36.
- Liang, Y., Boules, M., Li, Z., Williams, K., Miura, T., Oliveros, A., Richelson, E., 2010. Hyperactivity of the dopaminergic system in NTS1 and NTS2 null mice. *Neuropharmacology* 58, 1199–1205.
- Lindfors, N., Ungerstedt, U., 1990. Bilateral regulation of glutamate tissue and extracellular levels in caudate-putamen by midbrain dopamine neurons. *Neurosci. Lett.* 115, 248–252.
- Lindgren, N., Usiello, A., Goiny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., Hokfelt, T., Borrelli, E., Fisone, G., 2003. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4305–4309.
- Lisman, J., Schulman, H., Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190.

- Liu, Y.F., Civelli, O., Grandy, D.K., Albert, P.R., 1992. Differential sensitivity of the short and long human dopamine D2 receptor subtypes to protein kinase C. *J. Neurochem.* 59, 2311–2317.
- Malenka, R.C., Bear, M.F., 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21.
- 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.
- 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.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H., 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766.
- Mazella, J., Vincent, J.-P., 2006. Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides* 27, 2469–2475.
- Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P., Vincent, J.P., 1998. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 26273–26276.
- McAfee, D.A., Schorderet, M., Greengard, P., 1971. Adenosine 3',5'-monophosphate in nervous tissue: increase associated with synaptic transmission. *Science* 171, 1156–1158.
- McKinney, R.A., 2010. Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 107–116.
- McKinney, R.A., Lüthi, A., Bandtlow, C.E., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1999. Selective glutamate receptor antagonists can induce or prevent axonal sprouting in rat hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11631–11636.
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Healy, D.J., Kuehn, R., Zhou, Q.Y., Bunzow, J.R., Akil, H., Civelli, O., Watson, S.J., Jr, 1991. Comparison of the distributions of D1

- and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5, 231–242.
- Mechanic, J.A., Sutton, J.E., Berson, A.E., Wu, X., Kwan, J., Schreiber, R., Pang, Z., Button, D.C., 2009. Involvement of the neurotensin receptor 1 in the behavioral effects of two neurotensin agonists, NT-2 and NT69L: lack of hypothermic, antinociceptive and antipsychotic actions in receptor knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 19, 466–475.
- Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Dal Bo, G., Bourdeau, M.L., Danik, M., Williams, S., Lacaille, J.-C., Trudeau, L.-E., 2008. Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J. Neurosci.* 28, 6309–6318.
- Mink, J.W., 1996. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.* 50, 381–425.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225.
- Molinoff, P.B., Axelrod, J., 1971. Biochemistry of catecholamines. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 465–500.
- Monsma, F.J., Jr, Mahan, L.C., McVittie, L.D., Gerfen, C.R., Sibley, D.R., 1990. Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6723–6727.
- Monsma, F.J., Jr, McVittie, L.D., Gerfen, C.R., Mahan, L.C., Sibley, D.R., 1989. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342, 926–929.
- Montagu, K.A., 1957. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180, 244–245.
- Morris, S.J., Van-Ham, I.I., Daigle, M., Robillard, L., Sajedi, N., Albert, P.R., 2007. Differential desensitization of dopamine D2 receptor isoforms by protein kinase C: the importance of receptor phosphorylation and pseudosubstrate sites. *Eur. J. Pharmacol.* 577, 44–53.

- Moss, J., Bolam, J.P., 2008. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J. Neurosci.* 28, 11221–11230.
- Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S., 1964. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239, 2910–2917.
- Namkung, Y., Dipace, C., Javitch, J.A., Sibley, D.R., 2009a. G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation regulates post-endocytic trafficking of the D2 dopamine receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 15038–15051.
- Namkung, Y., Dipace, C., Urizar, E., Javitch, J.A., Sibley, D.R., 2009b. G protein-coupled receptor kinase-2 constitutively regulates D2 dopamine receptor expression and signaling independently of receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284, 34103–34115.
- Namkung, Y., Sibley, D.R., 2004. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 49533–49541.
- Neely, M.D., Schmidt, D.E., Deutch, A.Y., 2007. Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 149, 457–464.
- Nemeroff, C.B., 2001. New perspectives on the neurobiology of schizophrenia and the role of atypical antipsychotics: introduction. *Biol. Psychiatry* 50, 823–824.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Widerlov, E., Beckmann, H., Gerner, R., Manberg, P.J., Lindstrom, L., Prange, A.J., Jr, Gattaz, W.F., 1989. Neurotensin-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, depression, anorexia nervosa-bulimia, and premenstrual syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1, 16–20.
- Nicot, A., Rostène, W., Béro, A., 1995. Differential expression of neurotensin receptor mRNA in the dopaminergic cell groups of the rat diencephalon and mesencephalon. *J. Neurosci. Res.* 40, 667–674.

- Nimitvilai, S., Arora, D.S., Brodie, M.S., 2012a. Reversal of dopamine inhibition of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area is mediated by protein kinase C. *Neuropsychopharmacology* 37, 543–556.
- Nimitvilai, S., McElvain, M.A., Arora, D.S., Brodie, M.S., 2012b. Reversal of quinpirole inhibition of ventral tegmental area neurons is linked to the phosphatidylinositol system and is induced by agonists linked to Gq. *J. Neurophysiol.* 108, 263–274.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., Barak, L.S., 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 17201–17210.
- Olson, P.A., Tkatch, T., Hernandez-Lopez, S., Ulrich, S., Ilijic, E., Mugnaini, E., Zhang, H., Bezprozvanny, I., Surmeier, D.J., 2005. G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels is dependent on a Shank-binding domain. *J. Neurosci.* 25, 1050–1062.
- Onali, P., Schwartz, J.P., Costa, E., 1981. Dopaminergic modulation of adenylate cyclase stimulation by vasoactive intestinal peptide in anterior pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6531–6534.
- Panayi, F., Colussi-Mas, J., Lambás-Señas, L., Renaud, B., Scarna, H., Béro, A., 2005. Endogenous neurotensin in the ventral tegmental area contributes to amphetamine behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology* 30, 871–879.
- Panayi, F., Dorso, E., Lambás-Señas, L., Renaud, B., Scarna, H., Béro, A., 2002. Chronic blockade of neurotensin receptors strongly reduces sensitized, but not acute, behavioral response to D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 26, 64–74.
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 16, 787–794.

- Penrod, R.D., Kourrich, S., Kearney, E., Thomas, M.J., Lanier, L.M., 2011. An embryonic culture system for the investigation of striatal medium spiny neuron dendritic spine development and plasticity. *J. Neurosci. Methods* 200, 1–13.
- Perreault, M.L., Hasbi, A., Alijaniam, M., Fan, T., Varghese, G., Fletcher, P.J., Seeman, P., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2010. The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *J. Biol. Chem.* 285, 36625–36634.
- Perrone-Capano, C., Di Porzio, U., 2000. Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 679–687.
- Picconi, B., Centonze, D., Håkansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M.A., Calabresi, P., 2003. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Neurosci.* 6, 501–506.
- Raju, D.V., Ahern, T.H., Shah, D.J., Wright, T.M., Standaert, D.G., Hall, R.A., Smith, Y., 2008. Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1647–1658.
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2007. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 654–659.
- Redgrave, P., Prescott, T.J., Gurney, K., 1999. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89, 1009–1023.
- Remaury, A., Vita, N., Gendreau, S., Jung, M., Arnone, M., Poncelet, M., Culouscou, J.-M., Le Fur, G., Soubrié, P., Caput, D., Shire, D., Kopf, M., Ferrara, P., 2002. Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res.* 953, 63–72.

- Rex, E.B., Rankin, M.L., Ariano, M.A., Sibley, D.R., 2008. Ethanol regulation of D(1) dopamine receptor signaling is mediated by protein kinase C in an isozyme-specific manner. *Neuropsychopharmacology* 33, 2900–2911.
- Rex, E.B., Rankin, M.L., Yang, Y., Lu, Q., Gerfen, C.R., Jose, P.A., Sibley, D.R., 2010. Identification of RanBP 9/10 as interacting partners for protein kinase C (PKC) gamma/delta and the D1 dopamine receptor: regulation of PKC-mediated receptor phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 78, 69–80.
- Rivera, A., Alberti, I., Martín, A.B., Narváez, J.A., De la Calle, A., Moratalla, R., 2002. Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2049–2058.
- Rompré, P., Perron, S., 2000. Evidence for a role of endogenous neurotensin in the initiation of amphetamine sensitization. *Neuropharmacology* 39, 1880–1892.
- Rompré, P.P., 1997. Repeated activation of neurotensin receptors sensitizes to the stimulant effect of amphetamine. *Eur. J. Pharmacol.* 328, 131–134.
- Salamone, J.D., Correa, M., Mingote, S.M., Weber, S.M., 2005. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol* 5, 34–41.
- Salgado, H., Tecuapetla, F., Perez-Rosello, T., Perez-Burgos, A., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., 2005. A reconfiguration of CaV2 Ca²⁺ channel current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 3771–3787.
- 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.
- Sarret, P., Esdaile, M.J., Perron, A., Martinez, J., Stroh, T., Beaudet, A., 2005. Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J. Neurosci.* 25, 8188–8196.
- Schmitz, Y., Luccarelli, J., Kim, M., Wang, M., Sulzer, D., 2009. Glutamate controls growth rate and branching of dopaminergic axons. *J. Neurosci.* 29, 11973–11981.

- Segal, M., Greenberger, V., Korkotian, E., 2003. Formation of dendritic spines in cultured striatal neurons depends on excitatory afferent activity. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2573–2585.
- Seroogy, K., Ceccatelli, S., Schalling, M., Hökfelt, T., Frey, P., Walsh, J., Dockray, G., Brown, J., Buchan, A., Goldstein, M., 1988. A subpopulation of dopaminergic neurons in rat ventral mesencephalon contains both neurotensin and cholecystokinin. *Brain Res.* 455, 88–98.
- Sharma, R.P., Janicak, P.G., Bissette, G., Nemeroff, C.B., 1997. CSF neurotensin concentrations and antipsychotic treatment in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 154, 1019–1021.
- Sharpe, N.A., Tepper, J.M., 1998. Postnatal development of excitatory synaptic input to the rat neostriatum: an electron microscopic study. *Neuroscience* 84, 1163–1175.
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321, 848–851.
- 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.
- Shi, W.S., Bunney, B.S., 1990. Neurotensin attenuates dopamine D2 agonist quinpirole-induced inhibition of midbrain dopamine neurons. *Neuropharmacology* 29, 1095–1097.
- 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.
- Skinbjerg, M., Ariano, M.A., Thorsell, A., Heilig, M., Halldin, C., Innis, R.B., Sibley, D.R., 2009. Arrestin3 mediates D(2) dopamine receptor internalization. *Synapse* 63, 621–624.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P., 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86, 353–387.

- Smith, Y., Raju, D., Nanda, B., Pare, J.-F., Galvan, A., Wichmann, T., 2009a. The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Res. Bull.* 78, 60–68.
- Smith, Y., Raju, D.V., Pare, J.-F., Sidibe, M., 2004. The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci.* 27, 520–527.
- Smith, Y., Villalba, R.M., Raju, D.V., 2009b. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease: pathological or not? *Parkinsonism Relat. Disord.* 15 Suppl 3, S156–161.
- Snyder, G.L., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Valle, C.G., Huganir, R.L., Nairn, A.C., Greengard, P., 2000. Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor in the neostriatum by dopamine and psychostimulants in vivo. *J. Neurosci.* 20, 4480–4488.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L., Schwartz, J.C., 1990. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146–151.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. *J. Comp. Neurol.* 199, 255–276.
- St-Gelais, F., Jomphe, C., Trudeau, L.-E., 2006. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci* 31, 229–245.
- St-Gelais, F., Legault, M., Bourque, M.-J., Rompré, P.-P., Trudeau, L.-E., 2004. Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J. Neurosci.* 24, 2566–2574.
- Stephens, B., Mueller, A.J., Shering, A.F., Hood, S.H., Taggart, P., Arbuthnott, G.W., Bell, J.E., Kilford, L., Kingsbury, A.E., Daniel, S.E., Ingham, C.A., 2005. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132, 741–754.
- Stoof, J.C., Kebabian, J.W., 1984. Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sci.* 35, 2281–2296.

- Stuber, G.D., Hnasko, T.S., Britt, J.P., Edwards, R.H., Bonci, A., 2010. Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J. Neurosci.* 30, 8229–8233.
- Sunahara, R.K., Guan, H.C., O’Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L.G., Ng, G., George, S.R., Torchia, J., Van Tol, H.H., Niznik, H.B., 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350, 614–619.
- Sunahara, R.K., Niznik, H.B., Weiner, D.M., Stormann, T.M., Brann, M.R., Kennedy, J.L., Gelernter, J.E., Rozmahel, R., Yang, Y.L., Israel, Y., 1990. Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347, 80–83.
- Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C., Jr, Nairn, A.C., Greengard, P., 1995. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14, 385–397.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3–18.
- Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W., 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* 30, 228–235.
- Surmeier, D.J., Song, W.J., Yan, Z., 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 6579–6591.
- Swift, J.L., Godin, A.G., Doré, K., Freland, L., Bouchard, N., Nimmo, C., Sergeev, M., De Koninck, Y., Wiseman, P.W., Beaulieu, J.-M., 2011. Quantification of receptor tyrosine kinase transactivation through direct dimerization and surface density measurements in single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7016–7021.
- Tanaka, K., Masu, M., Nakanishi, S., 1990. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4, 847–854.
- Taylor, M.D., De Ceballos, M.L., Rose, S., Chong, P.N., Jenner, P., Marsden, C.D., 1991. Neuropeptide levels in the basal ganglia of aged common marmosets following prolonged treatment with MPTP. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 3, 99–108.

- Taylor, M.D., De Ceballos, M.L., Rose, S., Jenner, P., Marsden, C.D., 1992. Effects of a unilateral 6-hydroxydopamine lesion and prolonged L-3,4-dihydroxyphenylalanine treatment on peptidergic systems in rat basal ganglia. *Eur. J. Pharmacol.* 219, 183–192.
- 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.
- Tepper, J.M., Koós, T., Wilson, C.J., 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27, 662–669.
- Tepper, J.M., Sharpe, N.A., Koós, T.Z., Trent, F., 1998. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev. Neurosci.* 20, 125–145.
- Tian, X., Kai, L., Hockberger, P.E., Wokosin, D.L., Surmeier, D.J., 2010. MEF-2 regulates activity-dependent spine loss in striatopallidal medium spiny neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 94–108.
- Tiberi, M., Jarvie, K.R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J.A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T.L., Freneau, R.T., Jr, Caron, M.G., 1991. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7491–7495.
- Tiberi, M., Nash, S.R., Bertrand, L., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 1996. Differential regulation of dopamine D1A receptor responsiveness by various G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 3771–3778.
- Tinsley, R.B., Bye, C.R., Parish, C.L., Tziotis-Vais, A., George, S., Culvenor, J.G., Li, Q.-X., Masters, C.L., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., 2009. Dopamine D2 receptor knockout mice develop features of Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 66, 472–484.

- Uchida, S., Akaike, N., Nabekura, J., 2000. Dopamine activates inward rectifier K⁺ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology* 39, 191–201.
- Ungerstedt, U., Butcher, L.L., Butcher, S.G., Andén, N.E., Fuxe, K., 1969. Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat. *Brain Res.* 14, 461–471.
- Uziel, 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.
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., Girault, J.-A., 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538–547.
- Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 125–132.
- Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B., Civelli, O., 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350, 610–614.
- Vandenbulcke, F., Nouel, D., Vincent, J.P., Mazella, J., Beaudet, A., 2000. Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 17), 2963–2975.
- Vickery, R.G., Von Zastrow, M., 1999. Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J. Cell Biol.* 144, 31–43.
- Vilchis, C., Bargas, J., Ayala, G.X., Galván, E., Galarraga, E., 2000. Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95, 745–752.
- Villalba, R.M., Lee, H., Smith, Y., 2009. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurol.* 215, 220–227.

- Villalba, R.M., Smith, Y., 2011. Differential structural plasticity of corticostriatal and thalamostriatal axo-spinous synapses in MPTP-treated Parkinsonian monkeys. *J. Comp. Neurol.* 519, 989–1005.
- Vincent, B., Vincent, J.P., Checler, F., 1994. Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *Eur. J. Biochem.* 221, 297–306.
- Vincent, J.P., Mazella, J., Kitabgi, P., 1999. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 302–309.
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B., Groenewegen, H.J., 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25, 857–887.
- Walker, N., Lepee-Logeoux, I., Fournier, J., Betancur, C., Rostene, W., Ferrara, P., Caput, D., 1998. Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57, 193–200.
- 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.
- Weinshank, R.L., Adham, N., Macchi, M., Olsen, M.A., Branchek, T.A., Hartig, P.R., 1991. Molecular cloning and characterization of a high affinity dopamine receptor (D1 beta) and its pseudogene. *J. Biol. Chem.* 266, 22427–22435.
- Werner, P., Hussy, N., Buell, G., Jones, K.A., North, R.A., 1996. D2, D3, and D4 dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 49, 656–661.
- White, F.J., Wang, R.Y., 1984. A10 dopamine neurons: role of autoreceptors in determining firing rate and sensitivity to dopamine agonists. *Life Sci.* 34, 1161–1170.

- Wilson, C.J., Kawaguchi, Y., 1996. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 2397–2410.
- Wong, A.C., Shetreat, M.E., Clarke, J.O., Rayport, S., 1999. D1- and D2-like dopamine receptors are co-localized on the presynaptic varicosities of striatal and nucleus accumbens neurons in vitro. *Neuroscience* 89, 221–233.
- Wu, T., Li, A., Wang, H.L., 1995. Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res.* 683, 242–250.
- Wu, T., Wang, H.L., 1995. Protein kinase C mediates neurotensin inhibition of inwardly rectifying potassium currents in rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neurosci. Lett.* 184, 121–124.
- Wu, Y., Richard, S., Parent, A., 2000. The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci. Res.* 38, 49–62.
- Yan, Z., Song, W.J., Surmeier, J., 1997. D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J. Neurophysiol.* 77, 1003–1015.
- Yan, Z., Surmeier, D.J., 1997. D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* 19, 1115–1126.
- Yin, H.H., Lovinger, D.M., 2006. Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8251–8256.
- Yoshihara, Y., De Roo, M., Muller, D., 2009. Dendritic spine formation and stabilization. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 146–153.
- Young, W.S., 3rd, Bonner, T.I., Brann, M.R., 1986. Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9827–9831.

- Zahm, D.S., Grosu, S., Williams, E.A., Qin, S., Béroud, A., 2001. Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience* 104, 841–851.
- Zaja-Milatovic, S., Milatovic, D., Schantz, A.M., Zhang, J., Montine, K.S., Samii, A., Deutch, A.Y., Montine, T.J., 2005. Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology* 64, 545–547.
- Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G., Ferguson, S.S., 1999. Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* 274, 10999–11006.
- Zhang, Z.-W., Burke, M.W., Calakos, N., Beaulieu, J.-M., Vaucher, E., 2010. Confocal Analysis of Cholinergic and Dopaminergic Inputs onto Pyramidal Cells in the Prefrontal Cortex of Rodents. *Front Neuroanat* 4, 21.
- Zhou, Q.Y., Grandy, D.K., Thambi, L., Kushner, J.A., Van Tol, H.H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R., Civelli, O., 1990. Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 347, 76–80.

[Tapez ici le titre de l'annexe]