

Université de Montréal

**Modulation de l'expression du transporteur vésiculaire
du glutamate :
Implication dans la plasticité des neurones
dopaminergiques.**

par

Grégory Dal Bo

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

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

Février, 2009

© Grégory Dal Bo, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Modulation de l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate : Implication dans la
plasticité des neurones dopaminergiques.

présentée par :
Grégory Dal Bo

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Claude Lacaille, président-rapporteur
Louis-Éric Trudeau, directeur de recherche
Nicole Leclerc, membre du jury
Salah El Mestikawi, examinateur externe
Adriana Di Polo, représentant du doyen de la FES

RESUME

De nombreuses études ont établi que la majorité des neurones libèrent plus qu'une substance chimique. Il est bien connu que les neurones peuvent co-exprimer et co-libérer des neuropeptides en plus de leur neurotransmetteur, mais des évidences de la co-libération de deux petits neurotransmetteurs à action rapide se sont accumulées récemment.

Des enregistrements électrophysiologiques ont aussi montré que des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques isolés peuvent libérer du glutamate quand ils sont placés en culture. De plus, la présence de glutamate et de glutaminase a été détectée dans des neurones sérotoninergiques, dopaminergiques et noradrénergiques par immunomarquage sur des tranches de cerveau. Malheureusement, en considérant le rôle métabolique du glutamate, sa détection immunologique n'est pas suffisante pour assurer le phénotype glutamatergique d'un neurone.

Récemment, la découverte de trois transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3) a grandement facilité l'identification des neurones glutamatergiques. Ces transporteurs sont nécessaires pour la libération de glutamate et constituent les premiers marqueurs morphologiques du phénotype glutamatergique. Il a été démontré que des neurones noradrénergiques expriment VGLUT2 et que des neurones sérotoninergiques expriment VGLUT3. Mais aucune évidence d'expression d'un des sous-types de VGLUT n'a été reportée pour les neurones dopaminergiques.

Le but de notre travail était d'identifier quel sous-type de VGLUT est exprimé par les neurones dopaminergiques mésencéphaliques, et de déterminer si le phénotype glutamatergique de ces neurones peut être modulé dans des conditions particulières.

Premièrement, nous avons utilisé des microcultures pour isoler les neurones dopaminergiques et des doubles marquages immunocytochimiques pour observer l'expression de VGLUT dans les neurones positifs pour la tyrosine hydroxylase (TH). Nous avons montré que la majorité (80%) des neurones TH⁺ isolés exprime spécifiquement VGLUT2. Cette expression est précoce au cours du développement in vitro et limitée aux

projections axonales des neurones dopaminergiques. Toutefois, cette forte expression *in vitro* contraste avec la non-détection de ce transporteur dans les rats adultes *in vivo*.

Nous avons décidé ensuite de regarder si l'expression de VGLUT2 pouvait être régulée pendant le développement cérébral de jeunes rats et sous des conditions traumatiques, par double hybridation *in situ*. Entre 14 et 16 jours embryonnaires, les marquages de VGLUT2 et de TH montraient une superposition significative qui n'était pas retrouvée à des stades ultérieurs. Dans le mésencéphale de jeunes rats postnatals, nous avons détecté l'ARNm de VGLUT2 dans environ 1-2% des neurones exprimant l'ARNm de TH dans la substance noire et l'aire tegmentaire ventrale (ATV). Pour explorer la régulation de l'expression de VGLUT2 dans des conditions traumatiques, nous avons utilisé la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) pour léser les neurones dopaminergiques dans les jeunes rats. Dix jours après la chirurgie, nous avons trouvé que 27% des neurones dopaminergiques survivants dans l'ATV exprimaient l'ARNm de VGLUT2 dans les rats 6-OHDA.

Finalement, nous avons observé la colocalisation de la protéine VGLUT2 dans les terminaisons TH positives par microscopie électronique. Dans les rats normaux, la protéine VGLUT2 est retrouvée dans 28% des terminaisons axonales TH dans le noyau accumbens. Dans les rats lésés à la 6-OHDA, nous avons observé une diminution considérable des terminaisons TH positives, et une augmentation dans la proportion (37%) des terminaisons dopaminergiques présentant du VGLUT2.

Nos résultats suggèrent que le phénotype glutamatergique des neurones dopaminergiques est régulé au cours du développement, peut être réactivé dans des états pathologiques, et que ces neurones peuvent libérer du glutamate dans conditions spécifiques.

Mots Clés : dopamine, mésencéphale, ATV, glutamate, VGLUT2, Parkinson, 6-OHDA.

ABSTRACT

Numerous studies have established that the majority of neurons release more than one neurotransmitter. It is well known that neurons can co-express and co-release neuropeptides in addition to their neurotransmitter, but evidence of co-release of two small and fast-acting neurotransmitters has been accumulated recently.

Electrophysiological recordings have also shown that isolated serotonin and dopamine neurons can release glutamate as a co-transmitter when they are placed in culture. Furthermore, the presence of glutamate and glutaminase has been detected in serotonin, dopamine and noradrenaline neurons by immunolabelling in brain slices. Unfortunately, considering the metabolic role of glutamate, its immunodetection is not sufficient to assert the glutamatergic phenotype of a neuron.

Recently, the discovery of three vesicular glutamate transporters (VGLUT1-3) has greatly facilitated the identification of glutamate neurons. These transporters are necessary for the glutamate release by neurons and constitute the first molecular markers of a glutamatergic phenotype. Interestingly, it was demonstrated that some noradrenaline neurons express VGLUT2 and that some serotonin neurons express VGLUT3. But no evidence for expression of any VGLUT subtypes was initially reported for dopamine neurons.

The goal of our work was to identify which VGLUT subtype is expressed by mesencephalic dopamine neurons, and to determine if the glutamatergic phenotype of these neurons can be modulated under specific conditions.

First, we used microcultures to isolate dopamine neurons and double immunocytochemistry to visualize VGLUT expression in tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons. We showed that the majority (80%) of isolated TH⁺ neurons express specifically VGLUT2. This expression occurred early during *in vitro* development and was limited to axonal projections of dopamine neurons. However, this strong expression *in vitro* contrasted with the lack of detection of this transporter in adult rats *in vivo*.

We next decided to investigate if VGLUT2 expression could be regulated during brain development of young rats and under traumatic conditions, using double *in situ* hybridization. At embryonic days 14 to 16, VGLUT2 and TH labelling displayed significant overlap which was no longer found at later stages. In postnatal mesencephalon of young rats, we detected VGLUT2 mRNA in approximately 1-2% of neurons expressing TH mRNA in the substantia nigra and in ventral tegmental area (VTA). To explore the regulation of VGLUT2 expression under traumatic condition, we used 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to damage dopamine neurons in young rats. Ten days post-surgery, we found that 27% of surviving dopamine neurons in the VTA expressed VGLUT2 mRNA in 6-OHDA animals.

Finally, we observed the colocalisation of VGLUT2 protein in TH positive terminals by electron microscopy. In normal rats, VGLUT2 protein was found in 28% of TH positive axon terminals in nucleus accumbens. In 6-OHDA-lesioned rats, we observed a considerable reduction of TH positive terminals, and an increase in the proportion (37%) of dopamine terminals displaying VGLUT2.

Our results suggest that the glutamatergic phenotype of dopamine neurons is developmentally regulated, can be reactivated under pathological states, and that these neurons are able to release glutamate under specific conditions.

Keys Words: dopamine, mesencephalon, VTA, glutamate, VGLUT2, Parkinson, 6-OHDA.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des figures.....	x
Liste des abbréviations.....	xi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
PARTIE I : LE SYSTÈME DOPAMINERGIQUE.....	2
1.1. La dopamine.....	2
1.2. Anatomie du système dopaminergique.....	5
1.2.1. Projections dopaminergiques.....	7
1.2.2. Transmission synaptique-asympatique.....	10
1.3. Récepteurs dopaminergiques.....	11
1.3.1 Famille D1.....	12
1.3.2 Famille D2.....	14
1.4. Pathologies associées au système dopaminergique.....	17
1.4.1. La Maladie de Parkinson.....	17
1.4.2. La Schizophrénie.....	24
1.4.3. Dépendance aux drogues d'abus.....	27
PARTIE 2 : CO-LIBERATION.....	29
2.1. Présence de neuropeptides dans les neurones.....	29
2.2. Présence de deux neurotransmetteurs classiques.....	30
2.3. Changement de phénotype observé dans certains neurones.....	33
PARTIE 3 : LE GLUTAMATE.....	35
3.1. Généralités.....	35
3.1.1. Synthèse du glutamate.....	35
3.1.2. Récepteurs glutamatergiques.....	37
3.1.3. Localisation des neurones glutamatergiques dans le SNC et limites de l'identification.....	42

3.2. Transporteurs vésiculaires du glutamate.....	43
3.2.1. Découverte	43
3.2.2. Localisation des transporteurs.....	44
3.2.3. Régulation des VGLUTs.....	47
PARTIE 4 : EXPRESSION DES VGLUTs DANS LES NEURONES MONOAMINERGIQUES	49
4.1. Présence de glutamate dans les neurones monoaminergiques	49
4.2. Colocalisation de VGLUTs dans les neurones monoaminergiques.....	50
PARTIE 5 : PROBLÉMATIQUE ET LIEN AVEC NOTRE SUJET D'ETUDE.....	52
 CHAPITRE 2 : RESULTATS	54
Contribution des co-auteurs	55
1 ARTICLE 1	57
2 ARTICLE 2.....	86
3 Résultats supplémentaires	128
3.1 Rôle de l'expression de VGLUT2 dans la survie des neurones dopaminergiques	128
3.2 Effet d'un traitement visant à augmenter la survie des neurones dopaminergiques de rats dans des cultures de microgouttes.....	129
3.3 Effet d'un traitement visant à augmenter la mort des neurones dopaminergiques de souris dans des cultures standard.....	133
 CHAPITRE 3 : DISCUSSION	139
PARTIE 1 : Régulation de l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques	140
1.1 Expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques en culture	140
1.2 Expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques de rats témoins....	144

1.3 Modulation de l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques de rats lésés	149
1.4 Expression de VGLUT2 dans les terminaisons axonales des neurones dopaminergiques	152
PARTIE 2 : Effets du glutamate et de la dopamine au cours du développement : plasticité fonctionnelle.....	157
PARTIE 3 : Modulation de l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques : plasticité du phénotype.....	160
PARTIE 4 : Perspectives et Conclusion	164
BIBLIOGRAPHIE	167

Liste des tableaux

Table 1	Number and proportion of VTA and SN neurons co-expressing TH- and VGLUT2 mRNA in postnatal control rats	116
Table 2	Number and proportion of VTA and SN neurons co-expressing TH- and VGLUT2 mRNA in sham and 6-OHDA lesioned rats	117
Table 3	Number of TH, VGLUT2, and TH/VGLUT2 immunopositive axon terminals in the nAcb of 15 day-old normal versus 6-OHDA lesioned rats	118

Liste des figures

Figure 1	Schéma de la synthèse des cathécolamines	4
Figure 2	Représentation schématique des principales projections dopaminergiques mésencéphaliques	8
Figure 3	Représentation schématique des récepteurs des familles D1 et D2	11
Figure 4	Représentation schématique du système d'action des toxines MPTP et 6-OHDA au niveau des terminaisons dopaminergiques	21
Figure 5	Représentation schématique de la synthèse du glutamate au niveau des terminaisons axonales	36
Figure 6	Photos comparatives de la distribution des ARNm VGLUT1 et VGLUT2 dans le cerveau de rats adultes	45
Figure 7	Photos de l'immunoréactivité de VGLUT1 et VGLUT2 dans le cerveau de rats adultes	46
A1 Figure 1	Expression of VGLUT2 by isolated DA neurons in culture.	78
A1 Figure 2	Dopamine neurons in culture do not express VGLUT1 or VGLUT3	80
A1 Figure 3	Mesencephalic GABA neurons do not express vesicular glutamate transporters	81
A1 Figure 4	Detection of VGLUT2 mRNA in DA neurons by single-cell RT-mPCR	82
A1 Figure 5	Expression of VGLUT2 in a subset of nerve terminals established by DA neurons.	84

A2 Supp Figure 1	Distribution of VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 mRNA labeling in P15 rats	119
A2 Figure 1	Selectivity and evaluation of co-expression of TH and VGLUT2 mRNA in prenatal ventral mesencephalon	120
A2 Figure 2	Co-expression of TH and VGLUT2 mRNA in RLi, VTA or SNc neurons of 15 day-old normal rats	122
A 2Figure 3	Effect of the neonatal 6-OHDA lesion on TH and VGLUT2 mRNA levels in the ventral mesencephalon of 15 day-old rats	123
A2 Figure 4	Co-expression of TH and VGLUT2 mRNA in VTA neurons of 15 day-old sham control (A) or 6-OHDA-lesioned (B) rats	125
A2 Figure 5	Electron microscopic visualization of singly (TH or VGLUT2) and doubly (TH/VGLUT2) immunopositive axon terminals (varicosities) in the nAcb of normal (A-C) or 6-OHDA-lesioned (D-F) 15-day old rats	126
Figure 8	Effet de la vératridine sur la survie des neurones dopaminergiques en culture	130
Figure 9	Effet de la vératridine sur l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques isolés en culture	132
Figure 10	Détermination de la concentration de MPTP à utiliser pour entraîner la mort de 50% des neurones dopaminergiques en culture	135
Figure 11	Effet du MPTP sur la survie des neurones dopaminergiques et GABAergiques en culture	136
Figure 12	Effet du MPTP sur l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques en culture	137

Liste des abbréviations

3-MT :	3-méthoxytyramine
5-HT:	Sérotonine
6-OHDA:	6-hydroxydopamine
Ach :	Acétylcholine
AMPA :	Amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
AP5 :	2-amino-5-phosphovalérate
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATP :	Adénosine triphosphate
ATV :	Aire tegmentaire ventrale
BDNF:	Brain-derived neurotrophic factor
BNPI :	Brain specific Na ⁺ -dependant inorganic transporter
CCK :	Cholecystokinine
COMT :	Catéchol-O-méthyltransférase
CPF :	Cortex préfrontal
DAT :	Transporteurs de la dopamine
DNPI :	Differentiation-associated Na ⁺ -dependant inorganic phosphate transporter
DOPAC :	3,4-dihydroxyphenylalanine
EAAT :	excitatory amino acid transporter
FACS :	Fluorescent-associated cell sorting
GABA :	acide- γ -aminobutyrique
GAD67 :	Décarboxylase de l'acide glutaminique
GFP :	Green fluorescent protein
HVA :	Acide homovanillique
IPSC :	Courants post-synaptiques inhibiteurs
L-DOPA :	3,4-dihydroxyphenylalanine

LRI :	Noyau linéaire rostral du raphé
MAO :	Mono-amine oxydase
mGluRs :	Récepteurs métabotropes du glutamate
MPP+ :	1-méthyl-4-phenylpyridinium
MPTP :	1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
nAcb :	Noyau accumbens
NGF :	Nerve growth factor
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
PAG :	Glutaminase phospho-activatée
PCP :	Phencyclidine
PKA :	cAMP-dependent protein kinase
PKC :	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
PLT :	Potentialisation à long terme
RT-PCR :	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SN :	Substance noire
SNc :	Substance noire compacte
SNC :	Système nerveux central
STN :	Noyau sous-thalamique
TH :	Tyrosine hydroxylase
TTX :	Térodotoxine
UCH-L1 :	Ubiquitine C-terminale hydrolase-L1
VGLUT :	Transporteur vésiculaires du glutamate
VIAAT :	Transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs
VIP :	Polypeptide vasoactif intestinal
VMAT2 :	Transporteur vésiculaire des monoamines type 2

A mes grands-parents

Remerciements

Tout au long de mon doctorat j'ai reçu un grand soutien et je souhaiterais remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidé dans mes recherches expérimentales ainsi que dans la rédaction de ma thèse. En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr Louis-Éric Trudeau de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir soutenu et poussé tout au long de ma formation. Sa passion et sa rigueur scientifiques ont été une inspiration importante au cours des années passées dans son laboratoire. Je tiens aussi à souligner son écoute et sa disponibilité.

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir révisé mon manuscrit, les Drs Jean-Claude Lacaille, Nicole Leclerc, Salah El Mestikawy et Adriana Di Polo. Je souhaiterais aussi remercier les Drs Daniel Lévesque et Laurent Descarries pour leurs précieux conseils au cours de mon cheminement.

Je remercie les nombreux étudiants et membres de laboratoires avec qui j'ai travaillé au cours de ma formation. Un merci particulier à l'équipe du Dr Daniel Lévesque avec qui j'ai adoré travailler, plus spécialement François Gilbert, Jérôme Maheux et Brigitte Paquet; ainsi qu'à Noémie Bérubé-Carrière et au Dr Mustapha Riad du laboratoire de Laurent Descarries. Une petite dédicace à tous les étudiants que j'ai côtoyés et avec qui j'ai collaboré dans notre laboratoire, et plus personnellement à : Claudia Jomphe, Fannie St-Gelais, Caroline Forget, Caroline Fasano, Damiana Leo, Gabriel Fortin et Valérie Souquières. Merci à vous d'avoir été à mon écoute, et surtout de votre amitié.

Un considérable soutien tout au long des mes années universitaires m'a été donné par des membres de ma familles et des amis extérieurs : mes parents, ma sœur, mes grands-parents, Daniel Matton, Laurent Bouyer, Annie Castonguay et Thomas Berger. Je ne saurai comment vous remercier à votre juste valeur. Enfin, je voudrais remercier spécialement Josée Leblanc, qui m'a longuement encouragé, soutenu et supporté.

INTRODUCTION

PARTIE I : LE SYSTÈME DOPAMINERGIQUE

1.1. La dopamine

La dopamine a été découverte au début du 20^{ème} siècle, et pendant longtemps, la dopamine a été pensée n'être que le précurseur de l'adrénaline et de la noradrénaline. C'est beaucoup plus tard, en 1952 que Arvid Carlsson et Nils-Åke Hillarp ont montré que la dopamine était synthétisée à partir de la 3,4-dihydroxyphenylalanine ou L-DOPA, et comme la noradrénaline et l'adrénaline, qu'elle agissait comme neurotransmetteur. La dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline sont toutes les 3 synthétisées à partir d'un précurseur commun la L-tyrosine et font partie des neurotransmetteurs catécholaminergiques. En 1960, Toshiharu Nagatsu a démontré que la tyrosine hydroxylase était l'enzyme limitante qui convertissait la tyrosine en L-DOPA, dont la détection permet l'identification des neurones catécholaminergiques. En effet, l'immunoréactivité contre la tyrosine hydroxylase est la méthode la plus utilisée pour identifier les neurones dopaminergiques dans les régions du cerveau qui ne contiennent pas de neurones adrénergiques ou noradrénergiques (Björklund & Lindvall, 1984). Une autre enzyme, la DOPA-décarboxylase va par la suite transformer la L-DOPA en dopamine, et à partir de la dopamine peuvent ensuite être synthétisées l'adrénaline et la noradrénaline. L'hydroxylation de la dopamine par la dopamine β -hydroxylase produit l'adrénaline qui ensuite peut être transformé en noradrénaline par ajout d'un groupe méthyl par la N-méthyltransferase (Fig.1).

Lorsque la synthèse de la dopamine est complétée, elle est emmagasinée dans des vésicules synaptiques en vue de sa libération par exocytose au niveau des terminaisons axonales suite à une entrée de calcium provoquée par un potentiel d'action. Cette libération synaptique permet d'activer des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques, mais aussi des récepteurs situés sur les terminaisons dopaminergiques, dits autorécepteurs, qui ont une

action régulatrice sur la libération terminale. Une fois dans l'espace extracellulaire, le signal se termine principalement par la re-capture rapide par l'intermédiaire de transporteurs de la dopamine (DAT) également situés sur la membrane de ces neurones. L'élimination par les transporteurs à dopamine est le moyen le plus efficace et le plus rapide (Jaber et al., 1997). Les DAT sont par ailleurs exprimés sur la majorité des neurones à dopamine, et leur nombre influence la durée d'action de la dopamine sur ses récepteurs (Ciliax et al., 1999). La dopamine pourra ensuite être dégradée par la mono-amine oxydase (MAO), qui convertit la dopamine en 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPAC). La DOPAC est ensuite dégradée en acide homovanillique (HVA) dans le milieu extracellulaire grâce à l'action de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT). Enfin, la COMT peut dégrader directement la dopamine extracellulaire en 3-méthoxytyramine (3-MT) (Kirov et al., 1998; Benoit-Marand et al., 2000) .

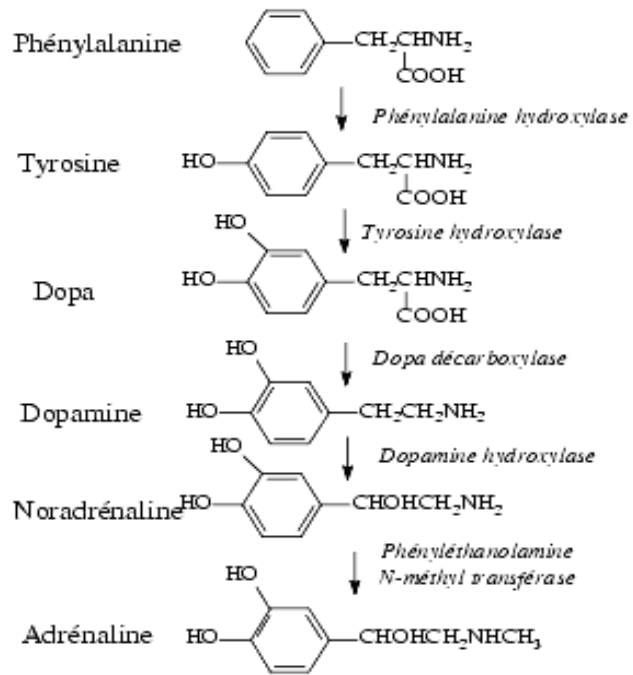


Figure1 : Schéma de la synthèse des cathécolamines, de la tyrosine à la noradrénaline, avec les enzymes de synthèse pour chaque étape (image tirée de <http://www.labrha.com/stress-physiologie.aspx>).

1.2. Anatomie du système dopaminergique

Les neurones dopaminergiques sont retrouvés dans différentes régions du système nerveux central, forment plusieurs noyaux qui projettent dans plusieurs régions du cerveau et sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. En tout on dénombre 10 noyaux dopaminergiques classifiés de A8 à A17 d'après la première nomenclature décrite par Björklund et Lindvall en 1984 sur des cerveaux de rats. Trois groupes, représentant près de 90% du nombre total de neurones dopaminergiques, sont localisés au niveau du mésencéphale. On dénombre près de 600 000 neurones à dopamine dans le mésencéphale de l'humain (Bogerts et al., 1983), et 45000 chez le rat (German & Manaye, 1993). Ces trois groupes forment le noyau rétro-rubral (A8), la substance noire (SN)(A9) et l'aire tegmentaire ventrale (ATV)(A10). Les autres neurones dopaminergiques sont regroupés ailleurs dans le système nerveux, formant 5 noyaux dans le diencéphale incluant A11 (noyau diencéphalique caudal), A12 (noyau arqué), A13 (zona incerta), A14 (noyau periventriculaire rostral) et A15 (noyau de la strie terminale). Les 2 derniers groupes sont localisés dans le tubercule olfactif (A16), et le dernier dans la rétine (A17) (Witkovsky, 2004).

Comme nous l'avons évoqué, la majorité des neurones dopaminergiques sont retrouvés dans deux noyaux mésencéphaliques distincts, l'ATV et la SN. Toutefois, il existe très peu de différences entre les neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SN. Des études immunohistochimiques ont démontré que les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc) peuvent être divisés en deux sous-populations selon l'absence ou la présence de la calbindine, une protéine liant le calcium. Les neurones de la partie dorsale, communément appelée le tiers dorsal, sont riches en calbindine alors que les neurones de la partie ventrale, connue sous le nom de tiers ventral, sont pauvres en calbindine (Gerfen et al., 1987; Yamada et al., 1990). De plus, les pigments de neuromélanine, caractéristiques de la SNc des primates, sont plus abondants dans les neurones du tiers ventral que dans ceux du tiers dorsal (Gibb & Lees, 1991). La partie

dorsale comprend aussi les neurones de l'ATV et une partie de la substance noire, tandis que la partie ventrale ne comprend que les neurones de la SNc. Les neurones retrouvés dans ces 2 régions présentent des caractéristiques différentes: corps cellulaires fusiformes avec une arborisation dendritique limitée, et moins d'expression de tyrosine hydroxylase, moins d'expression de récepteurs D2, une forte expression de mélanine et de calbindine pour ceux de la partie dorsale; contre des corps cellulaires multipolaires avec une arborisation dendritique plus importante, et des niveaux d'expression de récepteurs D2 et de DAT plus importants dans la région ventrale (Fallon & Moore, 1978, Gerfen et al., 1987; Gibb & Lees, 1991; Graybiel et al., 1991; Ciliax et al., 1995).

Il est intéressant de noter que cette organisation ventro-dorsale dans le mésencéphale est inversée au niveau de leurs projections dans le striatum. Les neurones de la partie dorsale vont innover principalement les régions ventrales, dont le noyau accumbens, alors que ceux de la partie ventrale projettent principalement au striatum dorsal (Gerfen et al., 1987). Il existe aussi une différence dans leur implication fonctionnelle : les neurones de la partie dorsale jouent un rôle plus important dans le système limbique, tandis que ceux de la partie ventrale ont une implication plus importante dans le contrôle moteur. Au niveau des maladies des différences sont aussi notées. Par exemple, les neurones de la partie ventrale sont beaucoup plus vulnérables que les neurones de la partie dorsale lors de certaines maladies neurodégénératives, telle la maladie de Parkinson (Yamada et al., 1990; Lavoie & Parent, 1991; Hirsch et al., 1992; Gibb & Lees, 1991).

1.2.1. Projections dopaminergiques

Les noyaux dopaminergiques forment trois voies principales : les voies mésostriée, mésolimbique et mésocorticale, et tubéroinfundibulaire (Ungerstedt, 1971). La voie mésostriée est composée principalement de projections provenant de la substance noire, mais comprend aussi des projections de l'aire tegmentaire ventrale et du noyau rétrobulbar. La partie la plus dorsale correspond à la voie nigrostriée qui projette par le faisceau médian télencéphalique au striatum dorsal (noyau caudé et putamen) et au globus pallidus (Feldman et al., 1997). C'est la voie qui est impliquée dans la régulation motrice, et dont la dégénérescence entraîne la maladie de Parkinson. Le système mésocorticolimbique prend surtout son origine à partir des neurones dopaminergiques de l'ATV qui envoient des projections vers le septum, l'amygdale, l'hippocampe, le noyau olfactif antérieur, et le noyau accumbens (Dalhström & Fuxe, 1964). Cette voie est souvent associée à la schizophrénie et à la dépendance aux drogues d'abus, ainsi que dans certaines fonctions physiologiques telles que la motivation, la cognition, la mémoire et l'apprentissage (Feldman et al., 1997). Enfin le système tubéroinfundibulaire situé près de l'hypothalamus, concerne principalement les neurones dopaminergiques du noyau rétrobulbar qui vont innervier le lobe antérieur et la pars intermedia de l'hypophyse (Björklund & Lindvall, 1984). Ce système régule des fonctions endocriniennes en agissant sur la libération d'hormones par l'adénohypophyse telles que la prolactine. Quatre autres noyaux mésencéphaliques contiennent quelques neurones dopaminergiques, soit le raphé dorsal, les noyaux linéaires rostral et caudal, et la substance grise périaqueducule, qui ont des projections soit locales soient en direction du striatum dorsal (Descarries et al., 1986 ; Hasue & Shammah-Lagnado, 2002 ; Ottersen, 1981).

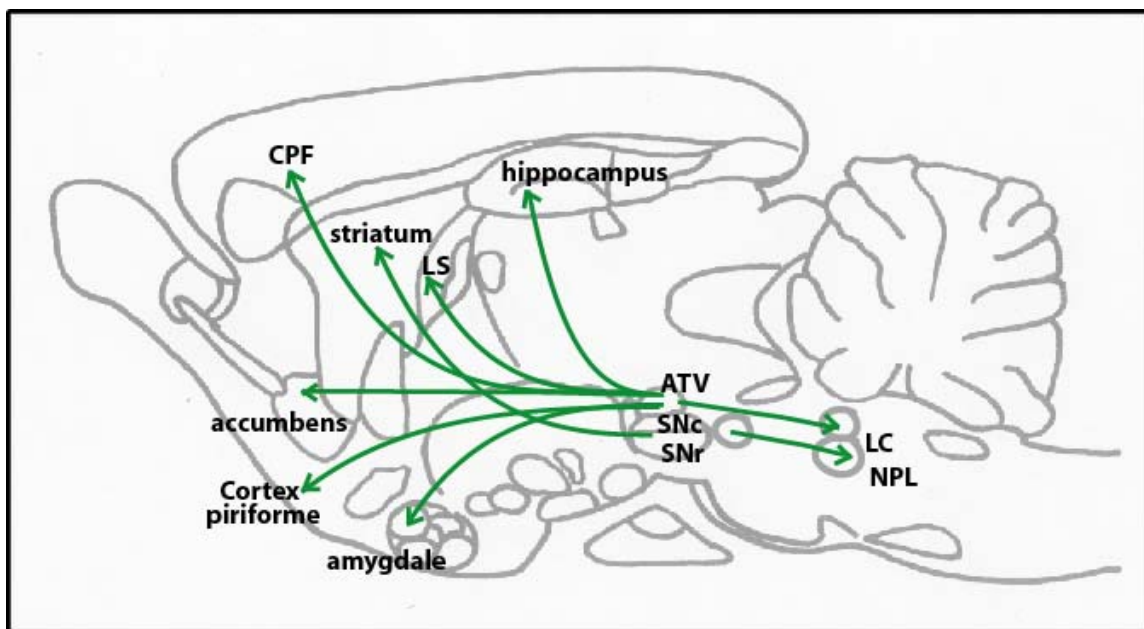


Figure 2 : Représentation schématique des principales projections dopaminergiques mésencéphaliques chez le rat (St-Gelais et al., 2006).

Il est intéressant de noter que les neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SNc sont en relation étroite avec les neurones des structures qu'ils innervent. Comme vu précédemment, les neurones de l'ATV projettent principalement au cortex préfrontal (CPF) (Williams & Goldman-Rakic, 1995), au noyau accumbens (nAcb) (Pinot et al., 1994 ; Pennartz et al., 1994), et innervent plus faiblement l'hippocampe dans la région ventrale CA1/subiculum (Gasbarri et al., 1994; Verney et al., 1982). En retour, le nAcb et le CPF envoient des projections directes dans l'ATV (Thierry et al, 1979). Le nAcb est aussi innervé par l'hippocampe et par le CPF, et projette aussi à la substance noire, l'hypothalamus et globus pallidus (Pennartz et al., 1994). La région ventrale de CA1 et du subiculum qui reçoit les projections dopaminergiques projette au nAcb et au CPF (Carr and Sesack 1996; Goldman-Rakic et al., 1984), ce qui entraîne que l'hippocampe communique indirectement avec les neurones de l'ATV par l'intermédiaire du nAcb (Thierry et al, 1979). Le dérèglement de cette boucle entre l'ATV, le nAcb, le CPF et l'hippocampe, est associé au développement de la schizophrénie (Thierry et al.,1979).

C'est suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc observée dans la maladie de Parkinson, et à la diminution de l'immunoréactivité de la tyrosine hydroxylase dans le striatum qu'a été suggérée l'existence de la voie nigrostriée. Des marquages immunohistochimiques ont confirmé la forte innervation du striatum par les neurones dopaminergiques de la SNc (Dahlstrom & Fuxe, 1964 ; Hokfelt et al., 1984). La voie nigrostriée provient surtout de la SNc et innerve principalement le striatum dorsal (Lavoie et al., 1989). Le striatum est la composante la plus importante des ganglions de la base. Il se divise en noyau caudé et putamen, dont l'ensemble est appelé aussi striatum dorsal. Le striatum ventral est formé par le noyau accumbens et le tubercule olfactif. Ces noyaux font partis des ganglions de la base, et reçoivent des projections de plusieurs régions : du cortex cérébral, de la SNc, de l'ATV, des noyaux intralaminaires thalamiques, et des noyaux raphé dorsal et médian. Les neurones striataux sont principalement GABAergiques, et on retrouve quelques interneurons cholinergiques (Parent et al., 1996). Le striatum projette massivement au noyau globus pallidus, et plus faiblement directement dans la SN (Lévesque et al., 2003). Les neurones de la SNc projettent également à la partie interne du globus pallidus (Lavoie et al., 1989). Les neurones du globus pallidus sont aussi GABAergiques et projettent principalement au striatum, au noyau sous-thalamique, et à la substance noire (Oertel et al., 1984). Enfin, la dernière structure fortement innervée par les neurones de la substance noire est le noyau sous-thalamique (STN). Le STN est une structure qui reçoit une innervation dopaminergique provenant de la SNc et de l'ATV (Hassani et al., 1997). Le STN est constitué en majorité de neurones glutamatergiques qui projettent vers les deux segments du globus pallidus ainsi que vers la SN (Parent et al., 1996). Cette boucle est quant à elle impliquée dans la maladie de Parkinson.

1.2.2. Transmission synaptique-asyntique

La transmission du signal dopaminergique représente un intérêt particulier, puisque la majorité des terminaisons formées par les neurones sont dépourvues de contacts synaptiques, mais se terminent librement, ce qu'on appelle transmission asynaptique. Des observations en microscopie électronique ont montré que, bien que les fibres dopaminergiques nigrostriées forment des contacts synaptiques symétriques sur les cellules striatales (Freund et al., 1984), seulement 25% des terminaisons totales sont synaptiques (Descarries et al., 1996). Les différents sites de projections des neurones dopaminergiques ne présentent pas tous la même prédominance de terminaisons synaptiques. Dans le cortex préfrontal et l'amygdale la transmission asynaptique prédomine par rapport au striatum dorsal et ventral (Garris & Wightman, 1994). L'action de la dopamine suite à sa libération par des terminaisons asynaptiques est plus longue; moins de recapture est observée dans les régions qui présentent une proportion plus élevée de terminaisons libres (Cragg et al., 2001). La dopamine est moins sujette à la recapture par les transporteurs membranaires DAT, et son action sur les récepteurs est donc prolongée (Cragg et al., 2001). Il devrait donc exister dans les régions où les terminaisons asynaptiques prédominent, une quantité de dopamine basale plus élevée (Descarries et al., 1996).

1.3. Récepteurs dopaminergiques

C'est grâce à des études pharmacologiques que les récepteurs de la dopamine ont été identifiés. Sur la base des profils de liaison d'agonistes et d'antagonistes, deux classes de récepteurs D1 et D2 ont été identifiées (Kebabian & Calne, 1979). Les récepteurs dopaminergiques sont exprimés par un grand nombre de neurones différents, GABAergiques, glutamatergiques, sérotoninergiques, cholinergiques et retrouvés dans l'ensemble des régions cibles du cerveau. Ce sont des récepteurs métabotropes à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G (Kebabian & Calne, 1979).

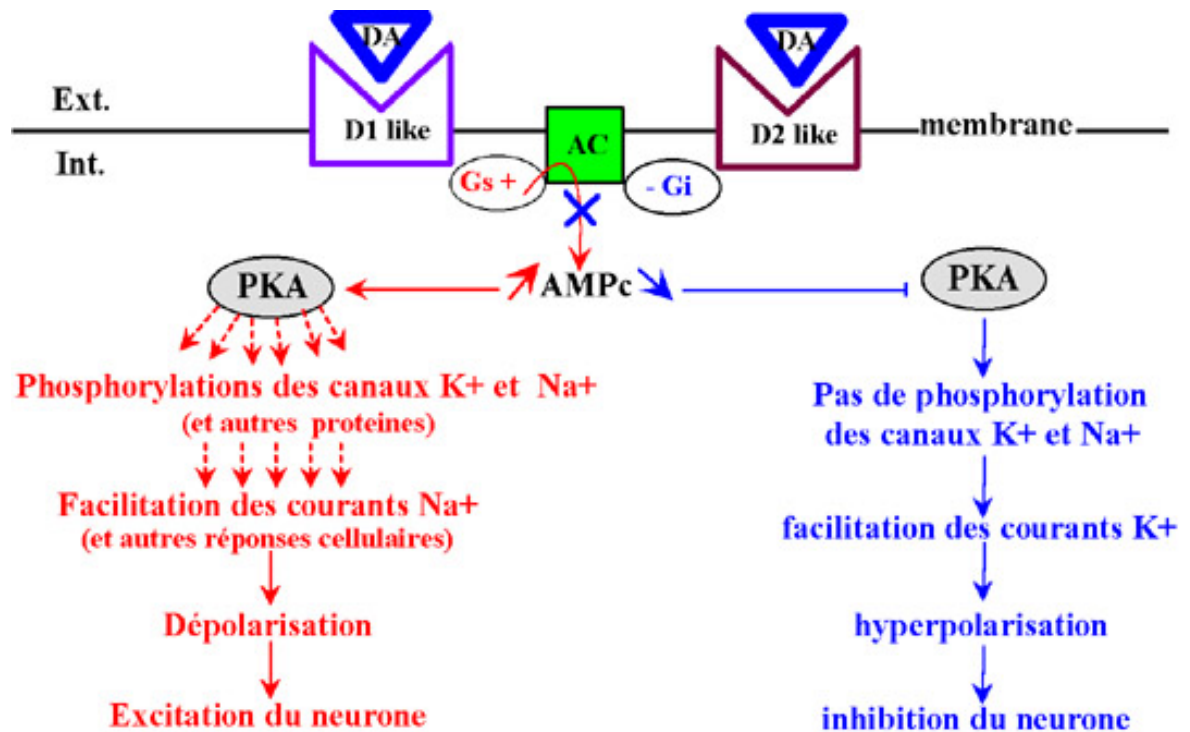


Figure 3 : Représentation schématique des récepteurs des familles D1 et D2 (image tirée de http://schwann.free.fr/mecanismes_mol_dependance.html).

Cinq récepteurs différents sont dénombrés, séparés en deux familles suivant leur couplage avec des protéines G activatrice ou inhibitrice de l'adénylate cyclase. La famille D1 comprend les récepteurs D1 et D5 et entraîne l'activation l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine Gs. La famille D2 comprend les sous-unités D2, D3 et D4 qui sont eux couplées à une protéine Gi/Go et vont donc entraîner une inhibition de la production d'AMPC par l'adénylate cyclase (Kebabian & Calne, 1979). La meilleure façon de discriminer les récepteurs dopaminergiques reste la liaison à des agonistes et antagonistes spécifiques. L'affinité de la dopamine pour les récepteurs de la famille D2 est plus forte que pour les récepteurs de la famille D1. Toutefois pour les distinguer, l'utilisation d'agonistes sélectifs tel que le SKF 38393 pour la famille D1 ou le quinpirole pour la famille D2, ou d'antagonistes tels que le SCH-23390 pour les D1 ou la spipérone pour la famille D2, représente la technique la plus sûre et la plus utilisée.

1.3.1 Famille D1

La distribution des récepteurs D1 dans le système nerveux central a été visualisée par des études d'autoradiographie, marquages radioactifs sur des tranches de cerveaux de rongeurs, à l'aide de [³H]-SCH-23390 (Creese et al., 1983 ; Seeman & Niznik; 1990). Ces techniques ont de plus permis de démontrer que l'affinité du sous-type D5 pour le SCH-23390 est plus forte que celle du au sous-type D1 (Felder et al., 1989). Mais nous nous intéresserons ici principalement au récepteur D1, puisque c'est le récepteur dopaminergique le plus abondant dans le cerveau. Son expression est retrouvée principalement sur un sous-type de neurones GABAergiques du striatum dorsal (noyau caudé et putamen) contenant la substance P et qui projettent en retour à la substance noire (Fremeau et al., 1991; Missale et al., 1998). D'autres régions expriment aussi ces récepteurs, telles que la région CA1 de l'hippocampe, le subiculum, la substance noire réticulée, le noyau supra-chiasmatique (Fremeau et al., 1991; LeMoine et al., 1991; Otmakhova & Lisman , 1996). La distribution des ARNs a été étudiée par Northern blot et hybridation *in situ* démontrant une expression

abondante dans le striatum, le noyau accumbens, le tubercule olfactif, les îlots de Calleja, l'amygdale, l'hypothalamus, le thalamus (Sunahara et al.;1990; Mansour et al., 1991; Weiner et al., 1991; Missale et al., 1998). Il existe une assez bonne corrélation entre l'expression des ARNs et de la protéine des récepteurs D1, dans les cortex pariétaux et frontaux, certaines régions de l'hippocampe et du gyrus dentelé et dans le striatum, et cette répartition suggère une implication de ces récepteurs dans des fonctions motrices, émotionnelles et cognitives (Freneau et al., 1991).

Les récepteurs D1 sont couplés à la protéine Gs qui stimule l'activité de l'adénylate cyclase, et déclenche l'activation de la PKA (Zhou et al., 1990, Dearry et al., 1990). D'autres voies de signalisation peuvent aussi être activées expliquant l'hypothèse de l'hétérogénéité de ces récepteurs (Niznik & Van Tol, 1992). Entre autres, il a été proposé que ce récepteur puisse activer la production d'inositol triphosphate, la PLC, la mobilisation du calcium indépendamment de la voie PKA (Felder et al., 1989).

Au niveau cellulaire, la localisation des récepteurs dans le striatum montre qu'ils sont situés sur les épines dendritiques, mais aussi en plus faibles proportions dans les synapses symétriques et asymétriques (Dumartin et al., 1998). Ces observations sont confirmées dans d'autres structures du cerveau comme la substance noire (Caillé et al., 1996; Levey et al., 1993), et le cortex préfrontal (Muly et al., 1998; Smiley et al., 1994). La quantification indique que plus de 75% du marquage D1 dans le striatum est associé aux dendrites ou aux épines dendritiques (Hersch et al., 1995). De même, dans les afférences corticales du striatum, les récepteurs D1 sont rarement distribués sur les terminaisons axonales et sont beaucoup plus abondants dans les arborisations dendritiques (43%) et les épines dendritiques (38%) (Hersch et al., 1995).

Les récepteurs D1 sont surtout impliqués dans le contrôle des mouvements au niveau du striatum et dans la mémoire de travail dans le cortex. Mais ils participent aussi à de nombreuses fonctions physiologiques cellulaires incluant : une répression de la prolifération (Popolo et al., 2004); une toxicité lors de leur activation chronique (Chen et

al., 2004); un rôle promoteur sur la croissance des neurites des neurones striataux en développement (Iwakura et al., 2008).

1.3.2. Famille D2

Le premier récepteur D2 a été cloné en 1988 chez le rat (Bunzow et al., 1988) et a ensuite été retrouvé dans plusieurs espèces, dont l'humain et la souris (Grandy et al., 1989; Dal Toso et al., 1989). La séquence des récepteurs de la famille D2 possède plusieurs jonctions d'introns et d'exons, qui vont donner 2 isoformes différentes par épissage alternatif, une isoforme courte D2S (415 acides aminés) et une isoforme longue D2L (444 a.a.) (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989). La différence structurale est située dans la 3^{ème} boucle intracellulaire qui est impliquée, entre autre dans le couplage avec les protéines G. Deux autres récepteurs de type D2 ont aussi été clonés chez le rat, le D3 et le D4 (Sokoloff et al., 1990; Van Tol et al., 1991) grâce à leur homologie avec le récepteur D2. L'ensemble des récepteurs de la famille D2 diffèrent quant à leur affinité de liaison à la dopamine, mais aussi par leur distribution dans les neurones (Leysen et al., 1993). Les D2S sont plus souvent exprimés au niveau des terminaisons axonales et joueraient un rôle d'auto-récepteur, tandis que les D2L sont retrouvés sur les dendrites et corps cellulaires en position post-synaptiques (Lindgren et al., 2003).

Les régions qui expriment le plus d'ARNm des récepteurs D2 ont été déterminées dans un premier temps par Northern blot puis par hybridation *in situ* dans les noyaux caudé et putamen, les lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse, la substance noire, le septum, l'amygdale, l'hypothalamus, et le bulbe olfactif, et des niveaux plus faibles dans l'ATV et les corps mamillaires latéraux (Niznik & Van Tol, 1992). La protéine des récepteurs D2 est plus difficile à détecter, mais des expériences de localisation ont été effectuées à l'aide d'un antagoniste radio-marqué, le [³H]-raclopride, hautement sélectif pour les récepteurs D2. Les sites qui expriment fortement le récepteur D2 sont les mêmes que ceux où est retrouvé l'ARNm, soit dans le tubercule olfactif, les noyaux caudé, putamen et accumbens, le globus pallidus, le lobe intermédiaire pituitaire, les noyaux

mamillaires latéraux, la substance noire et l'aire tegmentaire ventrale (Mansour et al., 1990). Les récepteurs D3 et D4 sont moins exprimés que les récepteurs D2, et ils sont retrouvés principalement dans le tubercule olfactif, noyau accumbens, hypothalamus, striatum, et substance noire (Van Tol et al., 1991; Niznick & Van Tol, 1992). Le récepteur D3 est aussi retrouvé dans l'hippocampe, le septum, et le D4 dans le cortex préfrontal (Meador-Woodruff et al., 1991).

Les récepteurs D2 sont couplés avec des protéines $G_{i/o}$, et vont par conséquent diminuer l'activité de l'adénylate cyclase. Toutefois d'autres fonctions régulatrices lui sont imparties. L'application d'un agoniste des récepteurs D2 comme la bromocriptine et le quinpirole active certaines conductances potassiques ce qui entraîne une hyperpolarisation membranaire et une diminution de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques (Rayport et al., 1992). Cette diminution de l'activité des neurones par les récepteurs D2 est suivie d'une baisse de la libération de dopamine. La stimulation prolongée du récepteur D2 par un agoniste peut entraîner l'internalisation du récepteur (Gainetdinov et al., 2004). Le récepteur D2 peut aussi être désensibilisé via le concours d'une phosphorylation par certaines kinases, comme la protéine kinase C (PKC). Cette phosphorylation du récepteur D2 par la PKC induit la désensibilisation et l'internalisation du récepteur via un mécanisme dépendant de la β -arrestine et de la dynamine (Namkung & Sibley, 2004). De plus, le récepteur D2 peut s'associer avec d'autres récepteurs ce qui va modifier leur activité, par exemple des récepteurs de l'adénosine et de la somatostatine (Fuxe et al., 1998; Salim et al., 2000). Sa liaison au récepteur de la somatostatine entraîne une augmentation de l'affinité pour la dopamine (Rocheville et al., 2000).

Au niveau fonctionnel, en plus de leur principale implication dans le contrôle moteur, les récepteurs D2 sont aussi impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Notons entre autres que la stimulation des récepteurs D2 induit la prolifération de cellules précurseurs de neurones hippocampaux (Hiramoto et al., 2007) mais n'a pas d'effet sur la prolifération des neurones dopaminergiques (Milosevic et al., 2007). Enfin, il a été suggéré que la stimulation des récepteurs D2 sur les neurones striataux peut augmenter la dégénérescence de ces neurones dans la maladie de Huntington (Charvin et al., 2005).

1.4. Pathologies associées au système dopaminergique

1.4.1. La Maladie de Parkinson

En 1957 la présence de la dopamine dans le cerveau de rats a été démontrée pour la première fois par Kathleen Montagu qui travaillait alors sur l'adrénaline et la noradrénaline (Montagu, 1957). Par la suite en 1963 des techniques permettant de mesurer les niveaux de dopamine dans le cerveau de souris couplées avec les premières preuves de la forte présence de dopamine dans les ganglions de la base ont suggéré que la maladie de Parkinson pouvait être reliée à une diminution des niveaux de dopamine dans le cerveau (Bertler & Rosengren, 1959; Seiden & Carlsson, 1963, 1964). Puis, les travaux menés par Oleh Hornykiewicz ont montré que les niveaux de dopamine chez les parkinsoniens étaient diminués dans les noyaux caudés et putamen, ce qui permit d'expliquer que ces faibles niveaux de dopamine dans le striatum étaient reliés aux symptômes moteurs retrouvés dans la maladie de Parkinson (voir Hornykiewicz, 2006).

Dans les faits, la maladie de Parkinson est due à la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte avec une prévalence de 1-2 pour 1000. La maladie apparaît vers l'âge de 60 ans, et affecte plus les hommes que les femmes. En plus de cette perte de neurones des inclusions appelées corps de Lewy sont également retrouvées dans la substance noire. Les corps de Lewy sont composés d'un enchevêtrement d'ubiquitine, de neurofilaments, de synphyline, de parkin, et d' α -synucléine (Gibb & Lees, 1991; Goldman et al., 1983; Spillantini et al., 1998). L'accumulation des ces inclusions dans les neurones provoque leur mort progressive et engendre une baisse de la libération de dopamine dans le striatum. Il en découle l'apparition de problèmes moteurs tels que la bradykinésie et la rigidité des membres. L'apparition des symptômes de la maladie de Parkinson est tardive par rapport à l'atteinte cellulaire. On considère qu'il faut une perte équivalente à 60% des neurones de la substance noire et environ 80% de baisse de dopamine dans le striatum dorsal pour observer les premiers symptômes. Les autres

symptômes retrouvés sont un affect plat, des tremblements au repos, des problèmes de sommeil, des troubles de l'olfaction, des problèmes de stature (Hirsch et al., 1997). D'autres noyaux dopaminergiques sont aussi affectés dans la maladie mais en moindre mesure, dans le tubercule olfactif, l'aire tegmentaire ventrale, des neurones cholinergiques dans le noyau basal de Meyert et des neurones noradrénergiques du locus coeruleus.

Différentes causes ont été avancées pour expliquer cette dégénérescence des neurones dopaminergiques principalement de la substance noire. Récemment, plusieurs gènes ont été identifiés à partir de l'analyse génétique de rares formes familiales de la maladie de Parkinson. Principalement 6 gènes sont associés à des formes dominantes ou récessives de la maladie incluant : α -synucléine, Parkin, UCH-L1, PINK1, DJ-1 et LRRk2/dardarine (Harvey et al., 2008). Bien qu'aucun de ses gènes ne soit responsable à lui seul du déclenchement de la maladie, des mutations affectant la traduction normale de leurs protéines ont été caractérisées dans des déclenchements rapides de la maladie de Parkinson. L' α -synucléine situé au niveau du locus PARK1 a été le premier gène identifié dans la maladie de Parkinson, avec un mode de transmission dominant. Sa protéine est retrouvée sous forme d'aggrégats dans les corps de Lewy (Conway et al., 2000; Spillantini et al., 1998). Toutefois, les souris génétiquement modifiées porteuses de mutations de cette protéine ne démontrent pas de dégénérescence consistante de neurones dopaminergiques (Chandra et al., 2004; Matsuoka et al., 2001), suggérant que l' α -synucléine n'est pas suffisante à elle seule pour déclencher la maladie. Le gène codant pour la protéine Parkin a été le deuxième identifié, situé au niveau du locus PARK2, avec un mode de transmission récessif. Il est responsable du déclenchement le plus précoce de la maladie aux alentours de 30 ans, avec une progression lente sans corps de Lewy. Toutefois, des souris avec le gène Parkin réprimé présentent le même comportement que des souris sauvages, ce qui suggère que la dysfonction de Parkin n'est pas suffisante pour le déclenchement de la maladie mais joue un rôle dans son développement (Perez & Palmiter, 2005). L'ubiquitine C-terminale hydrolase-L1 (UCH-L1), situé au niveau du locus PARK5, est retrouvée dans de nombreuses structures pathologiques dont les corps de Lewy, et la surexpression de UCH-

L1 entraîne la formation d'agrégats avec l' α -synucléine (Liu et al., 2002). La protéine kinase PINK-1 est associée avec le locus du gène PARK6 et reliée à de rares formes de la maladie de Parkinson (Valente et al., 2004). Son action se fait dans la chaîne de respiration mitochondriale et contribue à l'émergence précoce de la maladie. Le gène DJ-1 est lui associé au locus PARK7. C'est un gène récessif impliqué aussi dans l'apparition précoce de la maladie. Les souris dont le gène DJ-1 a été réprimé ne présentent toutefois pas de différences morphologiques ou anatomiques au cours de leur développement par rapport aux animaux témoins (Goldberg et al., 2005). Enfin le gène LRRK2/dardarin, associé au locus PARK8, a été identifié à travers le monde dans plusieurs familles affectées par la maladie de Parkinson, avec un caractère dominant (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004). Son rôle est encore mal défini. Dans l'ensemble les causes génétiques n'expliquent pas à elles seules le déclenchement de la maladie comme le montre les expériences de modifications génétiques menées sur des souris. Mais la découverte de ces gènes renseigne grandement sur des facteurs de susceptibilité de développer la maladie de Parkinson.

Des causes environnementales peuvent aussi induire des symptômes de la maladie. Le syndrome de « *dementia pugilistica* » est un exemple de maladie proche du parkinsonisme suite à la répétition de traumatismes entraînant une inflammation qui serait à la base de la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Aktas et al., 2007; Jordan, 2000). Certaines substances comme le MPTP, utilisée comme drogue d'abus (voir section suivante), les métaux lourds, ou la roténone, utilisée comme pesticide, entraînent la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Mais dans l'ensemble, un amalgame de prédispositions génétiques couplées avec des facteurs environnementaux, semble plus plausible pour déclencher de la maladie de Parkinson.

Modèles animaux de la maladie de Parkinson

Le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine ou MPTP a été mis en évidence dans les années 80, avec l'apparition de troubles de type parkinsoniens chez de jeunes adultes. En fait, la molécule est un analogue mal synthétisé de l'héroïne, et a une action neurotoxique sur les neurones à dopamine (Langston & Ballard, 1983; Snyder & d'Amato, 1986). Le MPTP est converti en MPP⁺ (1-méthyl-4-phénylpyridinium) par la MAO-b (monoamine oxydase b) contenu dans la glie, et va ensuite passer dans les neurones dopaminergique par l'intermédiaire des DATs (Fig.4). Le MPP⁺ va inhiber le complexe I des mitochondries entraînant une baisse de la production d'ATP et une augmentation des radicaux libres conduisant à la mort cellulaire (Shimoke et al., 2003). Cette toxine injectée à des souris et à des singes va induire une dégénérescence sélective et lente des neurones de la substance noire (Smeyne & Jackson-Levis, 2005; Raju et al., 2008).

L'administration de MPTP à des souris reproduit assez fidèlement les symptômes de la maladie, bien que les corps de Lewy ne soient pas retrouvés dans les neurones dopaminergiques. Cette toxine est utilisée depuis de nombreuses années pour produire des modèles animaux de la maladie de Parkinson vu sa capacité à reproduire les symptômes de cette maladie (Beal, 2001). Le MPTP est une molécule très lipophile et suite à son administration systémique répétée par injection intrapéritonéale chez la souris (Kang et al., 2007) ou intraveineuse chez le singe (Raju et al., 2008), la molécule traverse la barrière hémato-encéphalique. Le MPTP a un effet limité chez les rongeurs dont le rat (Schmidt & Ferger, 2001). Les souris dont le gène du transporteur est muté sont protégées de son action (Bezard et al, 1999). De même les neurones dopaminergiques dans lesquels les DATs sont sous-exprimés, et ou le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2) est surexprimé sont protégés de l'action du MPTP (Gainetdinov et al., 1998; Staal et al., 2000; Takahashi et al., 1997). Les singes qui ont reçu un traitement au MPTP présentent des symptômes similaires à la maladie de Parkinson, et répondent au traitement à la L-DOPA (Petzinger et al., 2002).

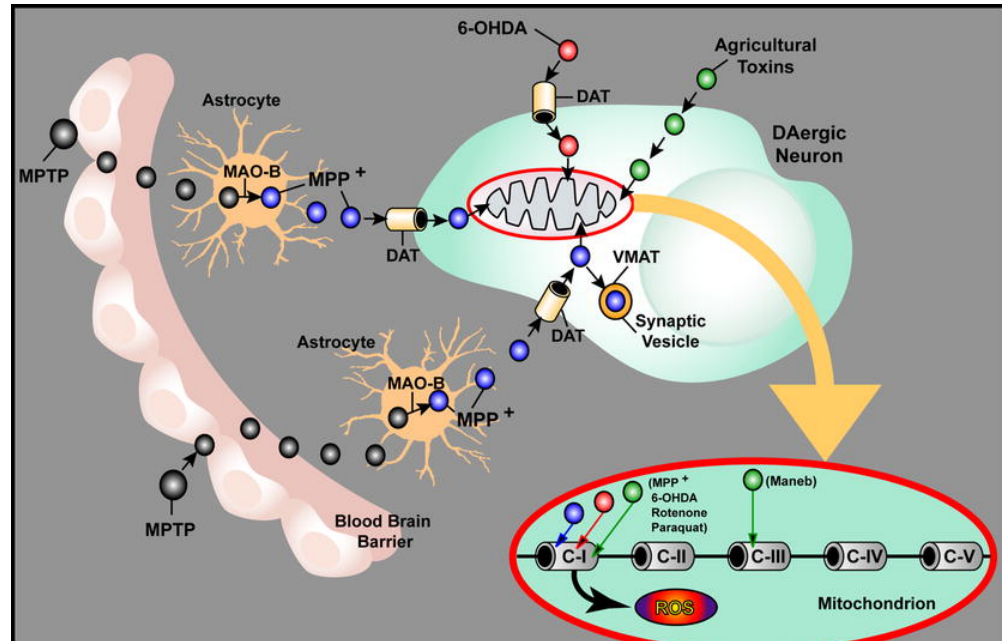


Figure 4 : Représentation schématique du système d'action des toxines MPTP et 6-OHDA au niveau des terminaisons dopaminergiques (image tirée de Schober, 2004).

Une autre toxine la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), agit aussi sur la chaîne respiratoire mitochondriale des neurones dopaminergiques en étant transportée par les DATs (Schober, 2004). Toutefois, cette toxine est moins spécifique que le MPTP et peut entraîner la dégénérescence des neurones noradrénergiques, ainsi que d'autres neurones. Par exemple, la disparition de terminaisons glutamatergiques a été observée chez des rats suite à l'injection dans le striatum (Ingham et al., 1998). La 6-OHDA n'est pas transformée et s'accumule dans les terminaisons. Tout comme le MPTP, la 6-OHDA entraîne une dysfonction de la respiration mitochondriale et induit une augmentation de la production de radicaux libres qui vont causer la mort des cellules dopaminergiques (Moore et al., 2005). Notons que l' α -synucléine ou la protéine parkin peuvent également entraîner une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale (Betarbet et al., 2002; Moore et al., 2005).

La 6-OHDA est la toxine la plus utilisée chez les rongeurs pour reproduire les symptômes de la maladie de Parkinson. Par contre l'administration de 6-OHDA doit se faire directement à l'intérieur du cerveau puisque la toxine ne passe pas la barrière hématoencéphalique. Elle peut être injectée directement dans le striatum, les ventricules latéraux, la substance noire ou le faisceau télencéphalique médian (Fernandes-Xavier et al., 1994; Ingham et al., 1998). La dégénérescence des neurones dopaminergiques est rapide suite à l'injection moins de 24h (Faull & Laverty, 1969; Fernandes-Xavier et al., 1994). Cette toxine peut être utilisée dans tous les modèles animaux incluant les souris, les rats et les singes (Beal, 2001; Betardet et al., 2002). Toutefois, ce modèle a ses limites et ne reproduit qu'en partie les symptômes de la maladie de Parkinson tels que les tremblements, l'akinésie, la rigidité (Lindner et al., 1999; Cenci, 2002). Les corps de Lewy ne sont pas retrouvés, et en fonction du site d'injection certains neurones qui dégèrent chez l'humain ne sont pas affectés dans les modèles animaux. Cependant, le modèle d'injection unilatérale de 6-OHDA est largement utilisé. L'intérêt de ce modèle repose sur la facilité pour assurer le succès de l'injection par observation de la rotation dans le sens ipsilatéral au site d'injection suite à l'administration d'amphétamines, et permet aussi d'utiliser le côté controlatéral comme référence (Schwartzing & Huston, 1996).

Enfin, signalons que des injections de 6-OHDA dans les ventricules latéraux chez des rats nouveaux nés, ont mis en évidence une plasticité structurale du système dopaminergique et sérotoninergique (Fernandez-Xavier et al., 1994). Cette technique a été mise au point en 1972 (Breese & Traylor, 1972) dans le but d'étudier les effets de la suppression de la transmission dopaminergique au cours du développement. Toutefois, ce modèle n'est pas considéré comme un modèle de la maladie de Parkinson, mais plutôt comme un modèle de la maladie de Lesch-Nyhan. Les rats adultes qui ont subi une lésion néo-natale présentent un poids plus faible, indicatif de leur difficulté à s'alimenter, de l'aphasie, ainsi que des problèmes d'apprentissage et de mémorisation (voir Breese et al., 2005).

Traitement

Divers traitements pharmacologiques sont utilisés pour traiter les symptômes de cette maladie. Toutefois, aucun d'entre eux ne permet de guérir la maladie ou de ralentir son évolution. Notons entre autre, l'administration de L-DOPA pour permettre d'augmenter la synthèse de dopamine. Mais l'efficacité de la L-DOPA s'épuise généralement après plusieurs années de traitement; des agonistes dopaminergiques directs des récepteurs D2, tels que la bromocriptine, et le pergolide qui sont employés chez des patients jeunes mais qui peuvent engendrer des effets secondaires tels que de la confusion ou des hallucinations visuelles. Notons aussi que des antagonistes de la monoamine oxydase et de la COMT tels que la sélégiline et l'entacapone sont souvent administrés avec la L-DOPA afin d'empêcher sa dégradation au niveau de la barrière hémato-encéphalique et ainsi augmenter ses niveaux dans le cerveau.

1.4.2. La Schizophrénie

La schizophrénie est une maladie psychiatrique grave et complexe et qui affecte environ 1% de la population. C'est une maladie complexe au point de vue génétique dont l'expression est également influencée par des facteurs environnementaux. La schizophrénie affecte toutes les classes de population, sans prévalence nette ni caractère héréditaire dominant. Chez les jumeaux homozygotes, la concordance est de 50% (Lewis et al., 2005). Parmi les facteurs environnementaux, plusieurs causes sont souvent considérées telles que des problèmes au cours de la maternité ou lors de l'accouchement, des géniteurs plus âgés, une infection virale chez l'enfant, ou la consommation de cannabis au cours de l'adolescence (Collier & Li, 2003 ; Fatemi et al., 2001).

La schizophrénie est caractérisée par l'apparition de symptômes vers la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Ces symptômes sont classés en 2 groupes : positifs ou négatifs (Mueser et al., 1991). Les symptômes positifs regroupent des atteintes telles que des hallucinations auditives, des idées délirantes, des mouvements stéréotypés, et des troubles de la pensée. Les symptômes négatifs regroupent des affections comportementales telles que l'isolement social, de l'apathie, et le manque d'expression de sentiments. Des troubles cognitifs sont aussi rencontrés incluant des troubles de l'attention (Saykin et al., 1994) et des atteintes de la mémoire verbale et de travail (Torres et al., 1997). Les symptômes sont traités par des médicaments antipsychotiques qui sont tous des antagonistes des récepteurs D2. Ces agents ont longtemps été considérés comme les seuls traitements efficaces.

De nombreuses études menées au cours des dernières années ont montrées que plusieurs circuits neuronaux impliquant diverses régions du cerveau, l'aire tegmentaire ventrale, le cortex préfrontal, le striatum, le thalamus médio-dorsal, et l'hippocampe, étaient perturbés chez les patients souffrant de schizophrénie (Andreasen et al, 1996 ; Buchsbaum et al, 1997 ; Fletcher et al, 1998 ; Phillips et al., 2002 ; Stevens et al, 1998). Concrètement, sur le plan strictement anatomique, on note l'élargissement des ventricules latéraux dans près de 50% des patients, une diminution de volume de la couche 3 du CPF,

une diminution de la taille du striatum sans perte de neurones, une réduction du volume du noyau thalamique médio-dorsal, avec perte du nombre de cellules, une asymétrie des hippocampes, avec une diminution plus marquée de l'hippocampe gauche avec perte cellulaire, et une désorganisation des cellules pyramidales de cette même structure.

Il n'est pas clair si ces différences structurales représentent une cause essentielle de l'apparition de la schizophrénie. Toutefois, ces variations neuroanatomiques sont présentes dès le début de l'apparition des symptômes chez les individus souffrant de schizophrénie (Gourion et al., 2004). Des études d'imagerie structurale ont montré la présence d'anomalies cérébrales (atrophie corticale, élargissement des ventricules, et une asymétrie cérébrale) corrélées à des signes d'anomalies cognitives précoces (Gourion et al., 2004). De plus, aucune progression des atteintes anatomiques n'a été notée dans ces régions (James et al., 2004). Ces éléments soutiennent une hypothèse neurodéveloppementale pour la schizophrénie plutôt qu'un processus neurodégénératif progressif (Gourion et al., 2004 ; James et al., 2004).

Modèles animaux de la schizophrénie

Plusieurs modèles animaux ont été développés pour essayer de reproduire les symptômes de la schizophrénie, basés sur 3 concepts différents. Le premier modèle repose sur la diminution des niveaux de glutamate observés dans le cortex préfrontal, et l'hippocampe. Ceci est reproduit par injection de PCP, un antagoniste des récepteurs NMDA qui entraîne des symptômes psychotiques chez l'humain et chez l'animal (Tsai & Coyle, 2002). Par contre ce modèle ne répond pas aux antipsychotiques conventionnels (voir paragraphe suivant) et donc permet juste l'étude de certains symptômes positifs de la maladie. Le second modèle est basé sur l'hypothèse d'une hyperactivité de la transmission dopaminergique. Il est mimé par des injections répétées d'amphétamines ou d'apomorphine (Laruelle et al., 2003). Ce modèle reproduit les symptômes positifs observés dans la maladie, qui sont atténués par les antipsychotiques typiques, antagonistes des récepteurs D2. Enfin, le dernier modèle animal repose lui aussi sur l'hypothèse d'une hyperactivité

dopaminergique de la voie méso-limbique, et d'une hypofonction de la voie mésocorticale, qui expliqueraient respectivement les symptômes positifs et négatifs de la maladie (Laruelle et al. 2003). Ce modèle est reproduit par une lésion de l'hippocampe ventral de jeunes rats, à l'aide d'injection bilatérale d'acide iboténique (Lipska et al., 1993 ; Lipska & Weinberger, 1995). Les rats développent après la puberté (56 jours post-natal) des symptômes s'apparentant à ceux retrouvés chez les humains, incluant des déficits de la mémoire de travail, des interactions sociales diminuées, et une augmentation des réponses au stress (Lipska et al., 1993 ; Lipska, 2004 ; Sams Dodd et al., 1997). De plus, les rats lésés répondent aux antipsychotiques conventionnels et atypiques (Bai et al., 2003 ; Sams Dodd et al., 1997). Toutefois, la lésion de l'hippocampe par l'acide iboténique entraîne une dissociation de la connectivité de l'hippocampe. Ce type d'altérations n'est pas retrouvé dans les cerveaux de schizophrènes. Un nouveau modèle de perturbation de l'hippocampe ventral a été développé par injection de tétradotoxine (Lipska, 2004 ; Lipska et al., 2002). Cette lésion réversible reproduit aussi la majorité des symptômes de la schizophrénie, mais n'affecte pas significativement les comportements sociaux (Lipska, 2004).

Traitement

Les antipsychotiques sont utilisés dans le traitement des symptômes de la schizophrénie depuis le début des années 1950. Les premiers antipsychotiques développés, dits conventionnels ou typiques, sont des antagonistes des récepteurs D2 tels que l'halopéridol. Leur utilisation permet de réduire les symptômes positifs de la schizophrénie, mais leur action est nulle sur les symptômes négatifs (voir Kapur & Mamo, 2003). Au début des années 1970, des antipsychotiques dits atypiques ont été développés tels que la clozapine. Ces molécules agissent sur les récepteurs D2 mais avec une plus faible affinité et des affinités plus fortes pour les récepteurs sérotoninergiques (5HT_{2A} et _{2C}), adrénergiques (α 1 et α 2) et muscariniques (Remschmidt et al, 2000).

1.4.3. Dépendance aux drogues d'abus

Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentaire ventrale font partie du circuit neuronal de récompense et de renforcement. C'est ce réseau qui est à la base du plaisir ressenti dans différentes situations ou états physiologiques tels que l'alimentation, et les comportements sexuels. Mais le circuit est aussi impliqué dans des dérèglements qui peuvent mener à des comportements pathologiques comme la consommation de drogue d'abus afin d'augmenter le sentiment de plaisir. Ce comportement fait intervenir la boucle ATV, cortex préfrontal, noyau accumbens et hippocampe vu précédemment. La dépendance aux drogues survient lorsque l'individu affecté cherche de façon compulsive à maintenir sa consommation et donc son plaisir. Les drogues d'abus incluent la cocaïne, l'amphétamine, les opiacés, de même que la nicotine et l'alcool. Les plus addictives sont celles qui déclenchent un sentiment d'euphorie et sont classées sous le terme générique de stupéfiants. Les stupéfiants augmentent la libération de dopamine dans le noyau accumbens, ce qui est à la base du renforcement du comportement et du développement de la dépendance (Wise & Rompre, 1989; Kuczenski et al., 1991; Koob & Le Moal, 2001). Leurs mécanismes d'action sont cependant différents. La morphine et les amphétamines vont stimuler l'activité des neurones DA et donc augmenter la transmission dopaminergique. On parle alors de psychostimulants. Les amphétamines de plus, facilitent le transport inverse des transporteurs de la dopamine, et donc entraînent la diffusion de la dopamine depuis les terminaisons dans le milieu extracellulaire. Elles vont de plus bloquer le stockage de la dopamine dans les vésicules (Schmitz et al., 2001). La cocaïne bloque les transporteurs de la dopamine et donc la capture de la dopamine libérée dans le milieu extracellulaire ce qui prolonge son action sur les récepteurs post-synaptiques (Kalivas & Duffy, 1991).

La dépendance à une drogue donnée intervient suite à la prise répétée de cette drogue (Wise & Rompre, 1989). Il est intéressant de noter aussi l'implication de l'hippocampe dans le phénomène de rechute : suite à la stimulation électrique de la partie

ventrale de l'hippocampe il est possible d'augmenter les niveaux de dopamine libérée dans le noyau accumbens en augmentant la décharge des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentaire ventrale (Legault et al., 2000). Il n'en reste pas moins que la dépendance aux drogues d'abus représente une physiologie complexe qui fait intervenir de nombreuses régions, mais la dopamine et l'aire tegmentaire ventrale jouent un rôle essentiel dans le développement de cette pathologie.

PARTIE 2 : Co-libération

Les critères d'identification qui permettent d'assurer qu'une molécule joue le rôle de neurotransmetteur sont, 1) que la substance soit synthétisée et stockée dans les neurones, 2) que la substance soit libérée suite à la stimulation du neurone, 3) que la libération de la substance entraîne une réponse sur l'élément post-synaptique, et 4) qu'un système de transport doit être présent pour la substance elle-même pour assurer le renouvellement de la substance dans la terminaison nerveuse. Pendant longtemps il a été suggéré que les neurones ne libéraient qu'un seul et unique neurotransmetteur classique, ce qui a été appelé le « principe de Dale » (voir Strata & Harvey, 1999). Toutefois, ce principe a été remis en question en 1976 par Burnstock qui a suggéré qu'un même neurone pouvait libérer plus d'une molécule (Burnstock, 1976).

2.1. Présence de neuropeptides dans les neurones.

Il a été montré que les neurones contiennent d'autres molécules qui peuvent être libérées en plus de leur neurotransmetteur classique. Les neurotransmetteurs classiques tels que le glutamate, l'acide γ -aminobutyrique (GABA), l'acétylcholine (ACh) ou encore la sérotonine, sont de petites molécules à action synaptique rapide. Les molécules qui colocalisent dans les neurones ne sont pas forcément des neurotransmetteurs mais elles peuvent agir comme neuromodulateur sur la libération et l'action des neurotransmetteurs principaux (Hokfelt et al., 1977). Par exemple le neuropeptide Y qui est synthétisé et emmagasiné dans des vésicules n'a pas d'action sur les récepteurs post-synaptiques mais agit sur la libération de l'ATP des nerfs sympathiques innervant le vas deferens chez le cochon d'inde (Ellis & Burnstock, 1990). Plusieurs molécules peuvent ainsi se retrouver dans les neurones du système nerveux végétatif des vertébrés, entre autre l'ATP et le neuropeptide Y qui peuvent être colibérés avec la noradrénaline dans les nerfs sympathiques des systèmes cardiovasculaire et viscéral (Burnstock, 1990). Également, le

polypeptide vasoactif intestinal (VIP pour vasoactive intestinal polypeptide en anglais) et l'ATP sont relâchés avec l'acétylcholine dans les nerfs parasympathiques (Lundberg, 1996). La colecystokinine (CCK) est contenue et peut aussi être libérée avec le glutamate par des neurones cortico-striataux (Hokfelt et al., 2002). La cotransmission de GABA et de somatostatine a aussi été reportée à partir de neurones de l'amygdale qui projettent au noyau du faisceau solitaire (Batten et al., 2002). En microscopie électronique, les neuropeptides sont trouvés dans de grosses vésicules d'aspect foncé dites à « cœurs denses », tandis que les neurotransmetteurs classiques sont contenus dans de petites vésicules claires (Merighi, 2002). Ces vésicules à cœurs denses sont retrouvées éloignées des zones actives synaptiques contrairement aux vésicules contenant les neurotransmetteurs classiques, et seront relâchées suivant des conditions particulières (Glombik & Gerdes, 2000). Par exemple, la stimulation à faible fréquence des neurones parasympathiques qui libèrent de l'ACh entraîne la sécrétion de salive en agissant directement sur les cellules acinus, ce qui est accompagné d'une faible vasodilatation. Par contre, la stimulation à haute fréquence de ces mêmes neurones, entraîne la libération de VIP qui va agir directement sur les vaisseaux et induire une forte vasodilatation sans sécrétion de salive (Lundberg, 1996). Dans les neurones dopaminergiques l'expression de différents peptides a été rapportée tels que la cholécystokinine (Hokfelt et al., 1980) et la neurotensine (Hokfelt et al., 1984).

2.2. Présence de 2 neurotransmetteurs classiques

Un des concepts les plus surprenants dans la co-transmission a été mis en évidence par des études qui ont démontré la présence de 2 neurotransmetteurs à action rapide dans le même neurone. La première démonstration a été faite en 1973 avec la découverte de la libération d'ATP au niveau de la jonction neuromusculaire suite à la stimulation électrique de fibres motrices cholinergiques (Silinsky & Hubbard, 1973). A la jonction neuromusculaire, il a été montré également que l'ATP pouvait être libérée par des terminaisons noradrénergiques des nerfs sympathiques, dont la stimulation entraîne la

libération d'ATP qui induit des potentiels excitateurs via l'ATP sur l'élément post-synaptique tandis que la noradrénaline active un système de seconds messagers et produit peu de changement de potentiel de membrane (Burnstock, 1990). Par la suite de nombreuses études ont montré la présence d'ATP dans d'autres neurones du système nerveux central, tel qu'avec la noradrénaline dans les fibres sympathiques du système végétatif (Ventura et al., 2003), ou encore avec le GABA dans certains neurones de l'hypothalamus (Labrakakis et al., 2003) et de la moelle épinière (Jo & Schlichter, 1999). Cette double expression de neurotransmetteurs confère aux neurones une variété de mode d'action. Un des faits intéressants de cette colocalisation de l'ATP est que sa libération et son action diffère suivant les neurones qui la contiennent. Dans le cas des neurones sympathiques qui innervent la prostate, la stimulation à faible fréquence entraîne la libération d'ATP alors que la relâche de noradrénaline nécessite une haute fréquence de stimulation (Ventura et al., 2003). Dans un modèle *in vitro* de neurones hypothalamiques, il a été montré que la libération d'ACh exerçait une action régulatrice sur la libération d'ATP via une action sur des récepteurs pré-synaptiques (Jo & Role, 2002). Enfin on peut noter aussi qu'à la jonction neuro-musculaire, l'ATP relâchée par les motoneurones facilite les actions nicotiques de l'ACh (Burnstock, 1990). Dans la région CA1 de l'hippocampe la libération d'ATP va faciliter l'action du glutamate sur les récepteurs NMDA et favoriser l'établissement de la potentialisation à long terme (Fujii et al., 2002).

D'autres neurotransmetteurs classiques sont colocalisés dans les mêmes neurones. Des marquages immunohistochimiques ont montré la présence de glycine et de GABA, 2 neurotransmetteurs à action inhibitrice, dans les neurones de la moelle épinière de rat (Todd & Sullivan, 1990). Des études ont par la suite montré que le GABA et la glycine pouvaient être co-exprimés et libérés par des neurones moteurs de la moelle épinière de rats nouveaux nés, par des interneurones sacrés, ainsi que par interneurones spinaux et du tronc cérébral (Jonas et al., 1998; Wu et al., 2002). Ces deux molécules ont en outre la capacité d'être reconnues par le même transporteur vésiculaire : le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (VIAAT en anglais pour « vesicular inhibitory amino acid

transporter »), et sont donc retrouvées dans les mêmes vésicules et libérés en même temps (Sagné et al., 1997; Wojcik et al., 2006).

Mais un fait plus surprenant fut la démonstration de la présence de GABA et de glutamate, 2 molécules dont l'action est considérée pour être opposée dans les animaux adultes. Cette colocalisation a été retrouvée dans les fibres moussues provenant de l'hippocampe qui projettent au niveau du striatum et dans la région de CA3 de l'hippocampe de rats et de singes (Ottersen & Storm-Mathisen; 1986; Sandler & Smith, 1991). À l'aide d'anticorps spécifiques, Sandler et Smith ont montré la présence de GABA dans les terminaisons synaptiques asymétriques des fibres moussues sur les neurones pyramidaux de CA3. Toutefois, la démonstration que les fibres moussues pouvaient produire du GABA est survenue plus tard suite à la mise en évidence dans les cellules granulaires de la présence de l'ARNm de l'enzyme de synthèse, l'isoforme 67 de la décarboxylase de l'acide glutaminique (GAD67) (Slovilter et al., 1996). Les ARNm des enzymes de synthèse GAD 65 et GAD67 ont aussi été retrouvés dans les cellules granulaires de rats et de singe (Slovilter et al., 1996).

Enfin, on peut souligner la présence d'ACh dans des neurones sérotoninergiques chez deux types d'invertébrés, l'aplysie et l'Hélix aspersa (Brownstein et al., 1974; Cottrell, 1976). Par ailleurs, une étude a montré la présence de glutamate dans la majorité des neurones cholinergiques du proencéphale, par immunoréactivité contre l'enzyme de synthèse la glutaminase phospho-activée (PAG de l'anglais « phosphate activated glutaminase ») chez le rat (Manns et al., 2001).

Chez les invertébrés, le GABA et la dopamine sont colocalisés dans une sous-population d'interneurones à l'intérieur du générateur central de patron contrôlant le comportement de prise d'aliments chez l'Aplysie (Diaz-Rios et al., 2002). Des études similaires menées sur des tranches de cerveau de rats ont montré que près de 10% des neurones dopaminergiques situés à la jonction entre l'ATV et la SNc contenaient les ARNm de la l'enzyme de synthèse du GABA, la GAD67 (Gonzales-Hernandez et al., 2001). Toutefois la libération de GABA par des cellules dopaminergiques n'a pas été

rapporté, ni l'expression du transporteur vésiculaires des acides aminés inhibiteurs nécessaire pour l'emballage dans les vésicules. Ces données suggèrent seulement que ces neurones ont la capacité de synthétiser du GABA.

Notons aussi que des cas de colocalisation de neurotransmetteurs classiques ont été observés dans d'autres contextes où il est plus approprié de parler de « fausse cotransmission ». Ce phénomène survient quand une substance non synthétisée par un neurone peut être captée par ce même neurone et ensuite relâchée synaptiquement avec le neurotransmetteur normal. La co-expression de transporteurs de neurotransmetteurs différents peut entraîner ce phénomène (Raiteri et al., 2002). Il a aussi été montré que l'accumulation de sérotonine et de dopamine dans certaines régions du cerveau pouvait entraîner la recapture par les mêmes terminaisons par l'intermédiaire des DATs. Comme la sérotonine et la dopamine utilisent le même transporteur vésiculaire (VMAT2), elles vont ensuite être relâchées ensemble suite à la stimulation du neurone (Zhou et al., 2005; voir Dal Bo & Trudeau, 2005).

2.3. Changement de phénotype observé dans certains neurones

Un aspect particulièrement intéressant de la co-transmission est la notion que le phénotype d'un neurone puisse être modifié en fonction de son activité électrique ou métabolique. Par exemple, une stimulation induite par de l'acide kaïnique entraîne une élévation de l'ARNm de GAD67 dans les neurones granulaires de l'hippocampe (Schwazer & Sperk, 1995). Il a aussi été montré qu'une stimulation de longue durée entraîne l'augmentation de l'ARNm de GAD65 et 67 ainsi que des protéines correspondantes dans les cellules granulaires (Sloviter et al., 1996). Cette réactivation du phénotype GABAergique par les cellules granulaires est démontrée par l'enregistrement de courants inhibiteurs post-synaptiques (IPSC) suite à la stimulation électrique dans les neurones de CA3 (Gutierrez, 2000). L'observation de la réponse inhibitrice nécessite la présence de bloqueurs glutamatergiques pour bloquer la partie excitatrice qui est plus

grande que la réponse inhibitrice. En plus, la réponse inhibitrice est observable dans les animaux plus jeunes (Gutierrez, 2002) mais pas chez les animaux plus âgés même en présence de bloqueurs des récepteurs glutamatergiques. Toutefois, chez les animaux adultes, un protocole de stimulation répétitif de type « kindling », mimant une crise d'épilepsie, peut entraîner une augmentation de la composante GABAergique des courants synaptiques des fibres moussues, ainsi qu'une élévation de la protéine GAD67 observée en immunomarquage (Gutierrez, 2002).

Finalement, une plasticité de la cotransmission peut aussi survenir au cours du développement, dans le vieillissement, suite à un choc traumatique, ou en réponse à certains facteurs neurotrophiques. Par exemple, la différenciation cholinergique des neurones parasympathiques peut être influencée par le BDNF, alors que le NGF entraîne la différenciation en neurones noradrénergiques (Brodski et al., 2002). Enfin, un changement de la transmission noradrénergique en cholinergique a été démontrée suite à l'application de BDNF sur les neurones sympathiques (Landis, 2002).

PARTIE 3 : Le Glutamate

3.1. Généralités

Le glutamate est un acide aminé non essentiel qui se retrouve dans la constitution des protéines. Bien que le glutamate ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, il est retrouvé dans le système nerveux central en grande quantité, où il joue un rôle de neurotransmetteur excitateur. En fait, c'est le neurotransmetteur qui est le plus représenté dans le système nerveux central. De plus, le glutamate est le précurseur du GABA. En tant que neurotransmetteur, le glutamate agit sur deux groupes de récepteurs. Des récepteurs ionotropes, qui sont des canaux ioniques dont l'ouverture dépend de la liaison du ligand et sur lesquels la liaison du glutamate engendre une réponse excitatrice rapide. Des récepteurs métabotropes, qui sont couplés à une protéine G et sur lesquels le glutamate exerce une action modulatrice lente.

3.1.1. Synthèse du glutamate

L'évidence que le glutamate joue un rôle de neurotransmetteur excitateur a été démontré en 1959, par l'enregistrements de réponses excitatrices suite à son application sur des neurones de la moelle épinière (Curtis et al., 1959). Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le SNC, et correspond aux critères nécessaires pour agir comme un neurotransmetteur : il est emmagasiné dans des vésicules synaptiques, une stimulation électrique provoque sa libération, sa libération entraîne une réponse post-synaptique excitatrice, et son action est arrêté par un mécanisme de recapture (Monaghan et al., 1989).

Le glutamate est synthétisé principalement à partir de la glutamine, mais dans les neurones il peut aussi être synthétisé à partir de l'aspartate dans les terminaisons axonales (Figure 5). Les cellules gliales capturent le glutamate présent dans le milieu extracellulaire par leurs transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT pour « excitatory amino acid transporter » en anglais). La glutamine synthétase transforme le glutamate en glutamine qui

ensuite va être capturée par les neurones exprimant des transporteurs de la glutamine (Höltje et al. 2008). La glutamine est aussi la molécule de départ pour la synthèse du GABA. La glutaminase est l'enzyme limitante de synthèse du glutamate qu'elle produit en enlevant le groupe ammoniacque de la glutamine. La glutaminase est une enzyme mitochondriale, et est retrouvée dans plusieurs types de cellules dont les cellules gliales. Dans les neurones, elle est plus exprimée dans les terminaisons axonales dû à la présence de nombreuses mitochondries.

Dans le système nerveux des vertébrés, les synapses glutamatergiques se font principalement sur les épines dendritiques d'autres neurones. Elles forment des synapses asymétriques dites de type I. En microscopie électronique, on observe un épaississement de la membrane post-synaptique dû à la forte présence de protéines post-synaptiques.

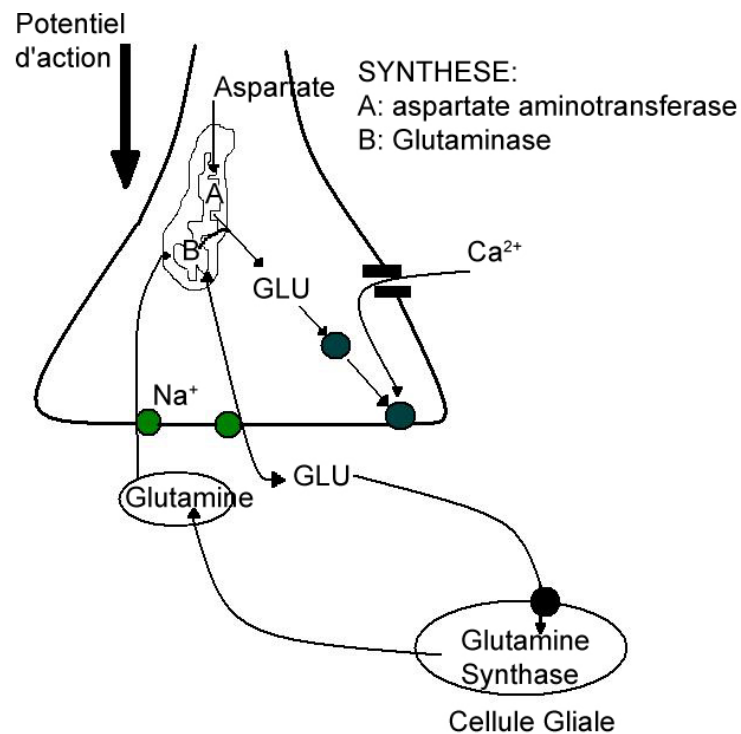


Figure 5 : Représentation schématique de la synthèse du glutamate au niveau des terminaisons axonales (image modifiée à partir de <http://neurobranches.chez-alice.fr/images/imagesneurophy/glutamate.gif>)

3.1.2. Récepteurs glutamatergiques

On dénombre 2 groupes de récepteurs glutamatergiques, les ionotropes et les métabotropes. Les récepteurs ionotropes sont des récepteurs qui forment des canaux ioniques. Le glutamate agit sur trois sous-types de récepteurs ionotropes, qui ont été différenciés suivant leur liaison à certains agonistes : les récepteurs NMDA (activé par le N-méthyl-D-aspartate), AMPA (activés par le α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) et Kainate. Les autres récepteurs activés par le glutamate sont de type métabotrope, qui comme les récepteurs dopaminergiques sont couplés à des protéines G.

Récepteurs ionotropes

Les récepteurs de type NMDA

Les récepteurs NMDA sont des canaux perméables à plusieurs cations monovalents et divalents. La liaison du glutamate sur ces récepteurs entraîne l'entrée dans le neurone de sodium et calcium. Leur activation va donc engendrer des réponses excitatrices dites tardives. Au niveau structural, les récepteurs NMDA sont formés d'un assemblage de cinq sous-unités NR1 et NR2, qui forment un canal au centre pour laisser passer les ions. Pour être actif, il faut que les récepteurs NMDA possèdent au moins une sous-unité NR1. Lorsque la membrane du neurone est au potentiel de repos, les récepteurs NMDA sont inactifs. Les récepteurs NMDA sont dépendants du voltage ; pour être activés ils nécessitent une dépolarisation préalable de la membrane plasmique (Monaghan et al., 1989). La dépolarisation initiale libère le site de liaison au magnésium présent dans la partie centrale des récepteurs (Nowak et al., 1984). La libération du magnésium permet l'activation des récepteurs et l'entrée subséquente des ions sodiques et calciques. L'entrée d'ions sodiques accentue la dépolarisation et donc l'activation d'un plus grand nombre de récepteurs NMDA. L'entrée de calcium va entraîner l'activation de protéines kinases qui peuvent moduler l'excitabilité des récepteurs NMDA, ainsi qu'une cascade d'autres événements intracellulaires. Ces deux processus sont les éléments qui sous-tendent

l'apparition de la potentialisation à long terme (PLT) (Kennedy, 1999 ; Lisman, 2003). La PLT a été mise en évidence au début des années 70 dans l'hippocampe, et représente une augmentation de l'efficacité synaptique qui peut durer plusieurs jours, et qui est à la base des mécanismes de mémoires (Bliss & Lomo, 1973). En plus des sites de liaison au glutamate et au magnésium, les récepteurs NMDA possèdent un site de liaison pour la glycine. La fixation de la glycine potentialise les effets des récepteurs, augmente son affinité pour le glutamate, et semble être nécessaire à son activation (Monaghan et al., 1989). En plus du magnésium, d'autres molécules peuvent inhiber les récepteurs NMDA. Entre autres, des antagonistes compétitifs comme le 2-amino-5-phosphovalérate (AP5) qui bloque la liaison du glutamate, et des antagonistes non-compétitifs tels que le PCP, qui se lie à l'intérieur du canal (Monaghan et al., 1989 ; Honore et al., 1987). L'utilisation d'AP5 tritié a permis de mener les études de distribution des récepteurs NMDA. Ces récepteurs sont retrouvés sur la majorité des synapses glutamatergiques dans l'ensemble du SNC (Olverman et al. 1988). De part leur distribution ubiquitaire, ils jouent un rôle important dans l'intégration du signal exciteur, mais sont aussi impliqués dans de nombreuses fonctions incluant : la neurotoxicité induite par le calcium (Arundine & Tymianski, 2003), la régulation de la prolifération cellulaire et la maturation de l'arborisation des neurones (Balazs, 2006; Suzuki et al., 2006).

Les récepteurs de type AMPA

Les récepteurs de type AMPA, aussi appelés récepteurs quisqualate, sont composés d'un assemblage de cinq sous-unités GluR1-4, qui forment un canal perméable principalement aux ions sodium. Ils comprennent en majorité des sous-unités GluR2 qui s'associent avec les sous-unités GluR1 ou GluR3. Il en résulte une grande variété d'organisations qui leurs procurent des différences de sensibilité au glutamate, ou dans la conductance aux ions sodiques (Sommer et al. 1990 ; Luscher & Frerking, 2001; Song & Huganir, 2002). Par marquage radioactif avec une molécule AMPA tritiée, il a été montré que, comme les récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA sont largement distribués dans le

système nerveux central (Monaghan et al., 1989). On les retrouve fortement exprimés dans les couches corticales externes, la région CA1 de l'hippocampe, et aussi dans la couche moléculaire du cervelet (Monaghan et al., 1989). Ils sont généralement retrouvés sur les éléments post-synaptiques et sont considérés comme les récepteurs prédominants dans la transmission excitatrice rapide (Shi et al., 1999). On peut aussi trouver des récepteurs AMPA sur les éléments pré-synaptiques, où ils vont exercer une action régulatrice de la libération d'autres neurotransmetteurs (Bureau & Mulle, 1998). Les récepteurs AMPA sont bloqués par des antagonistes compétitifs tels que le 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) et le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). Le blocage des récepteurs AMPA n'est pas sélectif puisque même à des faibles concentrations, ces antagonistes agissent aussi sur les récepteurs kaïnate (Monaghan et al., 1989). Les récepteurs AMPA sont impliqués dans d'autres fonctions physiologiques dans le SNC. Comme les récepteurs NMDA, ils sont exprimés tôt dans les neurones embryonnaires et jouent plusieurs rôles dans la maturation neuronale. Entre autres, dans le contrôle de la prolifération puisqu'il a été montré que leur blocage permet d'augmenter le nombre de cellules précurseuses dans la rétine (Martins et al., 2006), et que l'absence d'expression des sous-unités GluR1 inhibe la prolifération de cellules cancéreuses (de Groot et al., 2008). Les récepteurs AMPA jouent aussi un rôle important dans la morphogénèse des dendrites. Il a été montré que la sous-unité GluR1 favorise la croissance des dendrites dans les neurones moteurs de la moelle épinière (Zhang et al. 2008; Zhou et al., 2008).

Les récepteurs de type Kainate

Les récepteurs kainate sont très proches des récepteurs AMPA pharmacologiquement. Ils sont activés par le glutamate et le kainate, et sont bloqués par le DNQX et CNQX. Les récepteurs kainate forment des tétramères et diffèrent des récepteurs AMPA par les sous-unités qui les composent. On retrouve cinq sous-unités : GluR5-7, KA1 et KA2. On retrouve différents assemblages des sous-unités, mais les sous-unités KA1 et 2 ne peuvent être fonctionnelles qu'avec des sous-unités GluR. L'activation des récepteurs kainate permet l'entrée d'ions sodiques dans les neurones. Ils sont exprimés dans l'ensemble du cerveau. Les études de radio-marquage avec du kainate tritié ont montré que ces récepteurs sont plus fortement exprimés dans les couches corticales profondes, dans le striatum, dans le thalamus et dans le mésencéphale (Monaghan et al., 1989). Tout comme les récepteurs AMPA, les récepteurs kainate sont retrouvés sur les éléments post-synaptiques et sont responsables de la transmission excitatrice rapide indépendante du voltage (Monaghan et al., 1989). On peut en retrouver aussi sur les éléments présynaptiques où ils vont jouer un contrôle de la libération de neurotransmetteurs (Lauri et al., 2006). Les récepteurs kainate jouent aussi un rôle dans d'autres fonctions incluant : un rôle inhibiteur sur la motilité des axones hippocampiques en culture (Ibarretxe et al., 2007 ; Tashiro et al., 2003), dans l'excitotoxicité glutamatergique (King et al., 2007) , et dans le contrôle de la migration neuronale (Platel et al., 2008). De manière intéressante, l'activation des récepteurs kainate semble promouvoir la motilité des filipodes dans les neurones plus immatures, ce qui permettrait l'établissement de contacts lors de la synaptogénèse (Olsen et al., 2007 ; Tashiro et al., 2003).

Récepteurs métabotropes

Les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluRs) sont des récepteurs couplés aux protéines G. Ce sont donc des protéines à 7 domaines transmembranaires. Il existe au moins 8 mGluRs différents nommés mGluR1-8 qui sont répartis dans trois groupes principaux en fonction de leur homologie de séquence, de leur pharmacologie et des protéines G auxquelles ils sont couplés. Le groupe I comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5 : ils sont couplés à des protéines Gq qui vont activer la phospholipase C, ce qui entraîne par la suite une série d'événements menant à l'activation de la protéine kinase C. Le groupe II inclut les récepteurs mGluR2 et mGluR3 et le groupe III les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Ces récepteurs sont couplés à une protéine Gi/Go et vont donc inhiber l'adénylate cyclase (Conn & Pin, 1997). Le rôle des récepteurs métabotropes est encore peu connu et dépendrait de leur localisation, présynaptique ou postsynaptique, et des protéines G auxquelles ils sont couplés. Il a été reporté que les mGluRs du groupe I et II joueraient un rôle protecteur dans l'excitotoxicité glutamatergique et faciliteraient la neurogénèse et la survie neuronale (Baskys et al., 2005 ; Brazel et al., 2005 ; Luyt et al., 2006), ainsi que l'élongation des axones (Koyama et al., 2002 ; Plenz & Kitai, 1998).

3.1.3. Localisation des neurones glutamatergiques dans le SNC et limites de l'identification

Bien que le glutamate soit largement étudié, et est considéré comme le principal neurotransmetteur excitateur, l'identification des neurones dits glutamatergiques a longtemps été sujette à confusion. Comme nous l'avons vu précédemment, le glutamate est synthétisé par la glutaminase dans les mitochondries des structures présynaptiques avant d'être emmagasiné dans des vésicules synaptiques. Toutefois, les premières études de détection des neurones glutamatergiques à l'aide d'anticorps dirigés contre le glutamate, ou la glutaminase, ou encore les EAATs, n'ont pas permis d'assurer la spécificité du caractère glutamatergique d'une cellule. En effet, le glutamate et les EAATs sont aussi retrouvés dans les cellules gliales, et les neurones GABAergiques, et la glutaminase est retrouvée elle aussi dans les neurones GABAergiques (Kaneko & Mizuno, 1994; Kaneko & Fujiyama, 2002).

3.2. Transporteurs Vésiculaires du glutamate

3.2.1. Découverte

Pour être libéré par exocytose, le glutamate doit être emmagasiné dans des vésicules synaptiques via un transporteur vésiculaire spécifique. Les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) n'ont été identifiés que très récemment. Ces transporteurs sont au nombre de 3, appelés VGLUT1-3. Les VGLUTs confèrent une nouvelle possibilité d'identification des neurones glutamatergiques. Le glutamate va être incorporé dans les vésicules synaptiques sous l'action d'un gradient de proton tel que retrouvé pour les autres neurotransmetteurs (Gasnier et al., 2000; Gras et al., 2008; Mason et al., 1999)

Un transporteur a été cloné en 1994 sous le nom de transporteur de phosphate inorganique dépendant du Na⁺ (BNPI pour « Brain specific Na⁺-dependent inorganic transporter » en anglais) (Ni et al., 1994). Le BNPI a par la suite été montré pour être fortement exprimé dans le cerveau, plus particulièrement sur les vésicules des synapses excitatrices (Bellocchio et al., 1998, 2000). Des expériences de transfections de BNPI dans des neurones GABAergiques en culture ont montré que l'expression de cette protéine conférait aux neurones la possibilité de libérer du glutamate (Takamori et al., 2000). Ceci a été démontré par l'enregistrement de courants post-synaptiques excitateurs rapides sur les neurones cibles, réponses qui pouvaient être bloquées par des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA (Takamori et al., 2000). Ces expériences ont constitué la première démonstration que le BNPI agissait comme un transporteur spécifique du glutamate dans les vésicules synaptiques. Celui-ci a par la suite été renommé VGLUT1. Peu de temps après la découverte du BNPI/VGLUT1, le deuxième transporteur a été cloné grâce à sa forte homologie avec VGLUT1, appelé Le DNPI (de l'anglais « differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate transporter »), DNPI possède 82% de similitude avec le BNPI, et est lui aussi retrouvé fortement exprimé dans les terminaisons axonales dans le cerveau (Hisano et al., 2000; Fujiyama et al., 2001). Enfin, un troisième transporteur a été identifié plus récemment et nommé VGLUT3. Il présente une forte homologie avec les 2

premiers transporteurs VGLUT1 (72%) et VGLUT2 (75%). Cependant, contrairement aux deux autres, son expression dans le cerveau est rare et n'est pas retrouvée seulement dans les terminaisons mais aussi dans les dendrites et les corps cellulaires de certains des neurones qui l'expriment (Gras et al., 2002). L'expression de VGLUT1 et/ou VGLUT2 confère à la cellule la capacité de libérer du glutamate : ces transporteurs sont donc devenus des outils pour identifier les neurones glutamatergiques avec une grande précision.

3.2.2. Localisation des transporteurs

Les transporteurs vésiculaires du glutamate sont donc principalement exprimés dans les terminaisons axonales, spécialement pour VGLUT1 et 2. Donc, pour étudier la distribution des neurones qui expriment ces transporteurs des études ont dû se concentrer sur l'expression des ARNm codant pour ces transporteurs.

La distribution des ARNm de VGLUT1 et VGLUT2 a été étudiée par hybridation *in situ* afin de localiser les populations neuronales qui expriment ces transporteurs. Il existe une complémentarité de distribution des ARNm a été retrouvée dans l'ensemble du cerveau (Figure 6). Les ARNm de VGLUT1 sont principalement retrouvés dans les cortex cérébraux et cérébelleux, et l'hippocampe, tandis que ceux de VGLUT2 sont eux retrouvés dans les noyaux hypothalamiques, thalamiques, diencéphaliques, et dans le tronc cérébral (Hisano et al., 2000; Herzog et al., 2001; Fremeau et al., 2001; Varoqui et al., 2002; Kaneko & Fujiyama 2002; Kaneko et al., 2002). Enfin, on peut noter que certaines population des neurones corticaux et thalamiques expriment les ARNm des 2 transporteurs (Herzog et al., 2001; Boulland et al., 2004).

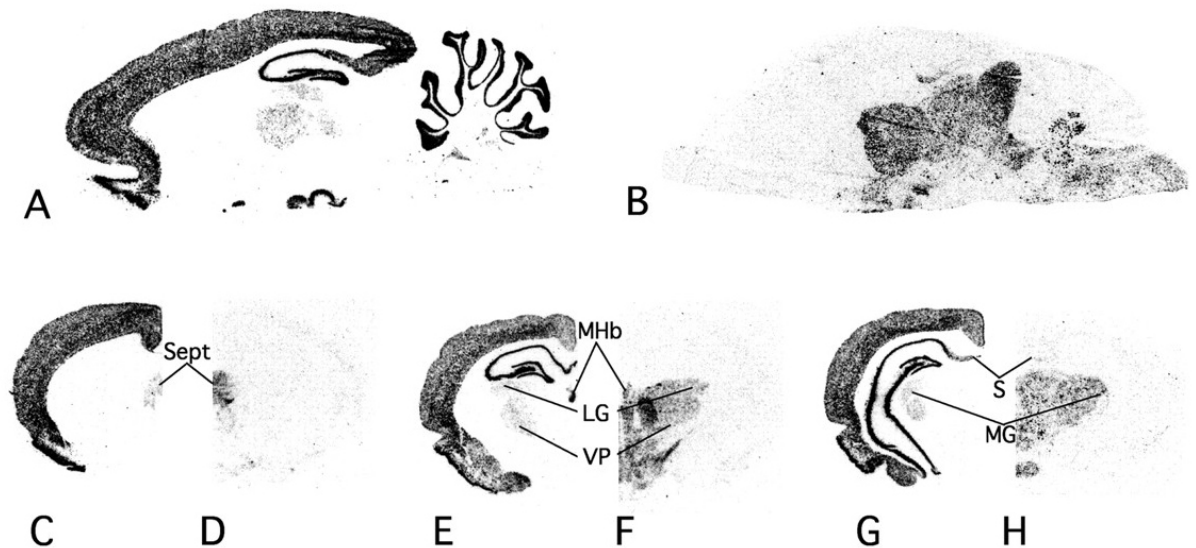


Figure 6 : Photos comparatives de la distribution des ARNm VGLUT1 (A, C, E, G) et VGLUT2 (B, D, F, H) dans le cerveau de rats adultes (tiré de Herzog et al., 2001).

Les premières études immunohistochimiques ont montré que l'expression des protéines de VGLUT1 et VGLUT2 était largement répandue dans le cerveau de rats adultes (Figure 7). Ces deux transporteurs sont retrouvés dans des terminaisons asymétriques dans l'ensemble du système nerveux central, mais il existe une certaine ségrégation de l'expression des protéines dans certaines zones. VGLUT1 est plus fortement exprimé que VGLUT2 dans les structures corticales, telles que les cortex cérébraux et cérébelleux, les couches II et III du néo-cortex, et aussi l'hippocampe. VGLUT2 est plus abondant que VGLUT1 dans les structures dites plus profondes ou sous-corticales telles que le thalamus, l'hypothalamus, le diencéphale, le gyrus denté, le télencéphale, le tronc cérébral (Herzog et al., 2001; Fujiyama et al., 2001; Fremeau et al., 2001; Varoqui et al., 2002).



Figure 7 : Photos de l'immunoréactivité de VGLUT1 (gauche) et VGLUT2 (droite) dans le cerveau de rats adultes (tiré de Herzog et al., 2001).

L'expression de VGLUT3 est quand à elle bien différente. D'une part, la protéine est retrouvée dans le corps cellulaires et les dendrites des neurones qui l'expriment (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Schaffer et al., 2002), et d'autre part, une faible expression est retrouvée dans le cerveau. Fait intéressant, son expression est retrouvée dans des neurones considérés jusqu'ici comme non glutamatergiques tels que des interneurons cholinergiques du striatum, les neurones sérotoninergiques du raphé, et les cellules en panier (« basket » en anglais) GABAergiques dans l'hippocampe (Fremeau et al., 2002, Gras et al., 2002, Herzog et al., 2004). L'expression dans ces cellules est d'autant plus intéressante car elle soulève la question de la co-libération de 2 neurotransmetteurs par un même neurone. L'expression de VGLUT3 dans les compartiments somatiques et dendritiques suggère une possible action dans la libération somato-dendritiques de glutamate (Fremeau et al., 2002).

Enfin, on peut noter aussi l'expression des 3 transporteurs vésiculaires dans les cellules gliales mise en évidence par immunomarquage et RT-PCR sur cellule unique à partir d'astrocytes en culture ou prélevés directement *in vivo* (Morimoto et al., 2003; Zhang et al., 2004; Montana et al., 2004; Bezzi et al., 2004). Ceci suggère que *in vitro*, les astrocytes auraient la capacité d'emmagasiner et de libérer du glutamate (Montana et al., 2004).

3.2.3. Régulation des VGLUTs

L'expression des VGLUTs est sujette à de nombreux changements. Au cours du développement, une régulation différentielle dans l'expression de VGLUT1 et 2 se fait au cours de la maturation du système nerveux central. Des études de Northern blot ont montré que dans les cerveaux d'embryons de rats, les ARNm de VGLUT2 prédominaient tout au long de la période embryonnaire, tandis que les ARNm de VGLUT1 étaient plus fortement exprimés après la naissance (Boulland et al., 2004). Ces résultats suggèrent une plasticité dans l'expression de ces transporteurs, mais sont aussi en accord avec la maturation normale du cerveau. Les structures corticales se développent plus tardivement que les structures profondes. Cette plasticité de l'expression des VGLUTs est retrouvée aussi dans les cerveaux matures. Par exemple, dans le cerveau de patients schizophrènes, le niveau des ARNm de VGLUT1 est diminué dans le cortex préfrontal (Eastwood & Harrison, 2005), le niveau des ARNm de VGLUT2 est augmenté dans le thalamus (Smith et al., 2001), tandis que l'expression de la protéine est augmentée dans l'hippocampe (Talbot et al., 2004). Dans le cerveau de patients Parkinsoniens, l'expression des protéines VGLUT1 et 2 est augmentée dans le striatum dorsal, tandis que l'expression de VGLUT1 est diminuée dans les cortex préfrontal et temporal (Kashani et al., 2007). Enfin, dans une autre pathologie, la maladie d'Alzheimer, les niveaux d'expression de VGLUT1 sont diminués dans les cortex pariétal et occipital (Kirvell et al., 2006). Toutefois, ces variations d'expression des protéines VGLUT1 et 2 dans ces pathologies ne sont pas nécessairement des causes directes de la maladie. Ils pourraient représenter une réponse secondaire à l'effet des médicaments pris par les patients. En effet, des études menées sur des rats ont montré que certains médicaments pouvaient moduler l'expression des VGLUTs. L'utilisation d'antidépresseurs tels que la désipramine, un bloqueur de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine, entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de VGLUT1 dans l'hippocampe, le gyrus dentelé et le cortex préfrontal, et des augmentations de l'expression des protéines VGLUT1 et 2 dans les structures thalamiques (Moutsimilli et al., 2005). On peut aussi noter que l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le striatum de rats adultes

entraîne une forte augmentation de l'expression de l'ARNm de VGLUT2 dans le noyau parafasciculaire (Aymerich et al., 2006), structure dépourvue de neurones dopaminergiques. Cette réactivité pourrait traduire un phénomène plastique attestant de l'activité des neurones glutamatergiques suite à un choc traumatique. Dans le même ordre d'idée, la répétition d'électrochocs modifie l'expression de l'ARNm de VGLUT1 dans le gyrus dentelé et le cortex de rats (Tordera et al., 2005). L'expression de ces transporteurs est finement régulée, et sujette à de nombreuses variations suivant des perturbations de l'homéostasie des neurones les exprimant.

PARTIE 4 : Expression des VGLUTs dans les neurones mono-aminergiques.

4.1. Présence de glutamate dans les neurones monoaminergiques

Les neurones mono-aminergiques contiennent différentes substances qu'ils peuvent libérer en plus de leur neurotransmetteur classique. Des études ont suggéré que du glutamate était retrouvé dans les neurones dopaminergiques et sérotoninergiques. En effet des marquages immunohistochimiques ont montré une réactivité pour le glutamate dans les neurones à dopamine de la substance noire et à sérotonine du raphé (Storm-Mathisen et al., 1983; Ottersen & Storm-Mathisen, 1984). Par la suite, des études utilisant un double immunomarquage contre la glutaminase et différents marqueurs catécholaminergiques ont confirmé les résultats de ces premières études, en montrant la présence de cette enzyme dans les neurones à dopamine mésencéphaliques, à sérotonine du raphé dorsal et à noradrénaline dans le locus coeruleus (Kaneko et al., 1990; Sulzer et al., 1998). Des enregistrements électrophysiologiques ont montré que près de 60% des neurones sérotoninergiques isolés en culture libéraient du glutamate aux contacts autaptiques qu'ils forment sur leur arborisation somato-dendritique. Des réponses autaptiques excitatrices rapides sont enregistrées suite à la dépolarisation du neurone, et ces réponses sont bloquées par des antagonistes des récepteurs glutamatergiques (Johnson, 1994). Les mêmes réponses ont été enregistrées sur des neurones dopaminergiques isolés mis en culture, ou près de 75% des neurones enregistrés libéraient du glutamate (Sulzer et al., 1998). Les réponses excitatrices rapides sont bloquées par des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA du glutamate. Des réponses similaires ont été retrouvées dans un système de co-culture de neurones dopaminergiques avec des neurones GABAergiques du noyau accumbens sur lesquels des réponses glutamatergiques ont été enregistrées après la stimulation des neurones dopaminergiques (Joyce & Rayport, 2000). Plus récemment encore, des réponses excitatrices rapides ont été enregistrées dans le noyau accumbens suite à la stimulation électrique dans l'ATV (Chuhma et al., 2004). Ceci a été réalisé en utilisant des tranches de

cerveau de souris génétiquement modifiées pour exprimer une protéine de reconnaissance fluorescente sous le contrôle du promoteur des DATs, afin de localiser les neurones dopaminergiques. Ces réponses en plus d'être bloquées par des antagonistes glutamatergiques étaient inhibées par l'application d'un agoniste des récepteurs D2 au niveau du site de stimulation suggérant que la libération de glutamate se fait à partir de neurones dopaminergiques de l'ATV.

4.2. Colocalisation de VGLUTs dans les neurones monoaminergiques

La première confirmation du phénotype glutamatergique des neurones monoaminergiques a été réalisée par Stornetta et ses collaborateurs. En conjuguant des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunomarquage contre la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme de synthèse de la dopamine retrouvée aussi dans les neurones adrénérgiques et noradrénérgiques, ils ont montré que près de 80% des neurones adrénérgiques des noyaux C1, C2 et C3, et des neurones noradrénérgiques du noyau A2 contenaient les ARNm de VGLUT2 (Stornetta et al., 2002a). Ces neurones doublement marqués pour la TH et le VGLUT2, innervent principalement le noyau rétrotrapézoïde et des neurones préganglioniques contenus dans la moelle épinière (Stornetta et al., 2002b; Rosin et al., 2006).

Peu temps de temps après, deux groupes de recherche ont montré la présence de VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques par marquage combiné immunohistochimique contre la tryptophane hydroxylase, enzyme de synthèse de la sérotonine, et hybridation *in situ* pour détecter l'ARNm de VGLUT3 (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004). Des études de marquages immunohistochimiques contre VGLUT3 et VMAT2, le transporteur vésiculaire des monoamines (de l'anglais « vesicular monoamine transporter ») ont montré la colocalisation des 2 protéines dans l'hippocampe de jeunes rats (Boulland et al., 2004). Ces terminaisons n'étaient toutefois

pas réactives pour la tyrosine hydroxylase, suggérant qu'elles proviennent de neurones sérotoninergiques.

Toutefois, aucune de ces études n'a permis de démontrer la présence d'un des trois transporteurs dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Une première série d'expériences utilisant la technique de Northern blot a montré que l'ARNm de VGLUT2 était présent dans la substance noire humaine (Aihara et al., 2000), mais aucune confirmation n'a été apportée par hybridation *in situ* dans les autres articles s'intéressant à cette colocalisation. La présence de l'ARNm et de la protéine de VGLUT3 a été suggérée dans l'aire tegmentaire ventrale et de la substance noire de rats adultes (Fremeau et al., 2002). Bien que la présence de la protéine ait été confirmée par la suite (Herzog et al., 2004), aucune autre étude n'a montré l'expression de l'ARNm de VGLUT3 dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques.

PARTIE 5 : Problématique et lien avec notre sujet d'étude

Au début de ma thèse, une des questions principales qui restait en suspens, est quel transporteur vésiculaire du glutamate est exprimé dans les neurones dopaminergiques expliquant leur capacité à libérer du glutamate?

Bien que les études menées jusqu'à maintenant n'ont pas rapporté la présence de VGLUTs dans les neurones dopaminergiques, de nombreux paramètres et limitations de ces travaux doivent être considérés.

Premièrement l'âge semble être un facteur important; toutes les études ont été menées sur des animaux adultes, alors qu'il semble que l'expression des VGLUTs soit modulée au cours du développement. Des détections à différents âges prénataux et postnataux pourraient permettre de déterminer s'il existe une répression de l'expression des VGLUTs dans les neurones dopaminergiques matures.

Deuxièmement, les techniques utilisées jusqu'à présent n'ont pas permis d'exclure la possibilité que les neurones dopaminergiques expriment de faibles niveaux d'ARNm des VGLUTs. Les immunomarquages réalisés sur les coupes de cerveaux n'ont permis de montrer que les zones de projections où se retrouvent la protéine, puisque les VGLUTs ne sont généralement pas présents ou détectables dans les corps cellulaires de neurones qui les expriment. En utilisant un système de microculture de neurones dopaminergiques qui isolent ces neurones, des techniques de double marquage immunocytochimique devraient permettre d'identifier si une des protéines VGLUTs est contenue dans les terminaisons dopaminergiques.

De plus, la détection de l'ARNm par hybridation *in situ* n'a été faite jusqu'à maintenant par révélations sur film radiographiques et par marquage simple avec des grains d'argent, ne permettant pas d'observer l'expression au niveau cellulaire des VGLUTs dans le mésencéphale ventral. Des techniques de double hybridation pour détecter les VGLUTs et la tyrosine hydroxylase sont nécessaires pour observer l'expression éventuelle dans les neurones dopaminergiques sur les tranches de cerveau.

Troisièmement, l'expression des VGLUTs semble être modulée par de nombreux facteurs pharmacologiques et/ou pathologiques; il se pourrait donc qu'un dérèglement physiologique réactive l'expression d'un des transporteurs. L'utilisation d'agents pharmacologiques, ou une perturbation de l'homéostasie, pourraient être envisagées afin d'observer si l'expression des VGLUTs est modulée dans les neurones dopaminergiques.

En tenant compte de la capacité des neurones dopaminergiques à libérer du glutamate en culture, nous suggérons que ces neurones ont la capacité d'exprimer un des trois transporteurs vésiculaires du glutamate, ou un quatrième sous-type encore non-identifié. Comme les premiers résultats obtenus par hybridation *in situ* sur des animaux adultes, nous suggérons que l'expression de transporteur vésiculaire du glutamate doit être réprimée dans les animaux adultes mais pourrait être régulée au cours du développement cérébral et possiblement être induite de nouveau dans des conditions pathologiques ou traumatiques telles que la mise en culture.

RÉSULTATS

Contribution des co-auteurs

Les articles qui suivent sont le résultat du travail expérimental que j'ai réalisé au cours de mon doctorat. Je suis auteur principal des deux articles de recherche présentés dans cette section. J'ai donc effectué la majorité du travail expérimental présenté dans ces articles et rédigé les manuscrits. Mon directeur de recherche, le Dr Louis-Éric Trudeau, a supervisé les travaux et la rédaction des articles. D'autres personnes ont également participé à ces études et à la rédaction des manuscrits :

Article 1 :

Fannie St-Gelais a effectué les expériences d'enregistrements électrophysiologiques.

Marc Danik a effectué les expériences de RT-PCR sur cellule unique dans le laboratoire de Sylvain Williams.

Sylvain Williams a participé à la rédaction du manuscrit.

Mathieu Cotton a effectué les expériences préliminaires au cours d'un stage dans le laboratoire.

Article 2 :

Noémie Bérubé-Carrière a effectué toutes les expériences d'imagerie électronique et les comptes des terminaisons.

Jose Alfredo Mendez a effectué les expériences de RT-PCR.

Damiana Leo a effectué le prélèvement du mésencéphale des embryons.

Mustapha Riad et Laurent Descarries ont supervisé les travaux de Noémie, et participé à la rédaction du manuscrit.

Daniel Lévesque a supervisé tout mon travail d'hybridation *in situ* dans son laboratoire, et a participé à la rédaction du manuscrit.

ARTICLE 1

Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine.

Gregory Dal Bo, Fannie St-Gelais, Marc Danik^{*}, Sylvain Williams^{*}, Mathieu Cotton
and Louis-Eric Trudeau

Department of pharmacology
Centre for Research in Neurological Sciences
Faculty of Medicine, Université de Montreal
Montreal, Quebec, Canada

^{*} Douglas Hospital Research Centre
Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University
Montreal, Quebec, Canada

Journal of Neurochemistry, 2004, 88(6): 1398-405.

ABSTRACT

Dopamine neurons have been suggested to use glutamate as a cotransmitter. To identify the basis of such a phenotype, we have examined the expression of the three recently identified vesicular glutamate transporters (VGLUT1-3) in postnatal rat dopamine neurons in culture. We find that the majority of isolated dopamine neurons express VGLUT2, but not VGLUT1 or 3. In comparison, serotonin neurons express only VGLUT3. Single-cell RT-PCR experiments confirmed the presence of VGLUT2 mRNA in dopamine neurons. Arguing for phenotypic heterogeneity among axon terminals, we find that only a proportion of terminals established by dopamine neurons are VGLUT2-positive. Taken together, our results provide a basis for the ability of dopamine neurons to release glutamate as a cotransmitter. A detailed analysis of the conditions under which DA neurons gain or lose a glutamatergic phenotype may provide novel insight into pathophysiological processes that underlie diseases such as schizophrenia, Parkinson's disease and drug dependence.

Key words: dopamine, glutamate, vesicular glutamate transporters, mesencephalon, culture.

Running title: Dopamine neurons in culture express VGLUT2

INTRODUCTORY STATEMENT

Although neurons have long been known to have the capacity to release neuropeptides in addition to small-molecule neurotransmitters such as acetylcholine, glutamate and GABA, the co-release of two different small neurotransmitters by neurons has been less extensively investigated. However, data has been provided in support of the co-release of acetylcholine and ATP at the neuromuscular junction (Morel and Meunier 1981), of norepinephrine and acetylcholine by sympathetic neurons (Schweitzer 1987; Fu 1995; Furshpan et al. 1976) and of GABA and glycine in the brainstem and the spinal cord (Russier et al. 2002; Wu et al. 2002).

Central monoamine-containing neurons have also recently been proposed to release glutamate at synaptic contacts in addition to their standard neurotransmitter. For example, isolated serotonin (5-HT)-containing neurons in culture establish glutamate-releasing synaptic contacts (Johnson 1994b; Johnson 1994a). A similar observation has been made for mesencephalic DA neurons in culture which also establish glutamatergic synapses (Sulzer et al. 1998; Bourque and Trudeau 2000; Joyce and Rayport 2000; Rayport 2001; Sulzer and Rayport 2000; Congar et al. 2002).

The ability of monoamine neurons to release glutamate suggests that these cell's nerve terminals must have the capacity to package and release glutamate from synaptic vesicles in addition to DA or 5-HT. The recent cloning of three vesicular glutamate transporters, VGLUT1-3 (Ni et al. 1995; Bellocchio et al. 2000; Takamori et al. 2000; Takamori et al. 2001; Takamori et al. 2002; Fremeau et al. 2001; Herzog et al. 2001; Hayashi et al. 2001; Bai et al. 2001; Gras et al. 2002; Varoqui et al. 2002; Schafer et al. 2002) provides new molecular phenotypic markers for glutamate-releasing neurons. Expression of a VGLUT may be necessary and sufficient to allow synaptic release of glutamate. For example, overexpression of VGLUT1 in GABAergic neurons endows these cells with the capacity to release glutamate (Takamori et al. 2000). The localization of these transporters in the brain has led to the surprising observation that 5-HT-containing neurons

express one of these, namely VGLUT3 (Fremeau et al. 2002; Gras et al. 2002; Schafer et al. 2002). However, mRNA for none of these transporters appears to be detectable *in vivo* by *in situ* hybridization in DA-containing neurons of the ventral tegmental area (VTA) or substantia nigra (SN) (Fremeau et al. 2001; Gras et al. 2002; Schafer et al. 2002; Herzog et al. 2001). However, it should be noted that the presence of VGLUT3 mRNA has been suggested by one group (Fremeau et al. 2002), a finding not replicated by others (Gras et al. 2002; Schafer et al. 2002). Taken together, these findings suggest two possible explanations for the ability of DA neurons to release glutamate in culture. A first hypothesis is that these neurons express a fourth, currently unidentified vesicular glutamate transporter. An alternate hypothesis is that DA neurons possess a normally repressed ability to express one of the three cloned VGLUTs, and that this potential is revealed under culture conditions, and perhaps under physiopathological conditions.

To test these hypotheses, we have used immunocytochemistry and single-cell RT-PCR to localize and detect VGLUT1-3 in mesencephalic neurons in culture. We find that VGLUT2 is expressed in the majority of DA neurons in culture, providing an explanation for their ability to release glutamate.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture. Postnatal primary cultures were established from neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats, as previously described (Congar et al. 2002). Mesencephalic dopamine neuron cultures were prepared from small blocs of tissue containing the ventral tegmental area and substantia nigra. Serotonin neuron cultures were prepared by dissecting a small bloc of tissue containing ventral raphé nuclei. Most experiments were performed on “micro-island” cultures in which single or small groups of neurons grow together with a small number of pre-established mesencephalic astrocytes on small 100-200 μm diameter collagen/poly-L-lysine droplets (Congar et al. 2002). For our experiments, we selected single neurons that were confirmed to be dopaminergic by immunocytochemistry for tyrosine hydroxylase. Serotonin neurons were identified by immunolabelling against tryptophan hydroxylase. Culture medium for neurons was prepared from Neurobasal A together with B27 (Invitrogen, Burlington, Ontario) and contained 5% foetal calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT).

Immunocytochemistry. Single DA and 5-HT neurons were respectively identified by immunocytochemistry using tyrosine hydroxylase (TH) (1:1000) and tryptophan hydroxylase (TRH) (1:250) mouse monoclonal antibodies obtained from Sigma Chemicals Co., (St-Louis, MO). In triple-labelling experiments, a goat polyclonal antibody (1:100) was used to label TH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). This antibody was less effective than the mouse monoclonal and only permitted the labelling of cell bodies and major dendrites. VGLUT1 (1:5000) and VGLUT2 (1:1000) antibodies were polyclonal rabbit antibodies and were obtained from Synaptic Systems GmbH (Göttingen, Germany). The VGLUT3 (1:5000) antibody was a kind gift of Dr. S. El Mastikawy (INSERM U513, Créteil, France). The SV2 (1:400) and glutamic acid decarboxylase (1:250) antibodies, developed by Dr. K.M. Buckley and Dr. D.I. Gottlieb, respectively, were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank maintained by the Department of Biological

Sciences, The University of Iowa, Iowa City, IA. Images were captured on an Olympus IX-50 microscope (Carsen Group, Markham, Ontario) using a point-scanning confocal microscope from Prairie Technologies LLC (Madison, WI). Excitation was obtained using Argon ion (488 nm) and Helium-Neon (633 nm) lasers. Image stacks were collected with a 1 μm slice thickness and reconstructed using Metamorph software from Universal Imaging Corporation (Downington, PA). Images were deconvolved using a nearest neighbour algorithm.

Electrophysiology. Patch-clamp recordings were obtained at room temperature from single isolated neurons in whole-cell mode using a PC-505 patch-clamp amplifier (Warner Instruments Corporation, Hamden, CT), as previously described (Congar et al. 2002). Data was digitized using a Digidata 1200 board and Clampex 7 software from Axon Instruments (Foster City, CA). Coverslips were mounted in a recording chamber and perfused with saline containing (in mM): NaCl (140), KCl (5), MgCl_2 (2), CaCl_2 (2), HEPES (10), sucrose (6), glucose (10), pH 7.35, 300 mOsm. To evoke synaptic currents, isolated neurons, 9 to 14 days old, were depolarized to +10 mV for 1ms, thus generating an unclamped action potential that propagated along the axon to activate synapses established on the neuron's own dendrites (autapses). Recorded neurons were confirmed to be dopaminergic by post-recording immunocytochemical staining for tyrosine hydroxylase.

Single-cell collection and RT-mPCR. Borosilicate glass tubing were heat-sterilized and patch pipettes were pulled to a resistance of 4-6M Ω . Recordings were obtained from cultured mesencephalic neurons and the cells' cytoplasm was aspirated as previously described (Cauli et al. 1997). The collected cytoplasm was immediately expelled into a prechilled PCR microtube containing 15 U Ribonuclease Inhibitor (Takara Biomedicals, Otsu, Japan) and 8.3 mM dithiothreitol, mixed, frozen on dry ice, and stored at -80°C until use. Reverse transcription was carried out overnight at 42°C in the presence of 50 pmoles of random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1X First Strand

Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0.5 mM dNTP, 100 U SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (all from Invitrogen), 20 U Ribonuclease Inhibitor and 10 mM dithiothreitol. After the denaturation of the reverse transcriptase at 70°C, the RNA complementary to the cDNA was removed by incubating 20 min with 2 U Ribonuclease H (Takara Biomedicals). For multiplex PCR, a two-step protocol modified from the one we have previously published was used (Puma et al. 2001). Briefly, the whole reverse transcription reaction was added to the first-round PCR which contained 10 µl 10x PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 2 U Platinum Taq DNA polymerase (all from Invitrogen), and 10 pmoles of each of the 5 first-round primer pairs in a final volume of 100 µl. The first step of 20 cycles (94°C, 30s; 60°C, 30s; 72°C, 35s) was followed by an identical second round of 45 cycles except that specific cDNAs were amplified from 4% of the first round products using a single pair of primers in separate PCR microtubes in reactions containing 200 µM dNTP. The following oligonucleotide primers were used (5' to 3' direction): for TH, CTGTCCGCCCGTGATTTTCTGG sense and CGCTGGATGGTGTGAGGGCTGT antisense (first round), and GGGGCCTCAGATGAAGAAATTGAAAAA sense and AGAGAATGGGCGCTGGATACGA antisense (second round); for VGLUT1, CCGGCAGGAGGAGTTTCGGAAG sense and AGGGATCAACATATTTAGGGTGGAGGTAGC antisense (first round), and TACTGGAGAAGCGGCAGGAAGG sense and CCAGAAAAAGGAGCCATGTATGAGG antisense (second round); for VGLUT2, TGTCTGGCTTCTGGTGTCTTACGAGAG sense and TTCCCGACAGCGTGCCAACA antisense (first round), and AGGTACATAGAAGAGAGCATCGGGGAGA sense and CACTGTAGTTGTTGAAAGAATTTGCTTGCTC antisense (second round); for VGLUT3, AGGAGTGAAGAATGCCGTGGGAGAT sense and ACCCTCCACCAGACCCTGCAAA antisense (first round), and GATGGGACCAACGAGGAGGGAGAT sense and TGAAATGAAGCCACCGGAATTTGT antisense (second round); and for GAD67,

TTTGGATATCATTGGTTTAGCTGGCGAAT sense and
TTTTTGCCTCTAAATCAGCTGGAATTATCT antisense (first and second rounds). All primer pairs (custom made by Medicorp, Montréal, Qc, Canada or Invitrogen) were designed to flank at least one intron in rat or human genomic sequences according to the NCBI GenBank sequence database. Positive controls for all RT-PCR primers were obtained using mRNA extracted from adult rat striatum. The presence of TH mRNA (Melia et al. 1994) and of VGLUT1-2-3 mRNA (Danik et al. 2003; Gras et al. 2002) in this tissue has been demonstrated previously.

Drugs. Except otherwise stated, all drugs and chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO).

RESULTS

Establishment of glutamatergic synaptic contacts by DA neurons. As previously reported (Sulzer et al. 1998; Bourque and Trudeau 2000; Congar et al. 2002), isolated DA neurons in primary culture establish synaptic terminals that have the capacity to release glutamate. Synaptic currents were measured by whole-cell patch-clamp recordings from isolated DA neurons (Fig. 1A). DA neurons were identified physiologically by the ability of the D2 receptor agonist quinpirole (1 μ M) to presynaptically inhibit glutamate-mediated excitatory postsynaptic currents (EPSCs) (38,7 \pm 7,6% of control; $p < 0.05$) (Fig. 1B) (Congar et al. 2002). In all such neurons ($n= 4$), evoked EPSCs were blocked by CNQX (5 μ M), a AMPA-type glutamate receptor antagonist (Fig. 1B). Post-recording immunostaining for TH confirmed the DAergic phenotype of all quinpirole-sensitive neurons.

Immunolocalization of VGLUT2 in cultured DA neurons. Immunocytochemical labelling experiments were performed to determine whether the ability of cultured DA neurons to release glutamate is due to expression of one or more of the three recently identified VGLUTs. Double-labelling experiments were first performed on mature neurons (15-17 days in culture) to detect TH together with either VGLUT1, VGLUT2 or VGLUT3. The majority of isolated DA neurons (42 out of 55; 76%) displayed VGLUT2-like immunoreactivity (Fig. 1C). The labelling appeared as large numbers of small varicose-like puncta that decorated the neuron's thick dendritic-like processes (Fig. 1C). The vast majority of VGLUT2-labelled varicosities were also TH-positive (Fig. 1C, 1D). However, in many neurons, it was quite clear that a significant number of TH-positive/VGLUT2-negative varicosities could also be detected along presumed axonal processes emanating from the same neuron (Fig. 1D). These results suggest a partial segregation of TH-positive/VGLUT2-positive and TH-positive/VGLUT2-negative axonal segments and

varicosities. It is to be noted that in many neurons, VGLUT2-positive terminals tended to be closer to the cell body than VGLUT2-negative/TH-positive varicosities (Fig. 1C).

A number of VGLUT2-positive TH-negative neurons were also detected in mesencephalic cultures (not shown). Although VGLUT1 could be detected in a number of TH-negative neurons (Fig. 2A), no detectable expression was found in DA neurons (Fig. 2B).

Immunolocalization of VGLUT3 in 5-HT but not DA neurons in culture. Considering the recently demonstrated expression of VGLUT3 in 5-HT neurons (Fremeau et al. 2002; Gras et al. 2002), the possibility of a similar expression in DA neurons needed to be determined. We found that no DA neurons were labelled by the anti-VGLUT3 antibody (Fig. 2C). However, as expected, cultured 5-HT neurons expressed abundant levels of VGLUT3 (Fig. 2D), not only in fine varicosities, but also at the somatodendritic level. No detectable immunolabelling for VGLUT2 nor for VGLUT1 (not shown) could be detected in isolated 5-HT neurons.

Mesencephalic GABA neurons are immuno-negative for vesicular glutamate transporters. To further examine the cell-specificity of VGLUT2 expression in cultured VTA/SN neurons, we next determined if VTA/SN GABAergic neurons also expressed VGLUT2. GABA-containing neurons were identified by immunostaining for glutamic acid decarboxylase (GAD-67). The labelling was mostly found in presumed axonal varicosities with very little somatic staining (Fig. 3A). Double-labelling experiments were performed to identify GAD-67 together with VGLUT1 or VGLUT2. GABAergic neurons were found to express neither of these vesicular glutamate transporters (Fig. 3A, 3B). VGLUT3 was also absent (not shown). These findings are in accordance with the inability of these neurons to release glutamate, as shown by the complete absence of residual synaptic current after blockade of GABA_A receptors (not shown) (Michel and Trudeau 2000).

Cellular co-expression of VGLUT2 and TH mRNAs. To confirm the expression of VGLUT2 in cultured DA neurons, we patch-clamped neurons, collected their cytoplasm and performed a multiplex RT-PCR amplification of the cell's mRNA to detect the phenotypic markers TH, VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3, GAD65 and GAD67. Of 11 neurons analysed, 6 were confirmed to express TH mRNA and to be negative for GAD65 or GAD67 and were thus considered DAergic. Detectable levels of VGLUT2 mRNA were found in 3 of those neurons (Fig. 4A). These cells were found to be negative for VGLUT1 and VGLUT3 transcripts (Fig. 4A), thus confirming the selective expression of VGLUT2 in DA neurons in culture. Five other neurons were found to contain VGLUT2 mRNA but no detectable levels of the other phenotypic markers (Fig. 4B), suggesting the presence of a sub-population of purely glutamatergic neurons. Positive controls for all RT-PCR primers were obtained using mRNA extracted from adult rat striatum (Fig. 4C).

Time course of appearance of VGLUT2 expression in cultured DA neurons. The ability of DA neurons to express VGLUT2 was examined at time points from 1 to 21 days in culture. An expression at early time points would suggest that these neurons express this protein from the start, or can rapidly turn on this phenotype, while an expression at delayed time points only would be compatible with the hypothesis that VGLUT2 expression requires long-term withdrawal from factors present under *in vivo* conditions. When neurons were examined after only 24h in culture, the proportion of DA neurons immuno-positive for VGLUT2 was already 51% (44 of 86 neurons examined). In addition, the labelling was mostly somatic, even though the neurons had already extended a limited number of neurites (Fig. 4D). At time points ranging from 3 to 21 days in culture (Fig. 4D, 4E), the majority of DA neurons expressed punctate VGLUT2 immunoreactivity (from 69 to 82% of DA neurons). At 3 days, VGLUT2 labelling was somewhat less abundant than at later time points, but it was already mostly varicose-like (Fig. 4D). After 6 days in culture and at later time points, only punctate labelling could be observed (not shown).

Expression of VGLUT2 in a subset of nerve terminals in cultured DA neurons. An important question is whether VGLUT2 is expressed in all nerve terminals established by DA neurons. To determine this, a triple-labelling experiment was performed to localize TH, VGLUT2 and SV2 (Bajjalieh et al. 1992), a ubiquitous synaptic vesicle protein (Floor and Feist 1989). We found that the vast majority of VGLUT2-positive varicosities in isolated DA neurons also express SV2 (Fig. 5A, 5B), thus confirming that VGLUT2 labelling mostly originates from nerve terminals. However, it was also clear that DA neurons expressed a large number of nerve terminals (SV2-positive) that were VGLUT2-negative (Fig. 5B), thus providing evidence for a partial segregation.

DISCUSSION

The principal conclusion of this work is that postnatal DA neurons have the potential to express one of the vesicular glutamate transporters, namely VGLUT2, thus providing an explanation for their demonstrated ability to release glutamate in addition to DA at synapses in culture. The expression of VGLUT2 in DA neurons is selective inasmuch as VGLUT1 and VGLUT3 were not detected.

Our finding that 5-HT neurons, cultured under the same conditions and with the same mesencephalic astrocytes as the DA neurons, express VGLUT3 rather than VGLUT2, confirms recent data obtained in culture and *in vivo* (Schafer et al. 2002; Gras et al. 2002; Fremeau et al. 2002). However, our finding that DA neurons in culture express VGLUT2 stands in relative opposition to the reports that mesencephalic DA neurons in adult rats do not express detectable levels of mRNA for this transporter, as shown by *in situ* hybridization (Fremeau et al. 2001; Herzog et al. 2001). However, northern blot analysis has reported the presence of VGLUT2 mRNA in substantia nigra (Aihara et al. 2000). These authors also reported that VGLUT2 mRNA was very abundant in foetal rat brain. Considering that our primary cultured neurons were prepared from neonatal (P0-P2) animals, one potential interpretation of this discrepancy is that VGLUT2 is expressed early in development in DA neurons, with its mRNA levels decreasing gradually during the postnatal period. A detailed set of *in situ* hybridization experiments in developing brain will be required to test this hypothesis. An alternate hypothesis is that the ability of DA neurons to express VGLUT2 mRNA may require a perturbation of normal developmental conditions. As such, it will be interesting to evaluate the expression of VGLUT2 mRNA in pathophysiological animal models implicating DA neurons. Additional experiments both in culture and *in vivo* will also be necessary to identify some of the regulatory signals that control transcription of the VGLUT2 gene. Finally, it should be noted that although VGLUT2 mRNA levels are undetectable by standard *in situ* hybridization labelling in adult rodent brain, this by no means excludes that low level expression of this gene still occurs in

adult animals at a level sufficient to maintain the capacity of at least a proportion of DA neurons to release glutamate in addition to DA. An ultrastructural analysis of the presence of VGLUT2 protein in the axon terminals of DA neurons in the striatum *in vivo* could help to test this hypothesis.

We found the majority of isolated DA neurons to be immunopositive for VGLUT2 protein. Modest immunostaining for VGLUT2 has also previously been reported in the SN compacta and VTA (Fremeau et al. 2001; Varoqui et al. 2002). However, this expression has not been demonstrated conclusively to be present in the cell bodies of DA neurons as opposed to synaptic terminals originating from other brain areas and terminating onto DA neurons or local GABA neurons. Considering the predominantly terminal nature of VGLUT2 expression, it may be extremely difficult to prove conclusively by immunostaining that any given neuron's cell body is positive for this transporter in intact tissue. In addition, the possibility that astrocytes are responsible for some of the immunoreactivity to VGLUT2 *in vivo* has also not been examined directly. A background level of VGLUT2 immunostaining in astrocytes was detected in our experiments (not shown), but this signal was much lower than the neuronal signal. RT-PCR and immunostaining experiments in purified astrocyte preparations might be useful to evaluate the specificity of this signal.

In the current set of experiments, we found that ~80% of isolated DA neurons display VGLUT2 immunoreactivity. However, in single-cell RT-PCR experiments, VGLUT2 mRNA could be detected in only half of the recorded DA neurons, although TH mRNA could be detected in all. This modest discrepancy most likely results from variable efficiency of cytoplasm aspiration, making it more difficult to detect less abundant mRNA species such as that for VGLUT2.

Our findings consolidate the concept of co-transmission in neurons releasing two small molecule neurotransmitters. The demonstration that only a subset of the neurons' synaptic terminals appear to express VGLUT2 argues for the hypothesis that DA neurons in culture can extend axonal segments that differentially contain or exclude VGLUT2. Our

conclusion is compatible with previous data suggesting that glutamate immunoreactivity, although present in most processes of cultured DA neurons, is also found in a limited subset of TH-negative processes localized close to the cell body (Sulzer et al. 1998). This phenotypic heterogeneity between different sets of terminals expressed by a single neuron is an interesting biological problem. Although speculative, our observation that VGLUT2-positive terminals appear to be closer to the cell body than VGLUT2-negative varicosities, argues for the existence of some local instructive cue that may originate from the cell body and act in some paracrine fashion to promote the establishment of local glutamatergic terminals by the neurons. Such cues could perhaps drive the establishment of glutamate-releasing terminals by DA neurons *in vivo* during early development. Ultrastructural studies are required to more precisely evaluate the relationship between VGLUT2-positive and VGLUT2-negative terminals along specific axonal segments in cultured DA neurons and to determine the differential localization of VGLUT2-containing and vesicular monoamine transporter (VMAT2)-containing vesicles in single terminals.

In summary, our data provide a logical explanation for the ability of cultured DA neurons to release glutamate at synapses in addition to DA. Together with the recent demonstration that 5-HT neurons (Gras et al. 2002; Fremeau et al. 2002) and a subset of noradrenergic neurons (Stornetta et al. 2002b; Stornetta et al. 2002a) also express vesicular glutamate transporters, our findings support the hypothesis that glutamate co-transmission in monoaminergic neurons is a general phenomenon rather than an exception. A detailed analysis of the conditions under which DA neurons gain or lose the capacity to release glutamate may provide novel insight into pathophysiological processes that underlie diseases such as schizophrenia, Parkinson's disease and drug dependence.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by grant MOP-49591 from the Canadian Institutes of Health Research to L.-E.T. The authors acknowledge the help of Marie-Josée Bourque for the preparation and maintenance of cell cultures and for help with some of the immunostaining experiments. The antibody against VGLUT3 was generously provided by Dr. Salah El Mestikawy from INSERM U513, Créteil, France.

REFERENCES

- Aihara Y., Mashima H., Onda H., Hisano S., Kasuya H., Hori T., Yamada S., Tomura H., Yamada Y., Inoue I., Kojima I., and Takeda J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* **74**, 2622-5.
- Bai L., Xu H., Collins J. F., and Ghishan F. K. (2001) Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* **276**, 36764-9.
- Bajjalieh S. M., Peterson K., Shinghal R., and Scheller R. H. (1992) SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science* **257**, 1271-3.
- Bellocchio E. E., Reimer R. J., Fremeau R. T. Jr, and Edwards R. H. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**, 957-60.
- Bourque M. J. and Trudeau L. E. (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* **12**, 3172-3180.
- Cauli B., Audinat E., Lambolez B., Angulo M. C., Ropert N., Tsuzuki K., Hestrin S., and Rossier J. (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* **17**, 3894-906.
- Congar P., Bergevin A., and Trudeau L. E. (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of k(+) channels. *J Neurophysiol* **87**, 1046-56.
- Danik M., Puma C., Quirion R., and Williams S. (2003) Widely expressed transcripts for chemokine receptor CXCR1 in identified glutamatergic, gamma-aminobutyric acidergic, and cholinergic neurons and astrocytes of the rat brain: a single-cell reverse transcription-

multiplex polymerase chain reaction study. *J Neurosci Res* **74**, 286-95.

Floor E. and Feist B. E. (1989) Most synaptic vesicles isolated from rat brain carry three membrane proteins, SV2, synaptophysin, and p65. *J Neurochem* **52**, 1433-7.

Freneau R. T. Jr, Burman J., Qureshi T., Tran C. H., Proctor J., Johnson J., Zhang H., Sulzer D., Copenhagen D. R., Storm-Mathisen J., Reimer R. J., Chaudhry F. A., and Edwards R. H. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14488-93.

Freneau R. T. Jr, Troyer M. D., Pahner I., Nygaard G. O., Tran C. H., Reimer R. J., Bellochio E. E., Fortin D., Storm-Mathisen J., and Edwards R. H. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* **31**, 247-60.

Fu W. M. (1995) Regulatory role of ATP at developing neuromuscular junctions. *Prog Neurobiol* **47**, 31-44.

Furshpan E. J., MacLeish P. R., O'Lague P. H., and Potter D. D. (1976) Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4225-9.

Gras C., Herzog E., Bellenchi G. C., Bernard V., Ravassard P., Pohl M., Gasnier B., Giros B., and El Mestikawy S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* **22**, 5442-51.

Hayashi M., Otsuka M., Morimoto R., Hirota S., Yatsushiro S., Takeda J., Yamamoto A., and Moriyama Y. (2001) Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J Biol Chem* **276**, 43400-6.

- Herzog E., Bellenchi G. C., Gras C., Bernard V., Ravassard P., Bedet C., Gasnier B., Giros B., and El Mestikawy S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* **21**, RC181.
- Johnson M. D. (1994a) Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron* **12**, 433-442.
- Johnson M. D. (1994b) Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture. *Neuroscience* **63**, 775-787.
- Joyce M. P. and Rayport S. (2000) Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience* **99**, 445-456.
- Melia K. R., Trembleau A., Oddi R., Sanna P. P., and Bloom F. E. (1994) Detection and regulation of tyrosine hydroxylase mRNA in catecholaminergic terminal fields: possible axonal compartmentalization. *Exp Neurol* **130**, 394-406.
- Michel F. J. and Trudeau L. E. (2000) Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* **39**, 1536-1543.
- Morel N. and Meunier F. M. (1981) Simultaneous release of acetylcholine and ATP from stimulated cholinergic synaptosomes. *J Neurochem* **36**, 1766-73.
- Ni B., Wu X., Yan G. M., Wang J., and Paul S. M. (1995) Regional expression and cellular localization of the Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. *J Neurosci* **15**, 5789-99.
- Puma C., Danik M., Quirion R., Ramon F., and Williams S. (2001) The chemokine interleukin-8 acutely reduces Ca(2+) currents in identified cholinergic septal neurons expressing CXCR1 and CXCR2 receptor mRNAs. *J Neurochem* **78**, 960-71.

- Rayport S. (2001) Glutamate is a cotransmitter in ventral midbrain dopamine neurons. *Parkinsonism and Related Disorders* **7**, 261-264.
- Russier M., Kopysova I. L., Ankri N., Ferrand N., and Debanne D. (2002) GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons in vitro. *J Physiol* **541**, 123-37.
- Schafer M. K., Varoqui H., Defamie N., Weihe E., and Erickson J. D. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* **277**, 50734-48.
- Schweitzer E. (1987) Coordinated release of ATP and ACh from cholinergic synaptosomes and its inhibition by calmodulin antagonists. *J Neurosci* **7**, 2948-56.
- Stornetta R. L., Sevigny C. P., and Guyenet P. G. (2002a) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J Comp Neurol* **444**, 191-206.
- Stornetta R. L., Sevigny C. P., Schreihofer A. M., Rosin D. L., and Guyenet P. G. (2002b) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. *J Comp Neurol* **444**, 207-20.
- Sulzer D., Joyce M. P., Lin L., Geldwert D., Haber S. N., Hattori T., and Rayport S. (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* **18**, 4588-4602.
- Sulzer D. and Rayport S. (2000) Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* **19**, 45-52.
- Takamori S., Malherbe P., Broger C., and Jahn R. (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* **3**, 798-803.

Takamori S., Rhee J. S., Rosenmund C., and Jahn R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189-94.

Takamori S., Rhee J. S., Rosenmund C., and Jahn R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* **21**, RC182.

Varoqui H., Schafer M. K., Zhu H., Weihe E., and Erickson J. D. (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* **22**, 142-55.

Wu L. J., Li Y., and Xu T. L. (2002) Co-release and interaction of two inhibitory co-transmitters in rat sacral dorsal commissural neurons. *Neuroreport* **13**, 977-81.

Figure

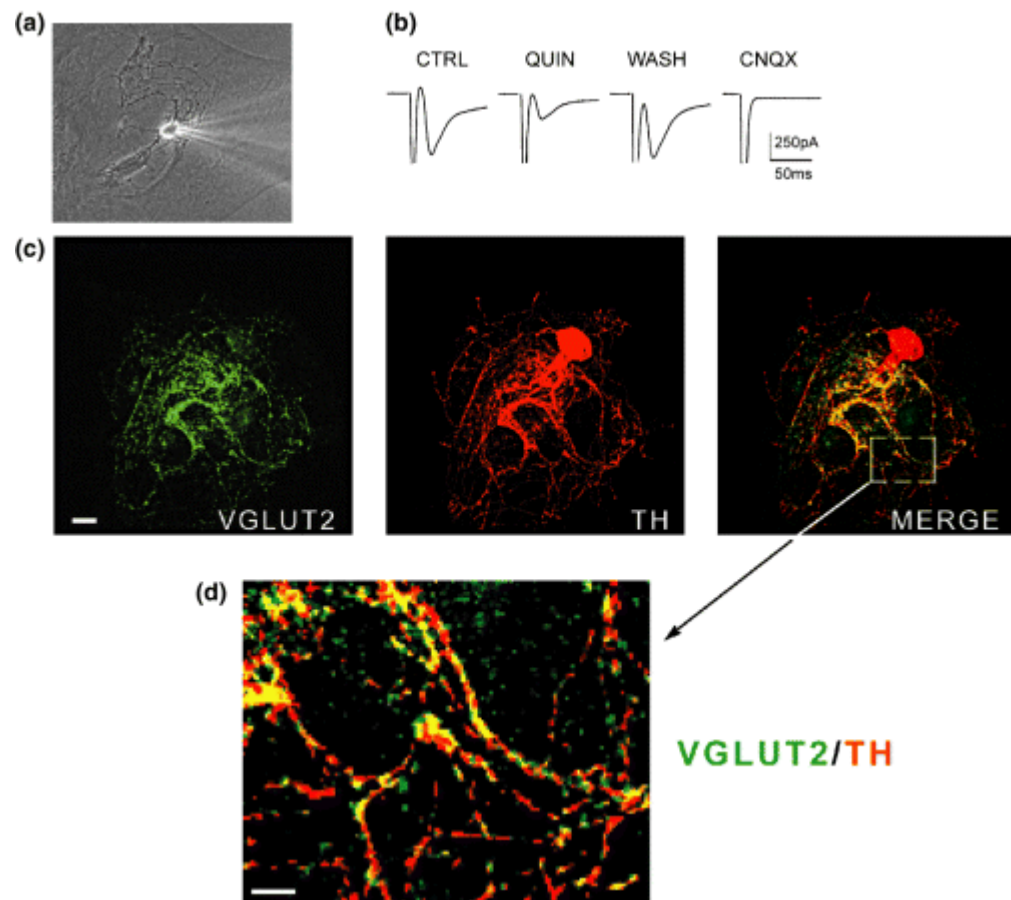


Figure 1 Expression of VGLUT2 by isolated DA neurons in culture.

(A) Phase contrast image of an isolated mesencephalic neuron. Note the presence of a patch pipette on the right, next to the phase-bright cell body of the neuron. Scale bar: 15 μm .

(B) A single DA neuron in microculture was recorded by whole-cell patch-clamp. From a holding potential of -70 mV, a brief depolarization to $+20$ mV induced an unclamped action potential (clipped) followed by a rapid EPSC. The amplitude of this EPSC was inhibited by quinpirole, a D2 receptor agonist and completely blocked by CNQX (5 μM), a AMPA/kainate glutamate receptor antagonist.

(C) Confocal image showing VGLUT2 immunolabelling (green) in a TH-positive (red) DA neuron in culture. The merged image (right) shows that most of the VGLUT2 staining is found on TH-positive processes (yellow). Note the punctate, non-somatic expression of VGLUT2. Scale bar: 15 μm .

(D) Enlargement from the merged image shown in C. Note that although most VGLUT2-positive structures were TH-positive (yellow), a number of TH-positive varicosities were VGLUT2-negative (red puncta). Scale bar: 4 μm .

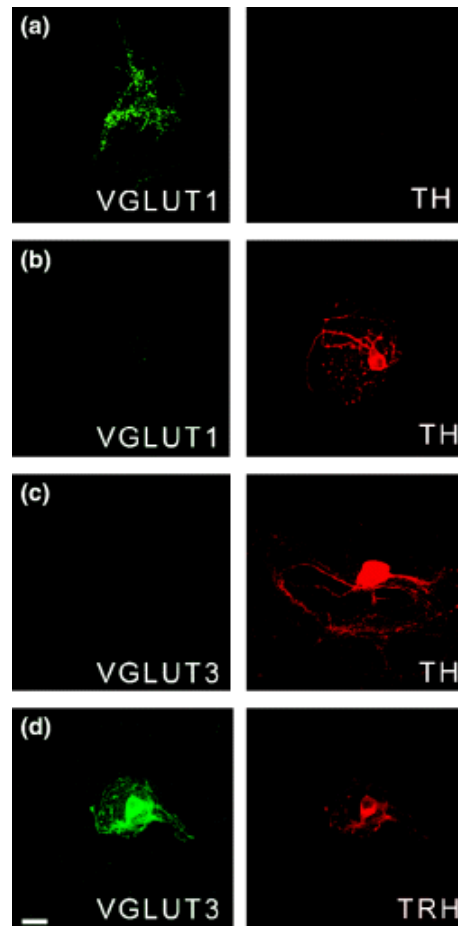


Figure 2 Dopamine neurons in culture do not express VGLUT1 or VGLUT3.

- (A) Confocal image showing VGLUT1 immunoreactivity (green) in an isolated mesencephalic neuron. This neuron was TH-negative and thus not DAergic. Scale bar: 15 μ m.
- (B) Absence of VGLUT1 immunoreactivity in an isolated DA neuron, confirmed to be DAergic by immunolabelling for TH (red). Scale bar: 15 μ m.
- (C) Isolated DA neurons (TH) (red) are immunonegative for VGLUT3. Scale bar: 15 μ m.
- (D) Serotonin neurons, identified by the expression of TRH (red), were double-labelled for VGLUT3 (green). Scale bar: 15 μ m.

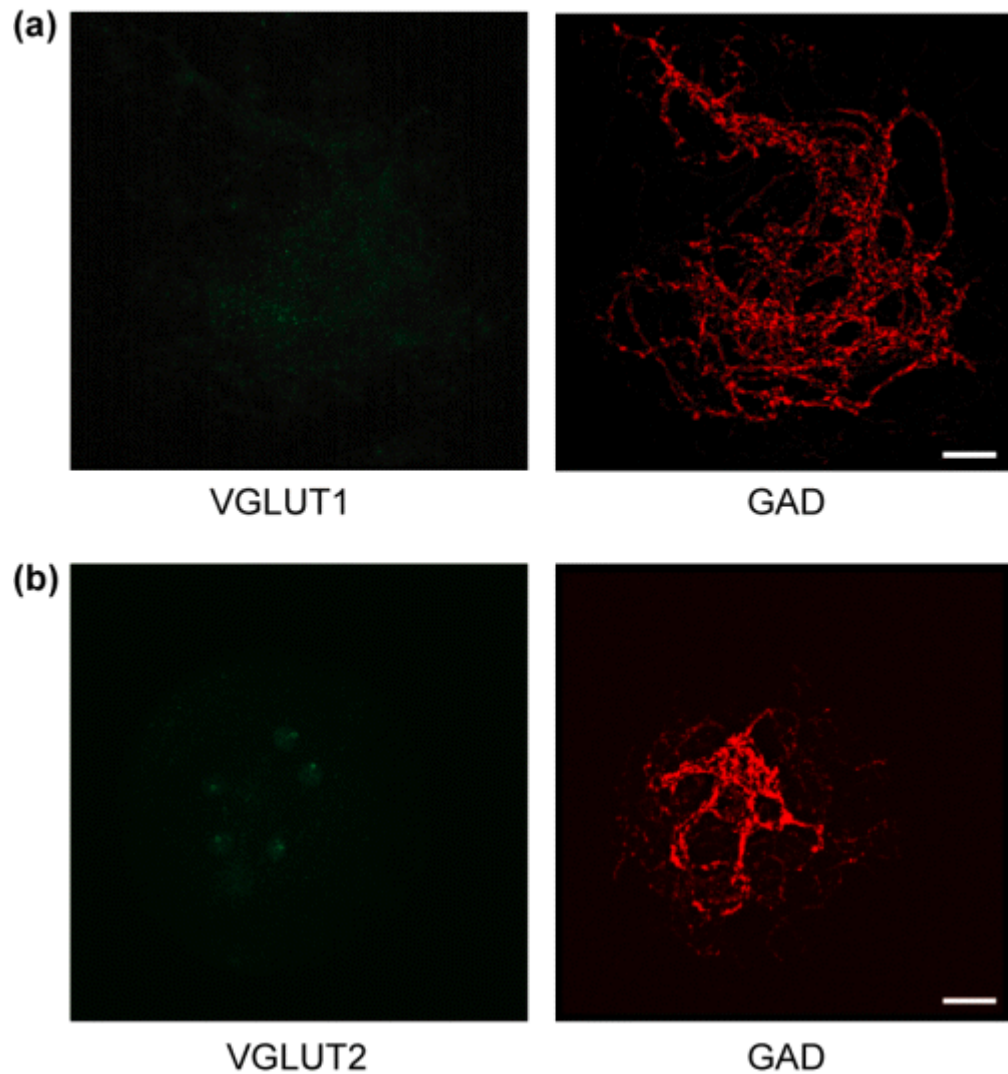


Figure 3 Mesencephalic GABA neurons do not express vesicular glutamate transporters.

- A)** Confocal images showing expression of glutamic acid decarboxylase (GAD) in an isolated neuron (red). This neuron was immunonegative for VGLUT1 (left image). Note the exclusively punctate nature of the GAD-67 labelling in presumed GABAergic nerve terminals. Scale bar: 15 μ m.
- B)** Confocal images showing expression of GAD in an isolated neuron (red). This neuron was immunonegative for VGLUT2 (left image). Scale bar: 15 μ m.

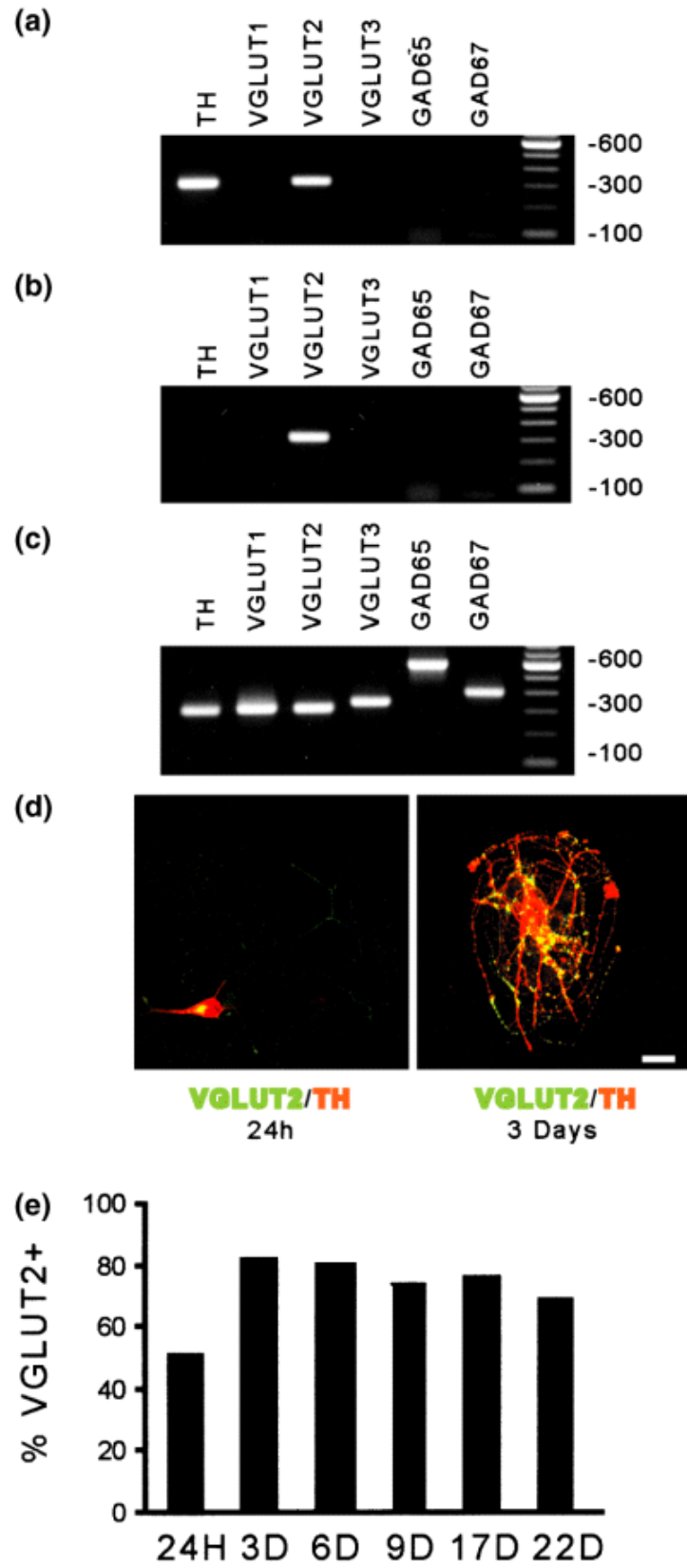


Figure 4 Detection of VGLUT2 mRNA in DA neurons by single-cell RT-mPCR.

- (A) Expression profile of an individual cultured mesencephalic DA neuron. Fifteen μ l of each second round PCR were analyzed on a 1.7% agarose gel with 1 μ g of molecular size standards (100 bp DNA ladder; right lane). Expected size of PCR products in base pairs: TH (301), VGLUT1 (311), VGLUT2 (315), VGLUT3 (345), GAD65 (599) and GAD67 (401). Note that both TH and VGLUT2 mRNA could be detected in this neuron.
- (B) Putative glutamatergic mesencephalic neuron showing expression of VGLUT2 mRNA only.
- (C) Positive control obtained using mRNA extracted from adult rat striatum.
- (D) Confocal image showing expression of VGLUT2 (green) in an isolated TH-positive (red) DAergic neuron, 24h after cell dissociation (left image). Note the somatic and apparently intracellular localization of the signal. The right image shows VGLUT2 expression (green) in a TH-positive neuron (red) after 3 days in culture. Note the predominantly punctate nature of the labelling. Scale bar: 15 μ m.
- (E) Summary data representing the percentage of isolated DA neurons found to be immuno-positive for VGLUT2 after different times in culture.

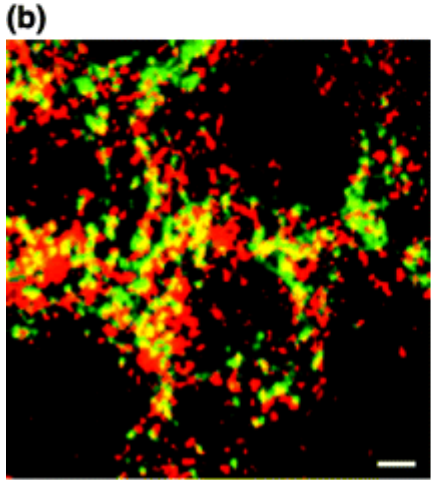
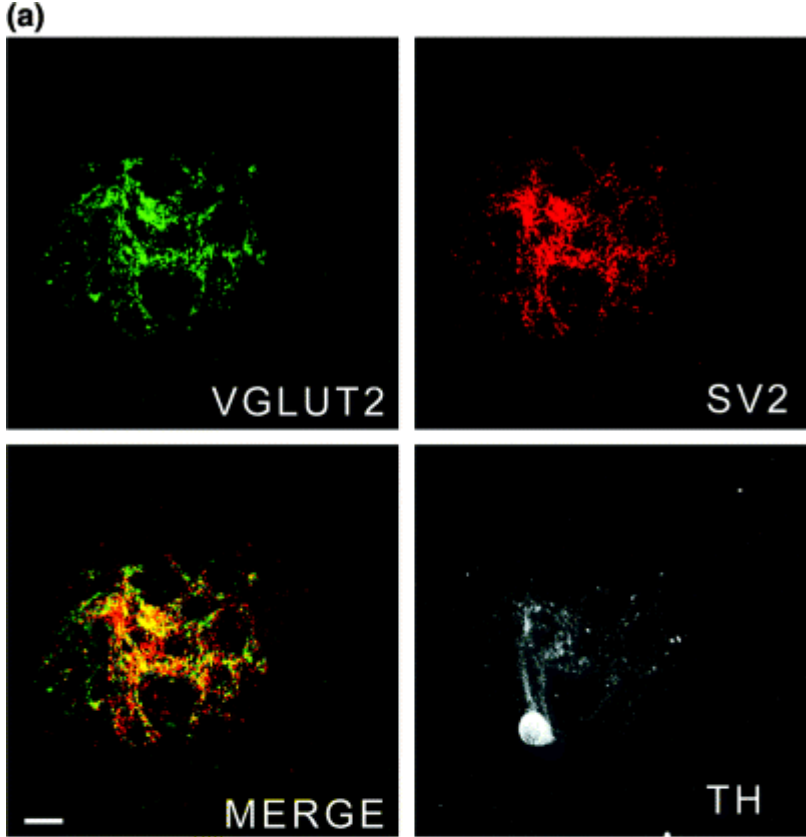


Figure 5 Expression of VGLUT2 in a subset of nerve terminals established by DA neurons.

- (A)** VGLUT2 immunoreactivity (green) in an isolated DA neuron (upper left image). SV2 immunoreactivity in nerve terminals established by the same neuron is shown in red (upper right image). The merged image shows the colocalization (yellow) of VGLUT2 (green) and SV2 (red) (lower left image). The lower right image provides a phenotypic identification of the same neuron by its immunoreactivity for TH. Scale bar: 15 μm .
- (B)** Blow-up of a region of the merged image illustrating that most VGLUT2-positive structures are also SV2-positive (yellow). Note also that a number of SV2-positive terminals are VGLUT2-negative (red). Scale bar: 4 μm .

ARTICLE 2

ENHANCED GLUTAMATERGIC PHENOTYPE OF MESENCEPHALIC DOPAMINE NEURONS AFTER NEONATAL 6-HYDROXYDOPAMINE LESION

Grégory DAL BO¹, Noémie BÉRUBÉ-CARRIÈRE², Jose Alfredo MENDEZ¹, Damiana Leo¹,
Mustapha RIAD², Laurent DESCARRIES^{2,3,4}, Daniel LÉVESQUE⁵, Louis-Eric TRUDEAU^{1,4}

Departments of¹ Pharmacology, ² Pathology and Cell Biology, and ³ Physiology,
Faculty of Medicine; ⁴ Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central;
⁵ Faculty of Pharmacy; Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Running title: **Glutamatergic phenotype of dopamine neurons**

Neuroscience, 2008, 156(1): 59-70.

ABSTRACT

There is increasing evidence that a subset of midbrain dopamine (DA) neurons uses glutamate as a co-transmitter and expresses VGLUT2, one of the three vesicular glutamate transporters. In the present study, double *in situ* hybridization was used to examine tyrosine hydroxylase (TH) and VGLUT2 mRNA expression during the embryonic development of these neurons, and postnatally, in normal rats and rats injected with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) at P4 to partially destroy DA neurons. At embryonic days 15 and 16, there was a regional overlap in the labeling of TH and VGLUT2 mRNA in the ventral mesencephalon, which was no longer found at late embryonic stages (E18-E21) and postnatally. In normal pups from P5 to P15, only 1-2% of neurons containing TH mRNA in the ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra, pars compacta, also displayed VGLUT2 mRNA. In contrast, after the cerebroventricular administration of 6-OHDA at P4, 26% of surviving DA neurons in the VTA of P15 rats co-expressed VGLUT2. To search for a colocalization of TH and VGLUT2 protein in axon terminals of these neurons, the nucleus accumbens of normal and 6-OHDA-lesioned P15 rats was examined by electron microscopy after dual immunocytochemical labeling. In normal rats, VGLUT2 protein was found in 28% of TH positive axon terminals in the core of nucleus accumbens. In 6-OHDA-lesioned rats, the total number of TH positive terminals was considerably reduced, and yet the proportion also displaying VGLUT2 immunoreactivity was modestly but significantly increased (37%). These results lead to the suggestion that the glutamatergic phenotype of VTA DA neurons is highly plastic, repressed toward the end of normal embryonic development, and derepressed postnatally following injury. They also support the hypothesis of a co-release of glutamate by mesencephalic neurons *in vivo*, at least in the developing brain.

Keywords: dopamine, glutamate, VGLUT2, 6-OHDA, mesencephalon, nucleus accumbens

The dopamine (DA) system is known to be critical for motor control and many aspects of cognition. It is implicated in Parkinson's disease and neuropsychiatric disorders, including schizophrenia and addiction. In the last 10 years, considerable evidence has accrued for glutamate co-transmission by central DA neurons. For example, release of glutamate was demonstrated to occur at autapses established by isolated DA neurons in culture (Sulzer et al., 1998; Bourque and Trudeau, 2000; Joyce and Rayport, 2000) and stimulation of presumed DA neurons in the ventral tegmental area (VTA) was shown to evoke glutamatergic synaptic responses in neurons of the nucleus accumbens (nAcb) and prefrontal cortex (Chuhma et al., 2004; Lavin et al., 2005). In addition, mesencephalic DA neurons in culture were shown to express VGLUT2 (Dal Bo et al., 2004), one of the three vesicular glutamate transporters (Ni et al., 1995; Bellocchio et al., 1998; Hisano et al., 2000; Aihara et al., 2000; Herzog et al., 2001; Fremeau et al., 2001; Varoqui et al., 2002; Gras et al., 2002).

In two recent *in situ* hybridization studies, expression of VGLUT2 mRNA by mesencephalic DA neurons has been demonstrated in intact tissue (Kawano et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007). In the first study, the authors reported that as much as 19% of tyrosine hydroxylase (TH) immunopositive neurons of the VTA (A10 cell group) also expressed VGLUT2 mRNA (Kawano et al., 2006). In the second study, the authors found that only 0.1% of neurons expressing TH mRNA in this region, also contained VGLUT2 mRNA (Yamaguchi et al., 2007). This large difference in proportion remains to be explained, but could reflect technical differences in experimental approach. In any case, both studies indicated a striking difference between *in vivo* and *in vitro* data, since a majority (80%) of isolated mesencephalic DA neurons in culture have been shown to express VGLUT2 (Dal Bo et al., 2004). In line with previous results demonstrating plasticity of the transmitter phenotype of neurons during development and in responses to changes in neuronal activity (Furshpan et al., 1976; Borodinsky and Spitzer, 2007; Borodinsky et al., 2004; Yang et al., 2002; Gillespie et al., 2005; Trevino and Gutierrez, 2005; Gutierrez and Heinemann, 2006; Gomez-Lira et al., 2005), this discrepancy between

the *in vivo* and *in vitro* data is best resolved by hypothesizing that VGLUT2 expression in DA neurons is regulated during development, and may be activated in response to trauma, such as tissue dissociation and culture or a partial lesion *in vivo*.

To investigate the glutamatergic phenotype of developing mesencephalic DA neurons *in vivo*, we used double *in situ* hybridization for tyrosine hydroxylase (TH) mRNA and each subtype of VGLUT transcripts in pre- and post-natal rats, as well as double labeling immuno-electron microscopy with specific antibodies against TH and VGLUT2 in 15 day-old pups. Intact rats as well as rats subjected to neonatal intra-cerebroventricular (i.c.v.) administration of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) were examined in order to evaluate the effects of an early injury on the transmitter phenotype of surviving DA neurons.

We confirm that a small subset of mesencephalic DA neurons selectively expresses VGLUT2 mRNA, but not VGLUT1 nor VGLUT3, and suggest that the glutamatergic phenotype of these neurons is repressed during late embryonic development and may be derepressed in response to early postnatal injury. By visualizing both TH and VGLUT2 proteins in the same axon terminals of the nAcb, we also provide strong evidence for the capacity of mesencephalic DA neurons to release both DA and glutamate *in vivo*, at least in developing brain.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All procedures involving animals and their care were conducted in strict accordance with the Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Ed2) of the Canadian Council on Animal Care. The experimental protocols were approved by the animal ethics committee (CDEA) of the Université de Montréal. Sprague-Dawley male rats and pregnant dams were purchased from Charles River (Montreal, QC, Canada) and housed at a constant temperature (21°C) and humidity (60%), under a fixed 12 hours light/dark cycle, with free access to food and water.

Neonatal 6-hydroxydopamine lesions

Neonatal 6-OHDA lesions were produced as previously described (Stachowiak et al., 1984; Jackson et al., 1988; Fernandes Xavier et al., 1994). Four day-old pups received a subcutaneous injection of desipramine (50 µl, 5.6 mg/ml in aCSF) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 45 min before toxin injection to protect noradrenergic neurons. The toxin (6-hydroxydopamine hydrochloride, Sigma), was dissolved (10 mg/ml) in aCSF containing 0.2% ascorbic acid to prevent oxidation. Pups were anesthetized on ice, immobilized on a cold body mould, and administered 5 µl of 6-OHDA solution in each lateral brain ventricle (stereotaxic coordinates: L ± 1.5 mm, AP 0 mm to Bregma, and V 3.3 mm below the dura), at a rate of approximately 1.5 µl /min. The intraventricular injections were made with a 30-gauge needle attached to a 10 µl Hamilton syringe. The syringe was left in place for 3 min after each injection. Sham controls were injected with vehicle under the same conditions. The pups were then warmed in a humidified box and returned to their mother two hours later. They were maintained with their mother until sacrifice, 11 days post-surgery (at P15).

Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry

TH immunohistochemistry was used to verify the extent of 6-OHDA lesions. After 48 h of fixation in PFA, 24 µm-thick transverse sections of the forebrain were cut with a VT1000s vibratome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), rinsed in PBS (3x10 min)

and then incubated in 5% goat serum solution containing 10% BSA and 0.1% Triton X-100 for 1 h, in order to block non-specific labeling. Sections across the striatum were incubated overnight in mouse monoclonal TH antibody (Clone TH-2, Sigma) diluted 1/1000 in PBS. The signal was detected with biotinylated anti-mouse antibodies (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) diluted 1/1000, followed by 1/1000 streptavidin-HRP (Jackson). After 3 x 10 min washes in PBS, followed by 2 x 10 min washes in Tris-HCl (50 mM, pH 7.4). The peroxidase reaction was revealed with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma) and hydrogen peroxide (0.01%) in Tris-HCl. The DAB reaction was stopped by immersion in Tris-HCl.

Double *in situ* hybridization

The double *in situ* hybridization technique (Beaudry et al., 2000) was used in rat embryos as well as in normal P5, P10 and P15 rat pups, and in 6-OHDA-lesioned P15 rats and their sham controls.(Cossette et al., 2004; St-Hilaire et al., 2005). The embryos were removed from gestating dams under isoflurane anesthesia (isoflurane 2%, O₂ 1.8 l/min), on days 14, 15, 18 and 21 of gestation. They were immersed in frozen isopentane, and stored at - 80°C until used. The postnatal rats were anesthetized with halothane and their brain was quickly dissected out, immersed in cold phosphate-buffered saline (PBS, 50 mM, pH 7.4), and cut in two parts at the level of the median eminence. The rostral part containing the striatum was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) solution for 48 h and processed for immunohistochemistry as described below. The caudal part containing the mesencephalon was immersed in frozen isopentane and stored at - 80°C until used.

[³⁵S]UTP-labeled VGLUT1, 2 or 3 probes, and a nonradioactive digoxigenin (Dig)-labeled tyrosine hydroxylase probe were prepared as follows. Complementary RNA (cRNA) probes for each VGLUT subtype were synthesized from pCRII-Topo plasmids containing a fragment of each VGLUT cDNA. cDNA fragment sizes were 519, 539 and 415 base pairs for VGLUT1, 2 and 3, respectively (Herzog et al., 2001; Gras et al., 2002). Antisense probes were produced by linearization of the plasmid using the *Not* I restriction enzyme and SP₆ polymerase, and synthesized with the Promega riboprobe kit (Promega,

Madison, WI, USA) and [³⁵S]UTP (Perkin-Elmer, Mississauga, ON, Canada). For sense probes, the *Hind* III restriction enzyme was used to linearize the plasmid, and probes were synthesized with T₃ polymerase. Labeled probes were purified with mini QuickSpin RNA columns (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). The Dig-labeled TH probe was generated as previously described (Cossette et al., 2004). Both Dig-labeled TH (20 ng/ml) and specific radioactive-labeled VGLUT probes (2 x 10⁶ CPM) were included simultaneously in the hybridization solution.

Transverse sections of the mesencephalon (12 µm-thick) were cut with a cryostat, mounted on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Toronto, ON, Canada), and stored at - 80°C until used. Before hybridization, slides were fixed in 4% PFA for 20 min and rinsed 3 times in PBS. *In situ* hybridization was performed overnight at 58°C. To reduce non specific Dig labeling, an additional step was added to standard post hybridization treatments: immersion in a 50% formamide solution in 2x saline-sodium citrate buffer (SSC, 300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7 in DEPC water) for 30 min at 60°C. The slides were then immersed for 30 min in blocking solution containing 2% BSA and 0.3% Triton X-100 in buffer A solution (100 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 150 mM NaCl), covered with 100 µl of an anti-Dig antibody conjugated to alkaline phosphatase (Roche Diagnostics) diluted 1/200 in buffer A, and placed at 4°C overnight. After 3 rinses (10 min) in buffer A, the Dig was revealed in buffer B (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl and 50 mM MgCl₂) containing 0.4 mM nitroblue tetrazolium chloride, 0.45 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Dig detection kit, Roche Diagnostic) and 1mM levamisole, for 30 min at room temperature, in the dark. The Dig reaction was stopped by immersion in buffer C (100 mM Tris-HCl, pH 8 and 1 mM EDTA). After 3 additional washes with distilled water, slides were air-dried, and apposed against BiomaxMR radioactive-sensitive film (Kodak, New Haven, CT, USA) for 3 days. Following film exposition, the slides were coated by dipping with LM-1 photographic emulsion (Amersham, ON, Canada), stored in the dark for 21 days at 4°C, developed in D-19 (Kodak) and coverslipped with a water-soluble mounting medium (Permafluor; Lipshaw Immunon, Pittsburgh, PA, USA). Slides

used to compare the dual labeling at different ages and/or between experimental conditions were systematically processed together. All these sections were examined under bright-field illumination with an Olympus IX-50 microscope (Carsen Group, Markham, ON, Canada), at 400 X magnification.

In sections from embryos, the contour of individual neurons could not be distinguished after the above processing for dual *in situ* hybridization. To quantify *in situ* hybridization signals, counts of silver grains (VGLUT2 mRNA) were therefore obtained from tissue areas also displaying Dig positivity (TH mRNA). This was done with the aid of the public domain Image J software (NIH) in images captured with an ORCA-II cooled digital camera (Hamamatsu, NJ, USA). In each section, silver grain counts were obtained from 3 square areas ($\pm 6000 \mu\text{m}^2$ each) of the ventral mesencephalon displaying Dig positivity, and three 3 areas of the same sections ($\pm 5600 \mu\text{m}^2$ each) showing only weak, silver grain labeling (background). The counts from TH-Dig positive areas were then averaged at each embryonic age, and expressed in number of grains per $500 \mu\text{m}^2$ (an area corresponding to a cluster of DA neurons cell bodies), after subtracting the background (0.9 -1.9 silver grains per $500 \mu\text{m}^2$ of section). This analysis was performed in 3 or 4 sections per embryo, and 3 embryos each at E15 and E18, and 5 embryos each at E16 and E21.

In sections from postnatal rats, background labeling was similarly measured and found at 0.37 to 0.53 silver grains per $500 \mu\text{m}^2$ of section. As in previous studies (Kawano et al., 2006), TH-Dig positive cells (DA neurons) were considered to be labeled for VGLUT2 mRNA if displaying 3 times the background level, i.e., at least 6 silver grains per cell body (Gratto and Verge, 2003). In 4 rats of each experimental condition tested and 3 or 4 sections per rat, located between stereotaxic planes - 5.28 mm and - 6.24 mm from Bregma in adult rats (Paxinos, G. and Watson, C., 2005), singly and doubly labeled cells were then counted visually

RT-mPCR

Transverse slices (~1 mm thickness) of the mesencephalon, cut by hand at the level of the VTA and substantia nigra (SN), were isolated from the frozen brain of normal, sham-injected and 6-OHDA-lesioned, 15 day-old rats (n = 3 in each group). The slices were trimmed under the microscope to keep only the VTA and SN pars compacta (SNc). Total RNA was extracted from each individual sample using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions. All samples were stored at -80°C until used. Reverse transcription was performed on 2.5 mg of total RNA for 1 h at 37°C with 0.5 mM dNTPs mix (Qiagen), 2.5 µM random hexamers (RH) (Applied Biosystem, CA, USA) and 100 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Reaction was stopped by heating at 70°C for 15 min., then multiplex-semiquantitative PCR amplification was performed using 10% of the RT reaction, 2.5 µl 10x PCR buffer, 0.5 µl of 100 mM dNTPs, 2.5 U of Taq polymerase (all from Qiagen, ON, Canada), 1.5 mM MgCl₂, and 10 pmol of each primer. Twenty-seven cycles were carried out as follows: denaturation at 94°C for 60 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s. Amplification products were analyzed by 1.6% agarose gel electrophoresis. Band intensities were evaluated with Kodak ID v3.6.0 software.

Multiplex single-cell RT-PCR.

Cells dissociation was performed following a protocol modified from (Puma et al., 2001). Briefly, the ventral mesencephalon was dissected from 15 day embryos and collected in ice-cold PBS supplemented with 6 mg/ml glucose. The tissue was treated with papain (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) for 20 min at 37°C in dissociation solution (in mM: 90 Na₂SO₄, 30 K₂SO₄, 5.8 MgCl₂, 0.25 CaCl₂, 10 HEPES, 20 glucose, 0.001% phenol red, pH 7.4), and then triturated to obtain a cell suspension (Bourque and Trudeau, 2000), that was subjected to a differential gradient centrifugation to eliminate dead cells and debris. Cells were plated on Polyethyleneimine-coated (PEI) coverslips mounted into an electrophysiology recording chamber and were left to adhere at room temperature for 15 minutes, then washed under perfusion with physiological saline solution

(in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, 6 sucrose, pH 7.35 and 305 mOsm) to remove non-attached cells.

Cells were collected individually under RNase-free conditions by using sterile borosilicate patch pipettes. No intracellular pipette solution was used. Each cell was collected by applying light negative pressure to the pipette. The recording chamber was fixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 microscope. Coverslips were kept under perfusion of physiological saline solution using a gravity flow system (1 ml/min). Once samples were collected, the content of the pipette was transferred immediately into a pre-chilled 200- μ l tube containing 6 μ l of a freshly prepared solution of 20 U of RNaseOUT and 8.3 mM of DTT (Invitrogen) and then frozen immediately until use. Frozen samples were thawed on ice and subjected to the RT reaction as describe for total RNA but using 1.25 μ M RH, 100 units M-MLV RT and 20 additional units of RNaseOUT. A first round of PCR was done as mentioned above but using the half of the RT reaction and 27 cycles. A second round of PCR was done using 10% of first PCR reaction and 28 cycles.

Primers

All primers were designed according to the NCBI GenBank sequence database using Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) as well as Vector NTI software, and synthesized by AlphaDNA (Montreal, QC, Canada). All primers were tested using the appropriate positive and negative controls. For β -actin, the forward and reverse primers were 5'-CTCTTTTCCAGCCTTCCTTCTT-3' and 5'-AGTAATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3', respectively (product size 175 pb). For TH, the primers were 5'-GTTCTCAACCTGCTCTTCTCCTT-3' and 5'-GGTAGCAATTCCTCCTTTGTGT-3'; TH-nested, 5'-GTACAAAACCCTCCTCACTGTCTC-3' and 5'-CTTGTATTGGAAGGCAATCTCTG-3' (product size 375 pb). For VGLUT2, the primers were 5'-GGGGAAAGAGGGGATAAAGAA-3' and 5'-TGGCTTTCTCCTTGATAACTTTG-3'; VGLUT2-nested

5'-ATCTACAGGGTGCTGGAGAAGAA-3' and 5'-GATAGTGCTGTTGTTGACCATGT-3' (product size 230 pb). Nested primers are the ones used in the RT-mPCR experiments.

Double immunolabeling for electron microscopy

Fifteen day-old pups were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) and perfused through the aortic arch with a solution of 3% acrolein in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4), followed by 4% PFA in the same buffer. The brain was removed, post-fixed by immersion in the PFA solution at 4°C for 2 h, and washed in PBS. Fifty µm-thick transverse sections across the nAcb were cut in PBS with a vibratome, immersed in 0.1% sodium borohydride in PBS for 30 min at room temperature, and washed in this buffer before further processing. After preincubation for 1 h at room temperature in a blocking solution containing 5% normal goat serum and 0.5% gelatin in PBS, sections were incubated for 48 h at room temperature with both mouse monoclonal anti-TH (Sigma) (1:500) and rabbit polyclonal anti-VGLUT2 antiserum (Synaptic Systems, Goettingen, Germany) (1:500) (Anlauf and Derouiche, 2005) antibodies in blocking solution. The monoclonal anti-TH antibody recognizes an epitope present in the N-terminal region of both rodent and human tyrosine hydroxylase (Haycock, 1993), while the polyclonal anti-VGLUT2 antibody was raised against a C-terminal segment of mammalian VGLUT2 (Fujiyama et al., 2001). The VGLUT2 and TH antibodies were then sequentially labeled in this order with the immunogold and the immunoperoxidase technique, respectively. Sections were rinsed in PBS, incubated overnight at room temperature in goat anti-rabbit IgGs conjugated to 1 nm colloidal gold particles (AuroProbe One, Amersham, Oakville, ON, Canada), diluted 1:50 in blocking solution, and the size of immunogold particles was increased by silver enhancement for 15 min with IntenSE kit (Amersham). Sections were then rinsed in PBS, incubated for 1.5 h at room temperature with biotinylated goat anti-mouse IgGs (Jackson) diluted 1:1000 in blocking solution, rinsed in PBS, incubated for 1 h in a 1:1000 solution of streptavidin-HRP (Jackson), washed in PBS and then in 0.05 M Tris-saline buffer (TBS; pH 7.4), incubated for 2-5 min in TBS containing 0.05% DAB and hydrogen peroxide (0.02%), and washed again in TBS to stop the reaction.

Further processing for electron microscopy was as previously described in detail (Riad et al., 2000). In brief, sections were osmicated, dehydrated and flat-embedded in resin between a glass slide and a plastic coverslip (Rinzl, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA). After 48 h of polymerization at 60°C, the coverslips were removed, and the region of interest (nAcb), identified by light microscopy, was excised from the slides and glued at the tip of resin blocks. Ultrathin sections were then cut with an ultramicrotome (Reichert Ultracut S, Leica Canada, St-Laurent, QC, Canada), collected on bare square-meshed copper grids, stained with lead citrate and examined with an electron microscope (Philips CM100, Philips Electronics, St-Laurent, QC, Canada). Immunocytochemical controls included processing as above but without either one or both primary antibodies. Only the expected single labeling was observed when omitting one or the other primary antibody, and no labeling whatsoever in the absence of both of them.

The electron microscopic analysis focused on the core of the nAcb, at transverse levels that correspond to between A 10.8 and 11.28 mm in the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (Paxinos, G. and Watson, C., 2005). Material from seven normal and seven 6-OHDA-lesioned rats, aged 15 days, was examined. In both normal and 6-OHDA-lesioned rats, a minimum of 50 electron micrographs per rat were obtained from a narrow area of thin sections less than 10 µm away from the tissue-resin border at working magnifications ranging from 3,000 to 15,000 X. The film negatives were scanned (Epson Perfection 3200), converted into a positive picture, adjusted for brightness and contrast with Photoshop (Adobe), and printed at a final magnification ranging from 7,500 to 37,500 X.

Most immunolabeled profiles could then be positively identified as axon varicosities, i.e. axon dilations (> 0.25 µm in transverse diameter) containing aggregated small vesicles and often one or more mitochondria, and displaying or not a synaptic membrane specialization (junctional complex). Smaller immunolabeled profiles were assumed to represent intervaricose segments of unmyelinated axons. Only profiles decorated with 3 or more immunogold particles were considered as immunogold-labeled. The immunoperoxidase labeling was readily identified as a more or less dense precipitate, often

outlining the small vesicles or mitochondria and the membrane of varicosities. In 30 micrographs per rat, printed at a uniform magnification of 30,000 X and showing the best morphological preservation, all singly or dually immunolabeled profiles of axon varicosities were counted and categorized as immunopositive for TH alone, for VGLUT2 alone or for both TH and VGLUT2 (TH/VGLUT2). As an equivalent ultrathin section surface ($\pm 1665 \mu\text{m}^2$) was being examined in every rat, the total number of varicosities in the different categories could be merely divided by the number of rats ($n = 7$) for the comparison between normal and 6-OHDA-lesioned rats.

Statistical analyses

All data were expressed as group mean \pm SEM. Statistical analyses were performed with SigmaStat (Systat Software) or GraphPad Prism 4. T-tests, analyses of variance (one-way ANOVA) and Tukey post-hoc tests were used to determine statistical significance. *P* values below 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Expression of VGLUT2 mRNA in pre- and post-natal ventral mesencephalon

Double *in situ* hybridization against TH and the three VGLUT subtypes was performed in order to detect VGLUT1-3 mRNAs in developing DA neurons *in vivo*. The selectivity of the [³⁵S]VGLUT mRNA probes was validated by evaluating their distribution in autoradiographs from the brain of normal 15 day-old rats. In keeping with previous observations (Boulland et al., 2004; Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004b), VGLUT1 mRNA was abundant in the pyramidal cell layer of hippocampus and in cerebral cortex; VGLUT2 mRNA in the red nucleus and the medial geniculate nucleus, and VGLUT3 mRNA in the dorsal and median raphe nuclei (Supplementary online Material) (Herzog et al., 2004a). No signal was observed with sense probes (data not shown).

Inspection of these autoradiographs did not show abundant VGLUT2 labeling in the ventral mesencephalon, including the VTA and SN, which could be due to a low sensitivity of detection of our *in situ* hybridization technique, but could also reflect a truly low level of VGLUT2 mRNA at that age (Boulland et al., 2004). However, this did not exclude co-expression by a sub-population of these neurons, nor the repression of a broader co-expression at earlier stages of development.

The expression of each VGLUT subtype was therefore examined from E14 to E21 as well as in neonatal rats, using double *in situ* hybridization with Dig-TH and [³⁵S]VGLUT probes. No labeling for VGLUT1 and VGLUT3 mRNA was detected in the mesencephalic region of embryonic or neonatal rats (data not shown). In contrast, at E14-E15 and E16, strong labeling for VGLUT2 mRNA was observed in the region displaying TH mRNA labeling (Fig. 1A,A1), i.e., in the ventral and paramedial zone of the mesencephalon where developing DA neurons are found (Smits et al., 2006). At later embryonic ages (E18-21), TH mRNA labeling remained abundant, but the overlap with VGLUT2 labeling was lost, suggesting a lowering of VGLUT2 expression in dopaminergic nuclei (Fig. 1B,B1). Quantification of the VGLUT2 mRNA labeling in TH-Dig-positive regions of embryonic

ventral mesencephalon showed averages of 7.9 ± 0.9 and 7.3 ± 0.6 silver grains per $500 \mu\text{m}^2$ of section at E15 (N=3) and E16 (N=5), respectively, and significant decreases to 2.3 ± 0.4 and 1.9 ± 0.2 per $500 \mu\text{m}^2$ at E18 (N=3) and E21 (N=5), respectively ($P < 0.001$ by one way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-hoc test) (Fig. 1C). To confirm the presence of VGLUT2 mRNA in embryonic DA neurons, single-cell RT-PCR was used in individual E15 DA neurons. After acute dissociation of the ventral mesencephalon in 15 days embryos, 54 cells were collected. Of these 54 cells, 13 were found to contain VGLUT2 mRNA and 4 to contain TH mRNA. Out of these 4 DA neurons, 3 were found to contain VGLUT2 mRNA (Fig. 1D), thus confirming the apparent frequent expression of this transcript in embryonic DA neurons.

In postnatal rats, numerous neurons dually-labeled for TH and VGLUT2 mRNAs were visible in the rostral linear raphe (RLi) nucleus (Fig. 2A,B), while only small numbers were observed in the VTA and SNc (Fig. 2C,D). The percentage of DA (TH mRNA) neurons co-expressing VGLUT2 mRNA in the VTA and SN of normal neonatal rats is given in Table 1. In P5, P10 and P15 pups (N=4 for each age), we counted a total of 5382 neurons containing TH mRNA in the SN, and 4656 in the VTA. Out of these, only a small subset showed dual labeling (33 in the SN, and 120 in the VTA). There was no statistically significant change in the percentage of dually labeled neurons in the VTA or the SN between these ages (Table 1). At each age, the percentage of co-expression was significantly higher in the VTA (parabrachial and paranigral subdivisions) than the SN ($2.6 \pm 0.5 \%$ versus $0.6 \pm 0.1 \%$ in average; $p < 0.001$, t-test). The highest ratio was observed in the RLi ($24.1 \pm 6.4 \%$; N=3), in which DA neurons are less numerous and dispersed along the midline (Fig. 2A,B). Some neurons expressing VGLUT2 only were also seen in the VTA, suggesting the presence of primarily glutamatergic neurons in this mesencephalic region (e.g., Fig. 4A).

Co-expression of VGLUT2 by DA neurons after neonatal 6-OHDA lesion

The neonatal administration of 6-OHDA allowed to evaluate the effects of an early injury on the transmitter phenotype of surviving DA neurons. As expected from earlier studies (Fernandes Xavier et al., 1994), eleven days after 6-OHDA (P15), TH immunoreactivity was almost abolished in the dorsal striatum of 6-OHDA rats, but residual labeling persisted in the ventral striatum, and notably in the nAcb (Figs 3A,B). The consequences of the 6-OHDA lesion on VGLUT2 expression were first investigated by measuring TH, VGLUT2 and β -actin mRNAs in tissue blocks of the VTA and SN of normal, sham and 6-OHDA-lesioned 15 day-old rats (N=3), using semi-quantitative RT-PCR. As shown in Figs 3C and D, TH mRNA was markedly decreased after 6-OHDA compared to normal or sham controls (optical density 0.41 ± 0.04 vs. 1.1 ± 0.04 and 0.87 ± 0.16 for normal and sham respectively; one way ANOVA, $F(2,8) = 12,1$, $p < 0.05$). In contrast, there were no significant differences in VGLUT2 mRNA levels between either group (Fig. 3C,D; OD 0.94 ± 0.03 for 6-OHDA rats vs. 0.88 ± 0.03 and 0.82 ± 0.1 for normal and sham rats, respectively; one way ANOVA, $F(2,8) = 0,9$, $p > 0.05$).

In view of the major decrease in the number of DA neurons, the lack of a parallel decrease in VGLUT2 mRNA was compatible with either one of two possibilities. The proportion of surviving DA neurons expressing VGLUT2 could be increased following the 6-OHDA lesion, thus compensating for the decrease in DA neuron number, or else, most of the VGLUT2 mRNA that was measured originated from non-DA neurons that were not affected by the lesion. To distinguish between these possibilities, the number and proportion of DA neurons that expressed VGLUT2 mRNA were determined by double *in situ* hybridization in sham-operated compared to 6-OHDA-lesioned rats. As shown in Table 2, 11 days after the lesion, there was a modest but non significant increase in the number and proportion of dually labeled neurons in the VTA of sham operated (N=4) compared to control rats (N=4) (56 TH+/VGLUT2+ over 1124 TH+, i.e. $7.1 \pm 1.5\%$ versus 19 TH+/VGLUT2+ over 1116 TH+, i.e., $1.8 \pm 0.3\%$), and no change in the SN. As also shown in Table 2, the total number of neurons displaying TH mRNA was considerably reduced in

the VTA of the lesioned rats (N=4), while such neurons had almost totally disappeared from the SN. Yet, the number of VTA neurons co-expressing TH and VGLUT2 mRNA after 6-OHDA (142 TH+/VGLUT2+ over 530 TH+ neurons) was higher than in control and sham-operated animals (Fig. 4), whereas none were observed in the SN. As the number of VTA DA neurons was markedly reduced by the lesion, this resulted in a highly significant increase in the proportion of dually labeled VTA neurons ($26.3 \pm 2.5\%$; Table 2). An analysis of variance confirmed the statistical significance of this difference ($p < 0.001$ for 6-OHDA versus each other group), in the absence of a significant difference between the sham and control rats.

TH and VGLUT2 containing axon terminals in the nAcb of normal and 6-OHDA-lesioned 15 day-old rats

In every specimen from both normal and 6-OHDA-treated rats examined by electron microscopy after dual immunolabeling for TH and VGLUT2, axon terminals (varicosities) labeled for TH only (DAB), VGLUT2 only (gold particles) and both TH and VGLUT2 could be observed (Fig. 5). A quantification of these results revealed a considerable reduction (38%) in the number of TH positive singly-labeled varicosities after the 6-OHDA lesion compared to normal (Table 3). An apparent reduction in the number of singly labeled, VGLUT2 positive terminals was also measured, but did not reach statistical significance because of the considerable variability between rats. Surprisingly, there was no significant decrease in the number of dually labeled terminals estimated as a proportion of the total number of TH positive terminals after 6-OHDA (Table 3). To the contrary, 37% of residual TH positive terminals in the nAcb of 6-OHDA-lesioned rats were dually labeled, a value which was significantly higher than the 28% measured in normal rats ($p < 0.05$). Interestingly, even in single thin sections, the dually labeled terminals frequently showed a synaptic membrane specialization (junctional complex), either asymmetrical or symmetrical (Figs. 5C and 5F). However, the relatively small number of dually labeled synaptic profiles precluded further analysis of their relational features.

DISCUSSION

While confirming that, in normal rats, a subset of VTA DA neurons expresses VGLUT2 mRNA, this study suggests that this dual transmitter phenotype is more broadly expressed during early than late embryonic development, and reveals that it may be activated in VTA DA neurons surviving a neonatal 6-OHDA lesion. It also provides the first demonstration of the presence of VGLUT2 protein in TH-immunopositive axon varicosities of the nAcb, reinforcing the possibility of a dual release of glutamate and dopamine by these nerve terminals *in vivo*.

VGLUT2 expression in mesencephalic DA neurons *in vivo*

The initial goal of the present study was to characterize the glutamatergic phenotype of mesencephalic DA neurons, and to determine whether, as in culture (Dal Bo et al., 2004), these neurons co-express vesicular glutamate transporters *in vivo*. In agreement with two recent reports (Kawano et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007), in normal postnatal rat, only VGLUT2 mRNA was detected in a small sub-population of ventral mesencephalic neurons containing TH mRNA. Therefore, alike other monoaminergic neuronal populations expressing a glutamatergic phenotype, such as C1 adrenergic neurons expressing VGLUT2 (Stornetta et al., 2002) and raphe serotonin neurons expressing VGLUT3 (Gras et al., 2002), mesencephalic DA neurons co-express only one VGLUT subtype. Albeit low, the proportion of DA neurons co-expressing VGLUT2 in normal postnatal rat was significantly higher in the VTA than in the SNc. This was in keeping with the recent observations of Kawano et al. (2006) in adult animals, and further highlights phenotypic differences between DA neurons in these two nuclei, as already shown for the levels of expression of TH, DA transporter and calbindin (Rogers, 1992; Blanchard et al., 1994; Korotkova et al., 2005; Korotkova et al., 2004). The small subset of DA neurons expressing VGLUT2 mRNA in normal postnatal rat contrasted with the high proportion of isolated DA neurons in culture known to release glutamate synaptically (~60%) (Sulzer et al., 1998) or to express VGLUT2 protein (~80%) (Dal Bo et al., 2004), suggesting that VGLUT2 expression might be enhanced in isolated DA neurons *in vitro*.

In vivo, VGLUT2 expression may be abundant and widespread during development but repressed in mature DA neurons. Indeed, at 14 to 16 embryonic days, VGLUT2 mRNA was strongly and broadly co-expressed with TH mRNA in the region of ventral mesencephalon where DA neurons first develop (Kalsbeek et al., 1988), and no longer detectable at later embryonic stages (E18 and E21). Single-cell RT PCR confirmed the frequent co-expression of VGLUT2 in E15 DA neurons. In rat ventral midbrain at E18, DA neurons are found in the same relative location that they will occupy in the adult brain, and their projections begin to reach the ventro-lateral part of the neostriatum (Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988) in which neurogenesis begins (Bayer, 1984). Future work will be needed to verify that the rapid change in regional overlap of TH and VGLUT2 expression in embryonic ventral midbrain does represent a reduced number of DA neurons expressing VGLUT2 mRNA, and to determine the specific role of this dual phenotype during the growth of these neurons. Rapid declines in VGLUT2 expression have been described previously in postnatal rat brain (Boulland et al., 2004). They are likely to reflect the repression of a glutamatergic phenotype transiently expressed during critical periods of development.

VGLUT2 expression in DA neurons surviving a neonatal 6-OHDA lesion

Neonatal i.c.v. administration of 6-OHDA is a well-established model to study adaptive and plastic properties of central DA neurons *in vivo* (Fernandes Xavier et al., 1994; Joyce et al., 1996; Penit-Soria et al., 1997; Neal-Beliveau and Joyce, 1999). This lesion destroys most DA in the SNc and decreases the number of DA neurons in the VTA, but, as previously shown, many DA neurons of this latter region survive. The present study revealed that the percentage of VTA DA neurons expressing VGLUT2 mRNA was markedly increased in 15 day-old 6-OHDA lesioned rats compared to normal or sham controls. This increase in number of VTA DA neurons containing VGLUT2mRNA was far greater than could be explained by a preferential survival of those VTA neurons normally expressing the dual phenotype. Interestingly, an increase in the number and in the proportion of dually labeled DA neurons was already observed 2 days after the surgery, at

P6 (96 VGLUT2+/TH+ over 561 TH+ counted in 3 animals; 17.1 ± 4.4), indicating an early and rapid activation of VGLUT2 expression in surviving DA neurons (data not shown). These data argue in favor of the hypothesis of an induction or derepression of VGLUT2 expression in many of the surviving DA neurons.

The proportion of VTA DA neurons expressing VGLUT2 appeared to be also slightly increased in sham-injected rats that were pre-treated with desipramine to prevent degeneration of noradrenergic neurons. Although this trend did not reach statistical significance, it may have been due to an elevation of extracellular norepinephrine. Interestingly, in adult rat, chronic desipramine treatment has been shown to increase VGLUT1 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus (Moutsimilli et al., 2005; Tordera et al., 2005), and VGLUT2 mRNA in the thalamus (Tordera et al., 2005). Preliminary data suggests that a modest increase of VGLUT2 mRNA in the ventral mesencephalon may indeed result from a single injection of desipramine in normal neonatal rats (not shown).

On the other hand, there was no detectable increase in VGLUT2 mRNA expression in the SNc DA neurons having survived the 6-OHDA lesion. This perhaps reflected a further difference between VTA and SNc DA neurons, not only in their ability to express VGLUT2 under normal conditions, but also in their potential to up-regulate its co-expression after trauma. Experiments in progress should tell whether VTA DA neurons of adult rats retain the potential to express VGLUT2 after partial 6-OHDA lesion. Interestingly, a number of recent reports have described an enhanced expression of VGLUT2 by mature neurons in response to various stimuli (Kawasaki et al., 2006; Kawasaki et al., 2005; Hrabovszky et al., 2006; Aymerich et al., 2006). These findings illustrate the remarkable plasticity of the glutamate transmitter phenotype of neurons. The recent demonstration that hippocampal granule cells begin to express glutamic acid decarboxylase and to release GABA in addition to glutamate after a kindling protocol (Gutierrez, 2000; Gutierrez and Heinemann, 2006) or in response to GDNF (Gomez-Lira et al., 2005) also favors this view. These latter results have been interpreted as the reactivation

of a normally repressed developmental program (Seal and Edwards, 2006), which might also be the case for VGLUT2 expression by neonatally-lesioned DA neurons.

Presence of VGLUT2 protein in DA terminals

Considering that mesencephalic DA neurons of the VTA densely innervate the nAcb (Oades and Halliday, 1987), this small nucleus was the ideal anatomical area to search for a colocalization of TH and VGLUT2 protein in axon terminals. After dual immunolabeling for electron microscopy, 28% of TH positive terminals in the core of nAcb could be distinctly visualized as also containing VGLUT2 protein. Such a proportion of axon terminals containing both TH and VGLUT2 protein was much higher than the observed proportion of DA neurons expressing VGLUT2 mRNA, a discrepancy for which several possible explanations could be advanced, in addition to limitations in sensitivity of the dual *in situ* hybridization technique. VGLUT2 positive DA neurons could have established a higher density of axon terminals at this stage of development than DA neurons which do not express VGLUT2. It is also possible that the half-life of the VGLUT2 protein is relatively long, accounting for its persistence many days after interruption of its synthesis and export to axon terminals.

As expected, the 6-OHDA lesion caused a substantial decrease in the number of TH-immunopositive terminals in the nAcb, as evaluated either by dual immunofluorescence or by double labeling immuno-electron microscopy. In the latter material, the 38% decrease in axon terminals labeled for TH was considerably less than the 60% reduction in number of VTA neurons displaying TH mRNA, perhaps reflecting, at least in part, the survival of DA neurons which no longer expressed detectable amounts of TH mRNA. Interestingly, this diminished number of TH terminals was not accompanied by a statistically significant reduction in the number of dually TH and VGLUT2 positive axon terminals (decrease of less than 20%). On the contrary, there was a small but significant increase in the percentage of all TH terminals which exhibited the dual phenotype (from 28% to 37%; $p < 0.05$). This finding is in line with the increase in the proportion of VTA DA neurons that co-expressed VGLUT2 mRNA after the lesion. Alternatively, it could indicate that axon terminals arising

from DA neurons that also contain VGLUT2 were less sensitive to the 6-OHDA-induced degeneration. Because, in many brain regions, central DA neurons are endowed with non-synaptic as well as synaptic axon varicosities (Hattori et al., 1991; Descarries et al., 1996; Ingham et al., 1998), it will be of interest to explore the possible relationship between the glutamatergic phenotype of TH positive terminals and their synaptic versus non-synaptic differentiation.

Conclusion

Although the specific role of glutamate in mesencephalic DA neurons remains undetermined, the early developmental expression of VGLUT2 in these neurons suggests an implication of glutamate release in the establishment or fine-tuning of their projections. Further experiments will be required to test this hypothesis more directly and to investigate which signals activate or derepress VGLUT2 expression in lesioned VTA neurons. It will also be of major interest to determine whether such a phenotypic switch may occur in adult animals, as well as the possible role of the dual DA-glutamate phenotype (and its regulation) within the context of pathological states.

Acknowledgments: This work was funded in part by a grant from NARSAD to L.-E. T and by CIHR grant MOP-3544 to L.D., and also supported by an infrastructure grant from the FRSQ to the GRSNC (Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central). N. B.-C. was recipient of a studentship from the GRSNC. The plasmids used to prepare VGLUT probes were kindly provided by Dr. S. El Mestikawy. The authors wish to thank François Gilbert, Brigitte Paquet and Geneviève Beaudry for their help with the *in situ* hybridization experiments.

REFERENCES

- Aihara Y., Mashima H., Onda H., Hisano S., Kasuya H., Hori T., Yamada S., Tomura H., Yamada Y., Inoue I., Kojima I., and Takeda J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74, 2622-5.
- Anlauf E. and Derouiche A. (2005) Astrocytic exocytosis vesicles and glutamate: a high-resolution immunofluorescence study. *Glia* 49, 96-106.
- Aymerich M.S., Barroso-Chinea P., Perez-Manso M., Munoz-Patino A.M., Moreno-Igoa M., Gonzalez-Hernandez T., and Lanciego J.L. (2006) Consequences of unilateral nigrostriatal denervation on the thalamostriatal pathway in rats. *Eur J Neurosci* 23, 2099-108.
- Bayer S.A. (1984) Neurogenesis in the rat striatum. *Internat J Dev Neurosci* 2, 163-175.
- Beaudry G., Langlois M.C., Weppe I., Rouillard C., and Lévesque D. (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem* 75, 1694-702.
- Bellochio E.E., Hu H., Pohorille A., Chan J., Pickel V.M., and Edwards R.H. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* 18, 8648-59.
- Blanchard V., Raisman-Vozari R., Vyas S., Michel P.P., Javoy-Agid F., Uhl G., and Agid Y. (1994) Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res* 22, 29-38.
- Borodinsky L.N., Root C.M., Cronin J.A., Sann S.B., Gu X., and Spitzer N.C. (2004)

Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429, 523-30.

Borodinsky L.N. and Spitzer N.C. (2007) Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 335-40.

Boulland J.L., Qureshi T., Seal R.P., Rafiki A., Gundersen V., Bergersen L.H., Fremeau R.T. Jr, Edwards R.H., Storm-Mathisen J., and Chaudhry F.A. (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol* 480, 264-80.

Bourque M.-J. and Trudeau L.-E. (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* 12 , 3172-80.

Chuhma N., Zhang H., Masson J., Zhuang X., Sulzer D., Hen R., and Rayport S. (2004) Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *J Neurosci* 24, 972-81.

Cossette M., Parent A., and Lévesque D. (2004) Tyrosine hydroxylase-positive neurons intrinsic to the human striatum express the transcription factor Nurr1. *Eur J Neurosci* 20, 2089-95.

Dal Bo G., St-Gelais F., Danik M., Williams S., Cotton M., and 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, 1398-405.

Descarries L., Watkins K.C., Garcia S., Bosler O., and Doucet G. (1996) Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol* 375, 167-86.

Fernandes Xavier F.G., Doucet G., Geffard M., and Descarries L. (1994) Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus

of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 59, 77-87.

Freneau R.T. Jr, Burman J., Qureshi T., Tran C.H., Proctor J., Johnson J., Zhang H., Sulzer D., Copenhagen D.R., Storm-Mathisen J., Reimer R.J., Chaudhry F.A., and Edwards R.H. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14488-93.

Freneau R.T. Jr, Troyer M.D., Pahner I., Nygaard G.O., Tran C.H., Reimer R.J., Bellocchio E.E., Fortin D., Storm-Mathisen J., and Edwards R.H. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31, 247-60.

Fujiyama F., Furuta T., and Kaneko T. (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 435, 379-87.

Furshpan E.J., MacLeish P.R., O'Lague P.H., and Potter D.D. (1976) Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4225-9.

Gillespie D.C., Kim G., and Kandler K. (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8, 332-8.

Gomez-Lira G., Lamas M., Romo-Parra H., and Gutierrez R. (2005) Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci* 25, 6939-46.

Gras C., Herzog E., Bellenchi G.C., Bernard V., Ravassard P., Pohl M., Gasnier B., Giros B., and El Mestikawy S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22, 5442-51.

- Gratto K.A. and Verge V.M. (2003) Neurotrophin-3 down-regulates trkA mRNA, NGF high-affinity binding sites, and associated phenotype in adult DRG neurons. *Eur J Neurosci* 18, 1535-48.
- Gutierrez R. (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84, 3088-90.
- Gutierrez R. and Heinemann U. (2006) Co-existence of GABA and Glu in the hippocampal granule cells: implications for epilepsy. *Curr Top Med Chem* 6, 975-8.
- Hattori T., Takada M., Moriizumi T., and Van der Kooy D. (1991) Single dopaminergic nigrostriatal neurons form two chemically distinct synaptic types: possible transmitter segregation within neurons. *J Comp Neurol* 309, 391-401.
- Haycock J.W. (1993) Multiple forms of tyrosine hydroxylase in human neuroblastoma cells: quantitation with isoform-specific antibodies. *J Neurochem* 60, 493-502.
- Herzog E., Bellenchi G.C., Gras C., Bernard V., Ravassard P., Bedet C., Gasnier B., Giros B., and El Mestikawy S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21, RC181.
- Herzog E., Gilchrist J., Gras C., Muzerelle A., Ravassard P., Giros B., Gaspar P., and El Mestikawy S. (2004a) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123, 983-1002.
- Herzog E., Landry M., Buhler E., Bouali-Benazzouz R., Legay C., Henderson C.E., Nagy F., Dreyfus P., Giros B., and El Mestikawy S. (2004b) Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons. *Eur J Neurosci* 20, 1752-60.
- Hisano S., Hoshi K., Ikeda Y., Maruyama D., Kanemoto M., Ichijo H., Kojima I., Takeda J., and Nogami H. (2000) Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-

dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res* 83, 34-43.

Hrabovszky E., Kallo I., Turi G.F., May K., Wittmann G., Fekete C., and Liposits Z. (2006) Expression of vesicular glutamate transporter-2 in gonadotrope and thyrotrope cells of the rat pituitary. Regulation by estrogen and thyroid hormone status. *Endocrinology* 147, 3818-25.

Ingham C.A., Hood S.H., Taggart P., and Arbuthnott G.W. (1998) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* 18, 4732-43.

Jackson D., Bruno J.P., Stachowiak M.K., and Zigmond M.J. (1988) Inhibition of striatal acetylcholine release by serotonin and dopamine after the intracerebral administration of 6-hydroxydopamine to neonatal rats. *Brain Res* 457, 267-73.

Joyce J.N., Frohna P.A., and Neal-Beliveau B.S. (1996) Functional and molecular differentiation of the dopamine system induced by neonatal denervation. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 453-86.

Joyce M.P. and Rayport S. (2000) Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience* 99, 445-456.

Kalsbeek A., Voorn P., Buijs R.M., Pool C.W., and Uylings H.B. (1988) Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol* 269, 58-72.

Kawano M., Kawasaki A., Sakata-Haga H., Fukui Y., Kawano H., Nogami H., and Hisano S. (2006) Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 498, 581-92.

Kawasaki A., Hoshi K., Kawano M., Nogami H., Yoshikawa H., and Hisano S. (2005) Up-regulation of VGLUT2 expression in hypothalamic-neurohypophysial neurons of the rat

following osmotic challenge. *Eur J Neurosci* 22, 672-80.

Kawasaki A., Shutoh F., Nogami H., and Hisano S. (2006) VGLUT2 expression is up-regulated in neurohypophysial vasopressin neurons of the rat after osmotic stimulation. *Neurosci Res* 56, 124-127.

Korotkova T.M., Ponomarenko A.A., Brown R.E., and Haas H.L. (2004) Functional diversity of ventral midbrain dopamine and GABAergic neurons. *Mol Neurobiol* 29, 243-59.

Korotkova T.M., Ponomarenko A.A., Haas H.L., and Sergeeva O.A. (2005) Differential expression of the homeobox gene Pitx3 in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 22, 1287-93.

Lavin A., Nogueira L., Lapish C.C., Wightman R.M., Phillips P.E., and Seamans J.K. (2005) Mesocortical dopamine neurons operate in distinct temporal domains using multimodal signaling. *J Neurosci* 25, 5013-23.

Moutsimilli L., Farley S., Dumas S., El Mestikawy S., Giros B., and Tzavara E.T. (2005) Selective cortical VGLUT1 increase as a marker for antidepressant activity. *Neuropharmacology* 49, 890-900.

Neal-Beliveau B.S. and Joyce J.N. (1999) Timing: A critical determinant of the functional consequences of neonatal 6-OHDA lesions. *Neurotoxicol Teratol* 21, 129-40.

Ni B., Wu X., Yan G.M., Wang J., and Paul S.M. (1995) Regional expression and cellular localization of the Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. *J Neurosci* 15, 5789-99.

Oades R.D. and Halliday G.M. (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434, 117-65.

- Paxinos G. and Watson C. (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego.
- Penit-Soria J., Durand C., Hervé D., and Besson M.J. (1997) Morphological and biochemical adaptations to unilateral dopamine denervation of the neostriatum in newborn rats. *Neuroscience* 77, 753-66.
- Puma C., Danik M., Quirion R., Ramon F., and Williams S. (2001) The chemokine interleukin-8 acutely reduces Ca(2+) currents in identified cholinergic septal neurons expressing CXCR1 and CXCR2 receptor mRNAs. *J Neurochem* 78, 960-71.
- Riad M., Garcia S., Watkins K.C., Jodoin N., Doucet E., Langlois X., El Mestikawy S., Hamon M., and Descarries L. (2000) Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417, 181-94.
- Rogers J.H. (1992) Immunohistochemical markers in rat brain: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with tyrosine hydroxylase. *Brain Res* 587, 203-10.
- Seal R.P. and Edwards R.H. (2006) Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load. *Curr Opin Pharmacol* 6, 114-9.
- Smits S.M., Burbach J.P., and Smidt M.P. (2006) Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Prog Neurobiol* 78, 1-16.
- Specht L.A., Pickel V.M., Joh T.H., and Reis D.J. (1981) Fine structure of the nigrostriatal anlage in fetal rat brain by immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase. *Brain Res* 218, 49-65.
- St-Hilaire M., Landry E., Lévesque D., and Rouillard C. (2005) Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 20, 450-60.

- Stachowiak M.K., Bruno J.P., Snyder A.M., Stricker E.M., and Zigmond M.J. (1984) Apparent sprouting of striatal serotonergic terminals after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats. *Brain Res* 291, 164-7.
- Stornetta R.L., Sevigny C.P., and Guyenet P.G. (2002) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J Comp Neurol* 444, 191-206.
- Sulzer D., Joyce M.P., Lin L., Geldwert D., Haber S.N., Hattori T., and Rayport S. (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18, 4588-4602.
- Tordera R.M., Pei Q., and Sharp T. (2005) Evidence for increased expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT1, by a course of antidepressant treatment. *J Neurochem* 94, 875-83.
- Trevino M. and Gutierrez R. (2005) The GABAergic projection of the dentate gyrus to hippocampal area CA3 of the rat: pre- and postsynaptic actions after seizures. *J Physiol* 567, 939-49.
- Varoqui H., Schafer M.K., Zhu H., Weihe E., and Erickson J.D. (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22, 142-55.
- Voorn P., Kalsbeek A., Jorritsma-Byham B., and 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, 857-87.
- Yamaguchi T., Sheen W., and Morales M. (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 25, 106-118.
- Yang B., Slonimsky J.D., and Birren S.J. (2002) A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat Neurosci* 5, 539-45.

Table 1

**NUMBER AND PROPORTION OF VTA AND SN NEURONS CO-EXPRESSING
TH AND VGLUT2 mRNA IN POSTNATAL CONTROL RATS**

Control Rats		TH+ cells per section	TH+/VGLUT2+ cells per section	<u>TH+/VGLUT2+</u> TH+
P5 (N=4)	VTA	121 ± 14	4.1 ± 1.2	3.4 ± 0.8 %
	SN	131 ± 10	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1 %
P10 (N=4)	VTA	158 ± 18	3.8 ± 1	2.4 ± 0.4 %
	SN	167 ± 19	1.3 ± 0.6	0.8 ± 0.3 %
P15 (N=4)	VTA	102 ± 7	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3 %
	SN	152 ± 12	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2 %

Means ± SEM for the number of neurons counted per section in 4 rats at each age (3 or 4 sections per rat). On the right, the number of dually labeled neurons (TH+/VGLUT2+) is expressed as a percentage of all neurons containing TH mRNA (TH+).

Table 2

**NUMBER AND PROPORTION OF VTA AND SNC NEURONS CO-EXPRESSING
TH AND VGLUT2 mRNA IN SHAM AND 6-OHDA LESIONED RATS**

P15		TH+ cells per section	TH+/VGLUT2+ cells per section	<u>TH+/VGLUT2+</u> TH+
Shams (N=4)	VTA	98 ± 7	6.9 ± 2.7	7.1 ± 1.5 %
	SN	126 ± 13	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.3 %
6-OHDA (N=4)	VTA	39 ± 5	10.3 ± 1	26.3 ± 2.5 %***
	SN	4.6 ± 2.6	0	0

Data from P15 rats subjected to vehicle (sham) or 6-OHDA injection at P4. As in Table 1, means ± SEM for the number of neurons counted per section in 4 rats of each group. The proportion of dually labeled neurons (TH+/VGLUT2+ over all TH+) is significantly greater in 6-OHDA-lesioned than sham rats. *** p < 0.001 by ANOVA and Tuckey Test post-hoc.

Table 3

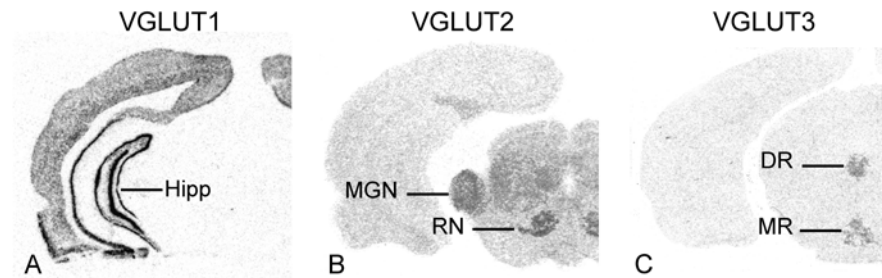
**NUMBER OF TH, VGLUT2, AND TH/VGLUT2 IMMUNOPOSITIVE AXON
TERMINALS IN THE nAcb OF 15 DAY-OLD NORMAL VERSUS 6-OHDA-
LESIONED RATS**

P15		TH+ terminals	VGLUT2+ terminals	TH+/VGLUT2+ terminals	<u>TH+/VGLUT2+</u> TH+
Normal (N=7)	N varicosities	1125	892	318	28 ± 2 %
	Mean ± SEM	161 ± 8	127 ± 32	45 ± 6	
6-OHDA (N=7)	N varicosities	696	581	256	37 ± 4 % *
	Mean ± SEM	99 ± 11 ***	88 ± 16	37 ± 4	

N varicosities is the total number of immunopositive axon varicosities in each category, counted over an equivalent total surface of 11 655 μm^2 of thin section (1665 μm^2 per rat) in each group, as explained in Materials and Methods. The percentage of all TH-labeled axon terminals dually immunolabeled for VGLUT2 is given on the right. *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ by unpaired Student's *t*-test.

FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1



Supplementary figure 1: Distribution of VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 mRNA labeling in P15 rats. A-C are representative pictures of autoradiographs obtained by single-probe *in situ* hybridization with [³⁵S]UTP-labeled VGLUT mRNA probes. VGLUT1 mRNA is abundant in the hippocampus (Hipp) (A), VGLUT2 mRNA in the red nucleus (RN) and the medial geniculate nucleus (MGN) (B), and VGLUT3 mRNA in the dorsal (DR) and median raphe (MR) nuclei (C).

TH/VGLUT2

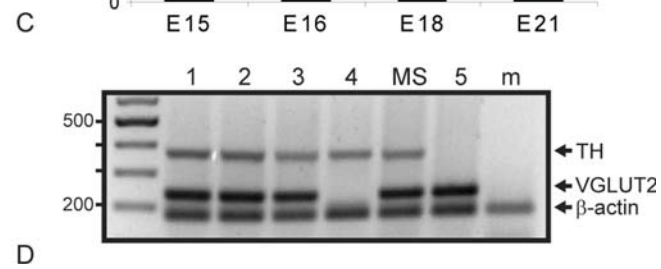
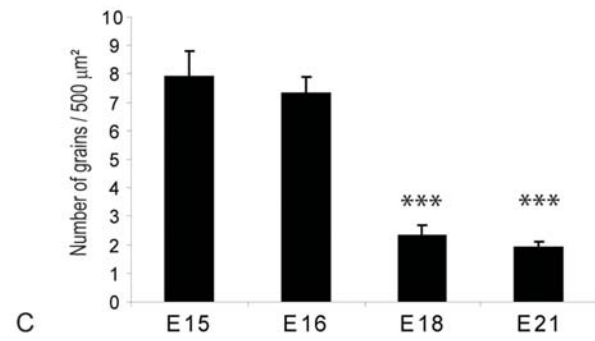
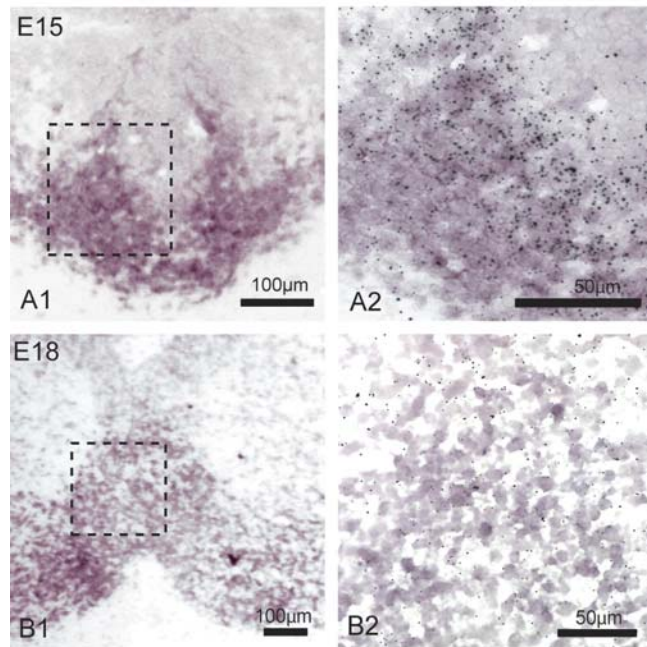


Figure 1: Selectivity and evaluation of co-expression of TH and VGLUT2 mRNA in prenatal ventral mesencephalon. **A-B1** Double *in situ* hybridization with DIG-labeled probes to detect TH mRNA (purple) and radiolabeled probes to detect VGLUT2 mRNA (silver grains). **A-A1:** TH and VGLUT2 mRNAs in the ventral mesencephalon of an E15 rat. Note the strong overlap in regional co-localization of both mRNAs. **B-B1:** At E18, there is little overlap in the regional distribution of the two mRNAs. **A1** and **B1** are enlargements of the areas outlined in dashed line in **A** and **B**. **C:** Density of VGLUT2 mRNA labeling (number of silver grains per 500 μm^2 of section) in TH-Dig positive areas of mesencephalic sections from embryos at different ages. Both E18 and E21 values are significantly lower than E15 and E16 values (means \pm SEM from 3 embryos at E15 and E18 and 5 embryos at E16 and E21). *** $p < 0.001$ by ANOVA and Tuckey post-hoc test. **D:** Presence of VGLUT2 mRNA in freshly dissociated mesencephalic DA neurons (cells 1-3) identified by the presence of TH mRNA. Cell 4 only expresses TH mRNA, while cell 5 only expresses VGLUT2. MS, mesencephalon plus striatum used as positive control; m, muscle, used as negative control.

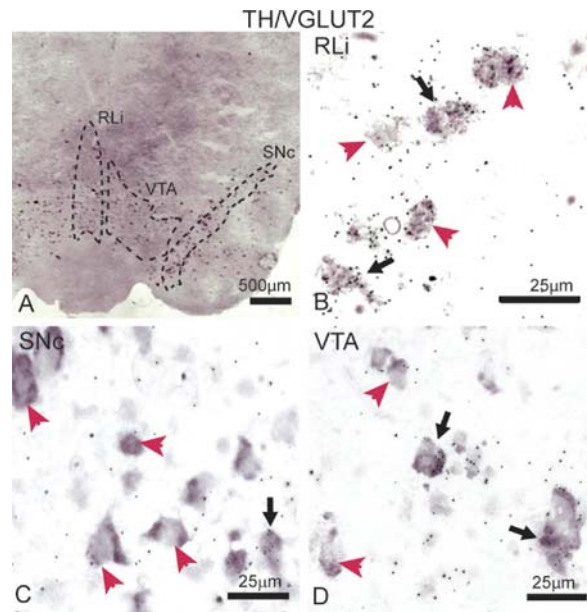


Figure 2: Co-expression of TH and VGLUT2 mRNA in RLi, VTA or SNc neurons of 15 day-old normal rats. Double *in situ* hybridization with DIG-labeled and radiolabeled probes as in Fig. 1 (TH mRNA in purple, and silver grains for VGLUT2 mRNA). **A** and **B**: Co-expression of VGLUT2 and TH mRNA is observed in a subset of DA neurons (black arrows) in the rostral linear nucleus of the raphe (RLi). Many other neurons displayed only TH mRNA (red arrows). **C** and **D**: A few neurons in the SNc (**C**) and VTA (**D**) of normal rats display both mRNAs (black arrows). Red arrows designate neurons containing TH mRNA only. Outlines of VTA, SNc and RLi drawn from Paxinos & Watson (2005).

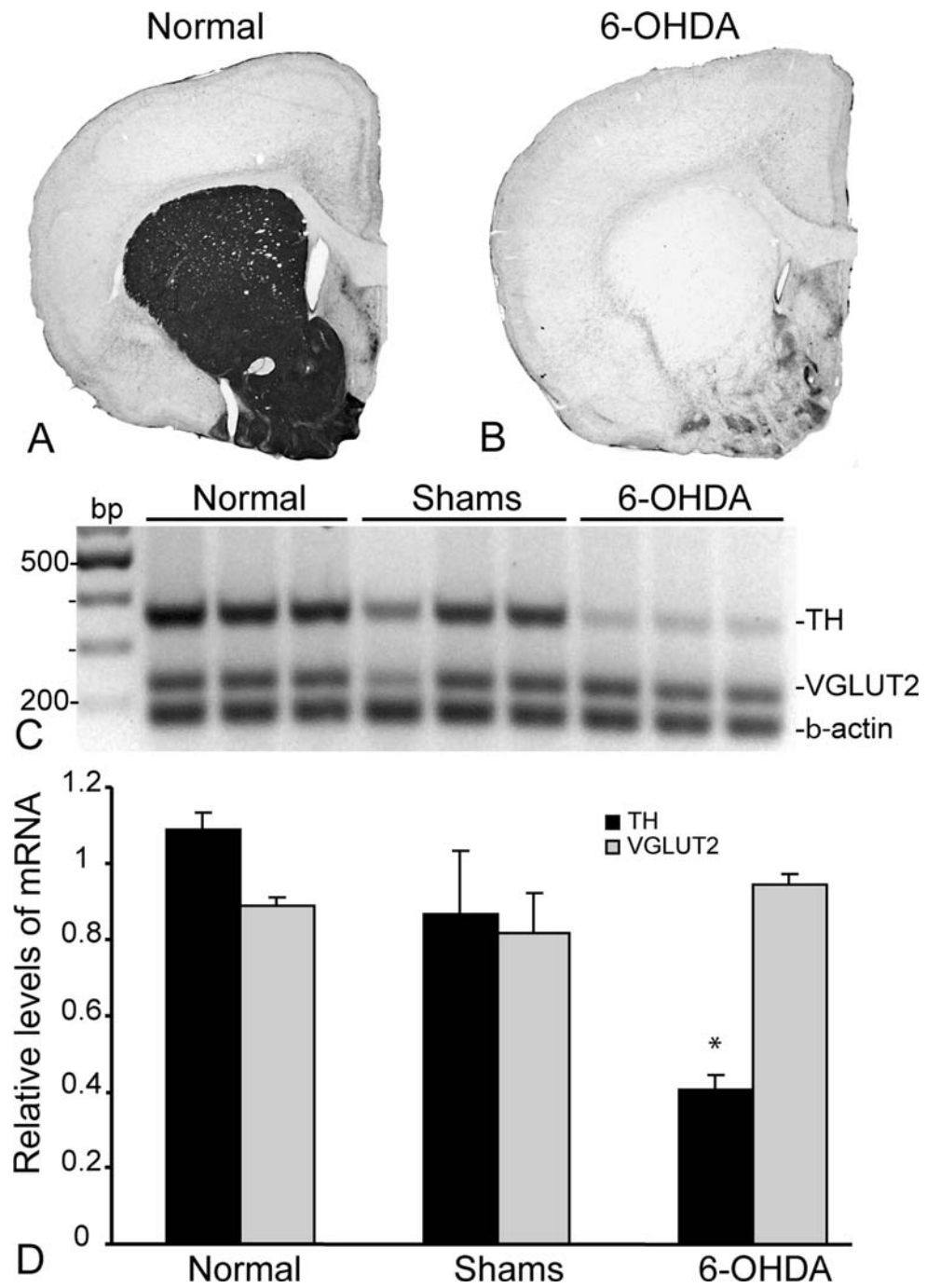


Figure 3: Effect of the neonatal 6-OHDA lesion on TH and VGLUT2 mRNA levels in the ventral mesencephalon of 15 day-old rats. **A** and **B**: TH immunoreactivity in the P15 rat striatum after i.c.v. injection of aCSF (sham) (**A**) or 6-OHDA (**B**). Note that the 6-OHDA lesion induced an almost complete loss of TH levels, confirming the success of the lesion.

C: Expression profile of relative TH, VGLUT2 and β -actin mRNA levels in the mesencephalon of P15 rats. Measurements were made by multiplex semi-quantitative RT-PCR from control, sham-operated and 6-OHDA-lesioned rats (3 animals per condition). **D**: Histogram representing the relative levels of TH and VGLUT2 mRNA measured from control, sham or lesioned tissue. The data represents the average \pm SEM from 3 rats per condition. Values were normalized to the signal obtained for β -actin mRNA levels. * <0.05 when compared to control or sham groups by ANOVA and Tuckey post-hoc test.

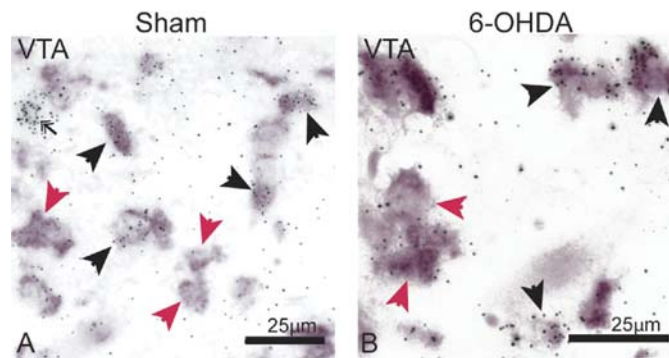


Figure 4: Co-expression of TH and VGLUT2 mRNA in VTA neurons of 15 day-old sham control (A) or 6-OHDA-lesioned (B) rats. A and B: Compared to normal (Fig. 2D) and sham control (A), a greater number of VTA neurons co-expressed TH and VGLUT2 mRNA (black arrows) in 6-OHDA lesioned rats (B). Red arrows designate neurons containing TH mRNA only, and double arrows neurons with VGLUT2 mRNA only.

Figure 5: Electron microscopic visualization of singly (TH or VGLUT2) and doubly (TH/VGLUT2) immunopositive axon terminals (varicosities) in the nAcb of normal (A-C) or 6-OHDA-lesioned (D-F) 15-day old rats. TH and VGLUT2 were respectively labeled with the immunoperoxidase (fine DAB precipitate) and the immunogold technique (dense, silver-intensified, gold particles). At the relatively low magnification of **A** and **D**, varicosities labeled for TH only (thin black arrows), VGLUT2 only (empty arrows) or TH and VGLUT2 (thick black arrows) may be observed in the same field. In **D**, note the presence of two doubly labeled varicosities closely apposed to a neuronal cell body (N in cytoplasm). In **B**, a triad is formed by three juxtaposed axon varicosities, one of which shows TH labeling only (thin black arrow) and the two others VGLUT2 labeling only (empty arrows). In **C**, the thick black arrows designate two varicosities along the same axon, which display both TH and VGLUT2 labeling. Both of these varicosities make an asymmetrical synaptic contact (between small arrows) with a dendritic spine (asterisks). In **E**, a doubly labeled varicosity (thick black arrow) is seen emerging from its parent unmyelinated axon. To its right, a small profile (presumably axonal) is labeled for TH only (thin black arrow). In **F**, underneath a small profile singly labeled for VGLUT2, a larger, doubly labeled axon varicosity (thick black arrow) forms a symmetrical synaptic contact (between small arrows) with a dendritic spine (asterisk). Scale bars: 1 μm (**A** and **D**); 0.5 μm (**B**, **C**, **E** and **F**).

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES:

Rôle de l'expression de VGLUT2 dans la survie des neurones dopaminergiques

Pré requis :

Une sous-population de neurones DA du mésencéphale a la capacité d'exprimer VGLUT2. *In vivo*, nous avons observé par hybridation *in situ* que 2% des neurones de l'ATV expriment l'ARNm de VGLUT2 chez les rats de 15 jours postnataux. Suite à une lésion des neurones DA par injection de 6-OHDA, 27% des neurones DA survivants de l'ATV expriment l'ARNm de VGLUT2. Il semble donc qu'une induction de l'expression de VGLUT2 survienne suite au traitement pharmacologique à la désipramine et à la 6-OHDA (augmentation du nombre de neurones DA qui expriment VGLUT2). Cependant, il se peut que l'augmentation de la proportion des neurones dopaminergiques qui expriment VGLUT2 soit due en partie au fait que ces neurones sont moins sensibles à la dégénérescence induite par la 6-OHDA. *In vitro*, en culture le pourcentage de neurones DA isolés qui expriment VGLUT2 est de 75%. Ici encore, il n'est pas impossible que les neurones dopaminergiques qui survivent mieux dans des conditions artificielles et privés de contacts synaptiques sont ceux qui ont la capacité de produire et de libérer du glutamate.

Nous suggérons que l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques soumis à des conditions traumatiques leur confère une capacité de survie supérieure par rapport aux autres neurones dopaminergiques. Pour étudier cette hypothèse, nous avons effectué deux séries d'expériences. Premièrement, nous avons testé à l'aide d'un traitement qui augmente la survie des neurones dopaminergiques, si la proportion de neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2 était diminuée dans ces conditions. Deuxièmement, nous nous sommes intéressés à reproduire une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques dans nos cultures à l'aide de MPTP afin d'observer si les neurones qui expriment VGLUT2 survivent mieux à un traitement traumatique.

Effet d'un traitement visant à augmenter la survie des neurones dopaminergiques de rats dans des cultures de microgouttes.

La vératridine, un agoniste des canaux sodiques voltage dépendant augmente la survie des neurones DA *in vitro*, tel que démontré sur des cultures de neurones dopaminergiques prélevés sur des embryons de rats à E15.5 (Salthun-Lassalle et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs ont rapporté que la survie induite par application chronique de 0.8 μ M de vératridine est comparable à celle induite par le GDNF, mais s'effectue par un mécanisme indépendant. Cette promotion de la survie est de plus spécifique aux neurones dopaminergiques dans leurs conditions spéciales de culture qui favorise la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Salthun-Lassalle et al., 2004). Toutefois il a déjà été montré que la vératridine augmente la survie d'autres neurones en culture : cellules de Purkinje (2 μ M ; Ghomari et al., 2006) ; cellules des ganglions rétiniens (3 μ M ; Pereira & Araujo, 1997 ; 2000) ; neurones des ganglions de la moelle épinière (1.5 μ M, Hegarty et al., 1997) ; neurones sympathiques (1.5 μ M, Tanaka & Koike, 1997). Le mécanisme de survie passe par l'activation des canaux dépendant du voltage, puisque l'application de tétrodoxtine (TTX) abolit l'effet positif (Salthun-Lassalle et al., 2004). Ceci suggère que des stimulations excitatrices favorisent la survie des neurones dopaminergiques *in vitro*.

Nous suggérons que l'application de vératridine dans nos cultures va diminuer la proportion de neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2 en augmentant le nombre de neurones dopaminergiques qui n'expriment pas ce transporteur.

Matériels et méthodes :

Pour étudier nos hypothèses nous avons utilisé des **cultures primaires de neurones dopaminergiques**, réalisées à partir de blocs de l'ATV et de la SN prélevés sur des rats néonatales (1-2 jours postnataux) (voir Dal Bo et al, 2004). Les cellules ont été dissociées par ajout de papaïne, et par trituration mécanique. Les neurones mésencéphaliques ont été placés sur des lamelles de verres enduites d'agarose, sur lesquelles des micro-gouttes de poly-L-lysine/collagène sont recouvertes d'une monocouche d'astrocytes, ce qui permet d'isoler des neurones qui établissent des contacts synaptiques sur eux-mêmes (autapses).

L'évaluation du phénotype des neurones a été faite par **immunocytochimie**, à l'aide d'anticorps dirigés contre la tyrosine hydroxylase (TH, monoclonal de souris, Sigma; polyclonal de chèvre, Santa Cruz); contre VGLUT2 (polyclonal lapin, Synaptic System). Les anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488 et à l'Alexa 647 de souris et de lapin respectivement ont été utilisés.

Nous avons utilisé un **traitement** consistant en une application d'une solution de vératridine à 8 μ M à 2 jours d'intervalle à partir du temps 0 de la mise en culture pour une durée de 10jours.

Résultats :

Des tests préliminaires ont montré que l'application de 8 μ M de vératridine dans les cultures a doublé (augmentation de 205%) le nombre total de neurones DA qui survivent par rapport aux conditions contrôles (671 en contrôle contre 1380 avec vératridine pour 16 lamelles par condition) (Figure 8).

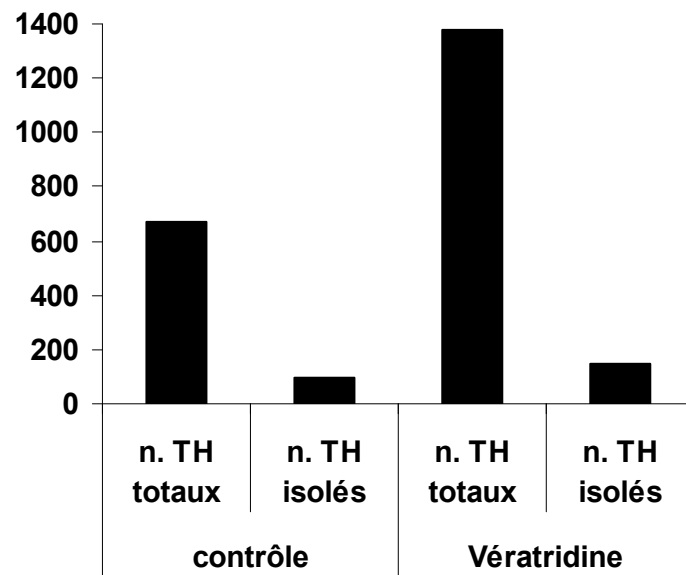


Figure 8 : Effet de la vératridine sur la survie des neurones dopaminergiques en culture. Diagramme représentant les nombres des neurones TH⁺ survivants totaux et isolés en culture dans les conditions contrôles ou en présence de 8 μ M de vératridine.

Le nombre de neurones dopaminergiques isolés a lui aussi été augmenté de 155% suite à l'application de vératridine (94 en contrôle contre 146 avec vératridine pour 24 lamelles par condition). Dans l'ensemble, le nombre de neurones dopaminergiques positifs pour VGLUT2 n'a pas changé de façon notable (71 en contrôle contre 87 avec vératridine) (Figure 8). Cependant, nous avons noté une différence significative dans la survie des neurones dopaminergiques isolés non VGLUT2 (23 en contrôle contre 59 avec vératridine), ce qui représente une augmentation de 256%. Ceci a entraîné un changement dans le

pourcentage de neurones exprimant VGLUT2, qui est passé de 75.5% dans le groupe témoin contre 59.6% dans le groupe traité à la vératridine (Figure 9).

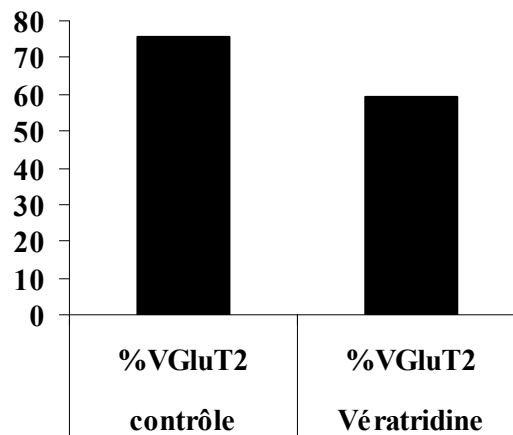


Figure 9 : Effet de la vératridine sur l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques isolés en culture. Diagramme représentant les pourcentages de neurones TH+/VGLUT2+ isolés sur l'ensemble des neurones TH+ isolés en condition contrôle ou avec un traitement chronique de vératridine (8 μ M).

Ces résultats préliminaires suggèrent que dans les conditions de microculture sans vératridine, les neurones dopaminergiques isolés qui expriment VGLUT2 ont une capacité supérieure à survivre sans contacts avec d'autres neurones. Cette survie préférentielle pourrait s'expliquer par l'excitabilité supérieure conférée par la relâche de glutamate sur le corps cellulaire de ces neurones.

Effet d'un traitement visant à augmenter la mort des neurones dopaminergiques de souris dans des cultures standard.

L'objectif de cette série d'expériences était d'essayer de reproduire une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques dans des cultures standard de souris. Comme le suggèrent nos résultats d'hybridation *in situ* après lésion à la 6-OHDA, nous voulions tester l'hypothèse que les neurones dopaminergiques qui expriment le VGLUT2 survivent mieux en condition traumatiques. Les premiers tests réalisés avec application de 6-OHDA dans les cultures ont montré une mort non-sélective de tous les neurones présents, dans un temps très court. Nous avons donc décidé d'utiliser le MPTP pour entraîner une mort sélective des neurones dopaminergiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, le MPTP est converti en MPP+ par la monoamine oxydase contenue dans les astrocytes et la microglie, avant d'être capturé par les transporteurs à dopamine. De nombreuses études *in vitro* ont utilisé le MPTP pour étudier la dégénérescence des neurones dopaminergiques, mais avec très peu de similitude dans les protocoles. Donc dans un premier temps, les objectifs étaient de déterminer la concentration idéale de MPTP à ajouter dans nos cultures pour entraîner la mort sélective de 50% des neurones dopaminergiques. Deuxièmement, il s'agissait de s'assurer que la dégénérescence était bien spécifique aux neurones dopaminergiques. Enfin, nous désirions observer les variations d'expression de VGLUT2 et de TH dans nos cultures après le traitement au MPTP.

Matériel et méthodes :

Pour cette étude nous avons utilisé des **cultures primaires de neurones dopaminergiques**, réalisées à partir de blocs de l'ATV et de la SN prélevés sur de souris TH-GFP néonatales (1-2 jours postnataux). Les cellules ont été dissociées par ajout de papaïne, et par trituration mécanique. Les neurones mésencéphaliques de souris ont été placés sur des lamelles de verres permettant le développement de cultures standard contenant des neurones dopaminergiques et GABAergiques.

Après 7 jours, certaines cultures ont été **traitées par 2.5µl d'une solution contenant du MPTP** à différentes concentrations (0.5, 1 et 5µM) diluée dans l'eau pure et stérilisée par filtration. Une seule application puis les cultures ont été conservées dans un incubateur à température et oxygénation contrôlée pendant 7 jours. Les cultures en conditions contrôles n'ont reçu qu'un volume équivalent d'eau filtrée.

Sept jours après le traitement, nous avons évalué la dégénérescence des neurones par comptage à l'aveugle, par rapport aux conditions, des neurones dopaminergiques identifiées par immunocyto-marquage avec un anticorps contre la tyrosine hydroxylase (TH; monoclonal de souris, 1/5000, Sigma), couplé à un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa 488 (1/200, Molecular Probes).

Pour évaluer si la dégénérescence était spécifique aux neurones dopaminergiques, des doubles marquages immunocytochimiques ont été menés avec des anticorps contre la TH (souris), et contre le GABA (lapin). Des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488 contre la souris, à l'Alexa 546 contre le lapin ont été utilisés. Enfin, pour évaluer l'effet du traitement au MPTP sur l'expression de VGLUT2 dans nos cultures, des doubles marquages immunocytochimiques ont été faits avec des anticorps contre la TH (souris) et le VGLUT2 (lapin), détectés par des anticorps secondaires anti-souris couplé à l'Alexa 488, et anti-lapin couplé à l'Alexa 647. L'évaluation des variations d'expression des marquages TH et VGLUT2 a été faite sur 5 champs (images) de chaque lamelle contrôle ou traitée au MPTP avec un microscope confocal. Les images ont été analysées avec le logiciel Metamorph.

Résultats :

Dans un premier temps, nous avons déterminé quelle concentration de MPTP était nécessaire pour entraîner la dégénérescence d'au moins 50% des neurones dopaminergiques dans nos cultures. Tel que déterminé par des comptes des immunomarquages anti-TH, la dose de 0.5 μM s'est avérée idéale. Sur un ensemble de 10 lamelles pour chaque condition, une baisse de 53% du nombre de neurones dopaminergiques a été observée dans les cultures traitées avec 0.5 μM de MPTP (105.3 \pm 15 neurones dopaminergiques par lamelle) par rapport aux conditions contrôles (223.4 \pm 21 neurones dopaminergiques par lamelle) (Figure 10). Avec des concentrations de MPTP plus élevées de 1 et 5 μM , des baisses respectives de 59% (92.8 \pm 13 neurones dopaminergiques par lamelle) et 67% (75.1 \pm 11 neurones dopaminergiques par lamelle) ont été observées.

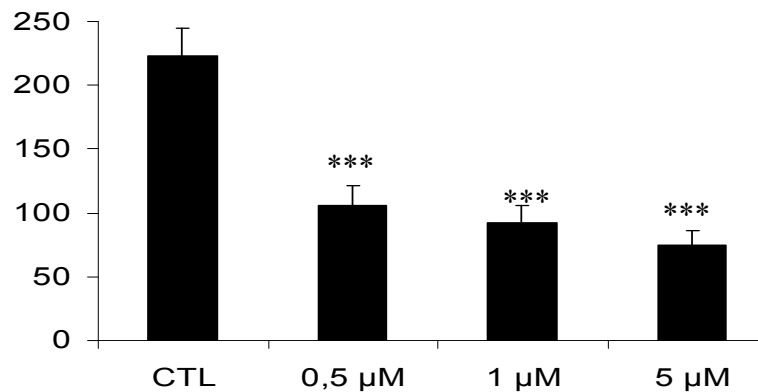


Figure 10 : Détermination de la concentration de MPTP à utiliser pour entraîner la mort de 50% des neurones dopaminergiques en culture. Evaluation du nombre de neurones dopaminergiques survivants par lamelle (N=10 pour chaque groupe) dans les cultures en condition contrôle ou en présence de MPTP à 3 concentrations (0,5; 1 et 5 μM). $p < 0.001$ by ANOVA and Tukey post-hoc test.

Pour s'assurer que seuls les neurones dopaminergiques étaient affectés par le traitement au MPTP, une évaluation du nombre de neurones GABAergiques, l'autre population de neurones retrouvée dans nos cultures, a été effectuée. Sur un ensemble de 8 lamelles pour chaque condition, une moyenne de 551 ± 42 neurones GABAergiques par lamelle a été observée en condition contrôle contre une moyenne de 547 ± 59 neurones GABAergiques dans les cultures traitées au MPTP (Figure 11). Pas de variation significative n'a été observée dans le nombre de neurones GABAergiques présents dans nos cultures suggérant que la dose de MPTP utilisée ($0.5 \mu\text{M}$) entraîne une dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques.

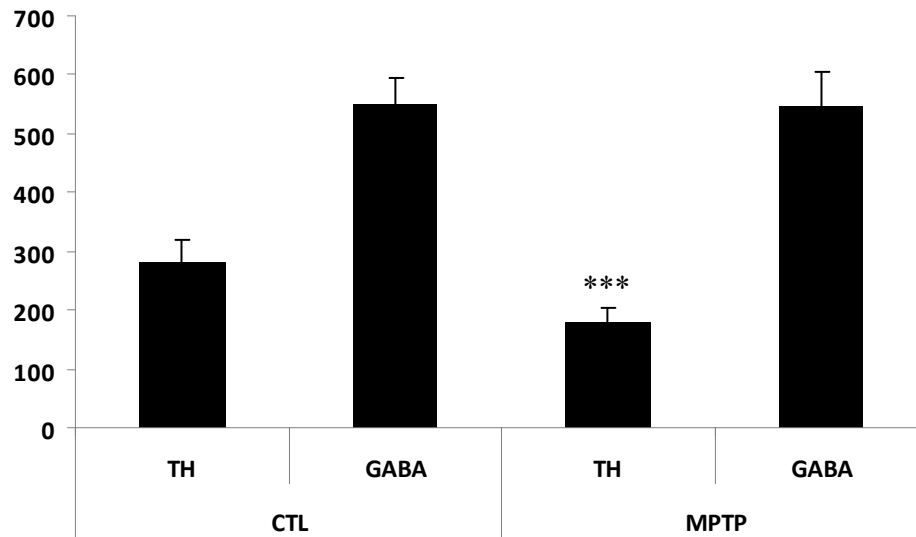


Figure 11 : Effet du MPTP sur la survie des neurones dopaminergiques et GABAergiques en culture. Evaluation du nombre de neurones dopaminergiques et GABAergiques par lamelle (n=8) survivants dans les cultures en condition contrôle ou en présence de $0,5 \mu\text{M}$ MPTP. $p < 0.001$ by ANOVA and Tukey post-hoc test.

Nous avons ensuite observé l'effet de l'application de 0.5 μ M de MPTP sur l'expression de VGLUT2 dans nos cultures. Comme la protéine VGLUT2 est seulement présente dans les terminaisons des neurones qui l'expriment, nous avons regardé la variation de l'immunoréactivité au niveau des prolongements axonaux. Pour un ensemble de 5 lamelles dans chaque condition, nous avons sélectionné aléatoirement 5 champs par lamelle dépourvus de corps cellulaires de neurones dopaminergiques, et nous avons quantifié l'immunoréactivité des marquages TH et VGLUT2 pour chaque lamelle. La densité du marquage TH a montré une diminution significative de 56% dans les cultures traitées au MPTP (4110 \pm 567 pixels/unité de surface/lamelle) par rapport aux conditions contrôles (9278 \pm 1230 pixels/unité de surface/lamelle). La densité du marquage VGLUT2 a aussi montré une diminution de 49% mais non significative entre les cultures traitées au MPTP (1319 \pm 329 pixels/unité de surface/lamelle) et les cultures contrôles (2553 \pm 859 pixels/unité de surface/lamelle) (Figure 12).

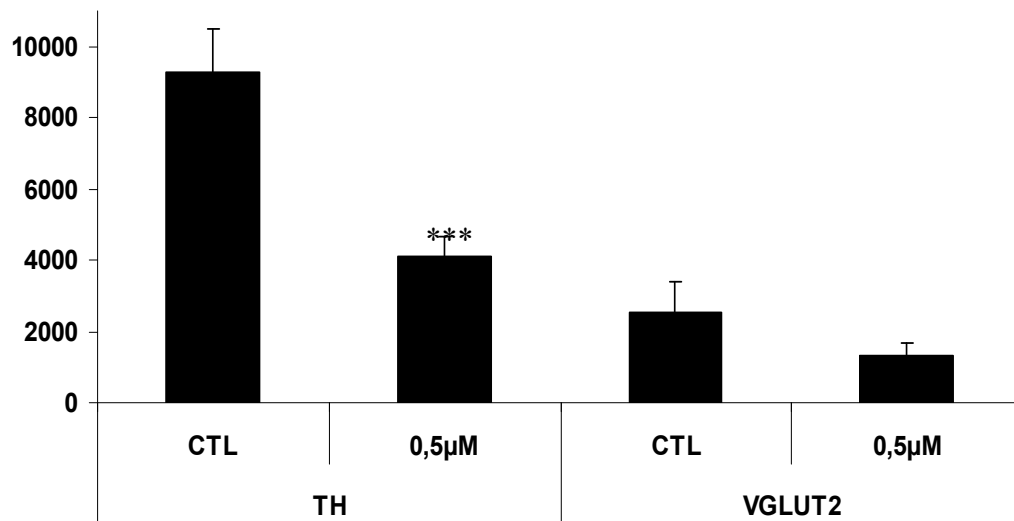


Figure 12 : Effet du MPTP sur l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques en culture. Evaluation des variations d'immunomarquage pour la TH et le VGLUT2 sur les lamelles de cultures de neurones mésencéphaliques en condition contrôle (CTL) ou en présence de 0.5 μ M de MPTP. La quantification de l'immunoréactivité a été faite sur 5 lamelles par conditions, et comprend 5 photos par lamelle (n=25). $p < 0.001$ by ANOVA and Tukey post-hoc test.

Ces résultats suggèrent que le traitement au MPTP entraîne la dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques dans nos cultures, et représente un bon modèle pour étudier la survie de ces neurones dans des conditions traumatiques. Toutefois, ces résultats n'ont pas montré d'augmentation de l'expression de VGLUT2 dans les cultures traitées au MPTP. Une forte baisse de l'immunomarquage de la TH a été observée dans les cultures traitées au MPTP par rapport aux conditions contrôles, alors que la baisse du marquage VGLUT2 était non significative. Bien que des neurones glutamatergiques purement VGLUT2 aient été retrouvés dans nos cultures (voir 1^{er} article), on peut considérer que la majorité du marquage VGLUT2 observé provient de neurones dopaminergiques. Dans ce contexte, une interprétation de nos résultats est que les neurones dopaminergiques qui expriment VGLUT2 ont une capacité de survie supérieure lorsqu'ils sont soumis à des traitements traumatiques. Cependant, l'absence de baisse significative du marquage de VGLUT2 pourrait simplement être le résultat de la variabilité du signal dans les groupes témoins. Ces résultats seront abordés dans la discussion.

DISCUSSION

1 : Régulation de l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques

1.1 Expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques en culture

La principale conclusion de l'étude menée sur les neurones dopaminergiques en culture est que ces neurones ont la capacité d'exprimer un des 3 transporteurs vésiculaires du glutamate. A l'instar des neurones sérotoninergiques qui expriment uniquement VGLUT3, ou des neurones noradrénergiques qui n'expriment que VGLUT2, les neurones dopaminergiques du mésencéphale expriment spécifiquement et uniquement le transporteur vésiculaire de type 2 soit VGLUT2. En effet, aucune expression d'un des 2 autres VGLUTs n'a été retrouvée dans les neurones dopaminergiques dans notre modèle *in vitro*. Nos données fournissent la première démonstration claire que ces neurones peuvent exprimer un phénotype glutamatergique, attestant de leur capacité à libérer du glutamate en plus de la dopamine.

Dans notre première étude, nous avons montré que la grande majorité (80%) des neurones dopaminergiques isolés était immunopositive pour VGLUT2 grâce à l'utilisation d'un modèle de culture qui permet d'isoler un neurone sur une goutte de collagène sur laquelle des astrocytes se sont préalablement développés (Sulzer et al., 1998 ; Bourque & Trudeau, 2000 ; Fasano et al., 2008). Le neurone peut ainsi se développer sans contact avec d'autres neurones, et établit sur lui-mêmes des contacts synaptiques appelés autapses. Cette condition expérimentale était nécessaire pour évaluer si la protéine VGLUT2 était bien présente dans les neurones dopaminergiques. En effet, la protéine est retrouvée que dans les prolongements axonaux mais n'est pas exprimée dans les corps cellulaires ni les dendrites des neurones. Cette expression exclusive dans les axones explique la différence entre nos résultats et la faible expression de VGLUT2 observé par immunomarquage sur des tranches de cerveau de rats dans l'ATV et la SN (Fremeau et al., 2002 ; Varoqui et al., 2002), et

suggère que la présence de la protéine VGLUT2 provient d'autres neurones projetant dans le mésencéphale ventral.

Pour enlever tout doute sur une expression artéfactuelle de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques en culture, nous avons mis des neurones sérotoninergiques dans les mêmes conditions de cultures et démontré que comme *in vivo*, ces neurones n'expriment que VGLUT3 (Fremeau et al., 2002, Gras et al., 2002). L'autre grande population de neurones qui composent nos cultures sont des interneurons GABAergiques (Michel & Trudeau, 2000). Tout comme pour les neurones sérotoninergiques, nous avons observés que les neurones GABAergiques dans nos conditions de culture n'expriment pas VGLUT2, attestant une fois de plus de l'expression spécifique de cette isoforme dans les neurones dopaminergiques. Notons par ailleurs que nous avons montré la présence de neurones purement glutamatergiques dans nos cultures, exprimant uniquement VGLUT2 ceux-ci pourraient être des neurones projetant au cortex préfrontal médian, tel qu'il a été suggéré par des expériences de marquage rétrograde sur des rats adultes (Hur & Zaborszky, 2005).

Le fait que la grande majorité des neurones dopaminergiques expriment VGLUT2 en culture est en opposition avec les premiers travaux d'hybridation *in situ* qui n'ont pas détecté d'ARNm de VGLUT2 dans le mésencéphale de rats adultes *in vivo*. En considérant que nos cultures sont préparées à partir de cerveau de rats nouvellement nés (entre 0 et 2 jours postnataux), on peut penser que l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale est régulée au cours du développement normal des animaux. Au cours de la période embryonnaire cette expression serait forte et diminuerait progressivement après la naissance. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine VGLUT2 à différents temps après la mise en culture. Nous avons observé que dès les premières heures suivant la mise en culture, la présence de la protéine est détectable. En effet, 24h après la mise en culture la moitié des neurones dopaminergiques isolés exprimaient déjà VGLUT2. Cette expression est très intéressante car les prolongements axonaux ne sont pas encore bien développés et la présence de la protéine a été observée dans les corps cellulaires des neurones. A des temps plus tardifs, la

proportion de neurones dopaminergiques immunopositifs pour VGLUT2 a graduellement augmenté pour atteindre un plateau à 7 jours après la mise en culture, période où les contacts synaptiques entre les neurones en culture sont considérés fonctionnels (Bourque & Trudeau, 2000).

Donc nous avons montré que l'expression de VGLUT2 est rapide, sélective et persiste dans les neurones dopaminergiques en culture. Toutefois, les différences de proportion observées *in vitro* et *in vivo* nous obligent à préciser nos conclusions. L'utilisation de notre modèle de culture possède un intérêt particulier car il permet d'observer les terminaisons des neurones dopaminergiques et donc de détecter la protéine VGLUT2 dans les neurones identifiés. Le fait que les premières études d'hybridation *in situ* n'aient pas révélé d'expression d'ARN de VGLUT2 dans le cerveau n'exclue pas un faible niveau d'expression dans les neurones dopaminergiques *in vivo*. Toutefois, pour tester cette hypothèse des approches différentes sont nécessaires telle que la RT-PCR sur cellule unique. Dans une autre étude menée dans notre laboratoire, nous avons tiré profit d'une souris exprimant la protéine fluorescente verte (GFP pour l'anglais « green fluorescent protein ») sous le control du promoteur de la tyrosine hydroxylase (Sawamoto et al., 2001). Les neurones dopaminergiques dans ces souris expriment dans une forte proportion (92%) la GFP (Jomphe et al., 2005). A partir de ces souris, nous avons pu mettre en évidence que la majorité (92%) des neurones TH-GFP isolés en culture exprimaient aussi l'ARNm de VGLUT2 (Mendez et al., 2008). Mais, fait intéressant, toujours grâce à l'utilisation de ces neurones, nous avons pu montrer que la proportion de neurones dopaminergiques exprimant l'ARNm de VGLUT2 était différente suivant les conditions de cultures. Dans les conditions de cultures normales, dites standard, contenant des neurones GABAergiques et dopaminergiques, la proportion de neurones TH-GFP exprimant les ARNm de VGLUT2 n'est plus que de 14%. D'autre part, dans des cultures préparées à partir de neurones dopaminergiques TH-GFP purifiés par FACS (pour l'anglais « fluorescent-associated cell sorting »), la proportion de neurones dopaminergiques exprimant l'ARNm de VGLUT2 est de 45% (Mendez et al., 2008). Ces résultats suggèrent d'une part, que dans notre système

de micro-cultures le phénotype glutamatergique est probablement surexprimé et d'autre part, que les neurones dopaminergiques ont la capacité d'induire l'expression de VGLUT2 suite à une perturbation de leurs conditions environnementales.

1.2 Expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques de rats témoins

Dans notre deuxième étude, nous avons confirmé qu'une faible proportion de neurones dopaminergiques de l'ATV a la capacité d'exprimer l'ARNm de VGLUT2, suggérant que ces neurones ont le potentiel d'utiliser le glutamate comme neurotransmetteur. L'expression basale de l'ARNm de VGLUT2 est relativement faible dans l'ATV et la SN de rats postnataux. Nous avons dû utiliser une technique de double hybridation afin de détecter les faibles niveaux d'ARNm dans le mésencéphale ventral, ce qui a permis la résolution au niveau cellulaire. Cependant, il s'agit d'une technique peu sensible comparée à l'immunodétection ou à la RT-PCR sur cellule unique.

Nos travaux montrent que l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques est modulée au cours du développement et est détectable surtout dans les stades les plus précoces, et diminue ensuite lors de la maturation postnatale. Nos résultats sont en accord avec les démonstrations faites par deux autres groupes de recherche, confirmant la présence des ARNm de VGLUT2 dans une sous-population de neurones dopaminergiques du mésencéphale (Kawano et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007). Toujours en accord avec les observations de Kawano et ses collaborateurs, une différence d'expression a été observée entre l'ATV et la SN. Bien que la proportion de neurones dopaminergiques exprimant l'ARNm de VGLUT2 dans l'ATV était faible chez les rats juvéniles, elle était clairement supérieure à celle de la SNc, tel que déjà rapporté chez les rats adultes (Kawano et al., 2006). Nous avons également remarqué qu'il existe aussi une ségrégation dans la distribution des neurones doublement marqués : les régions qui en contiennent le plus sont les régions les plus médiales et rostrales de l'ATV, les noyaux LRI et paranigral de l'ATV étant ceux où sont retrouvés le plus de neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2.

Comme préalablement observé en culture, nous avons montré que l'expression de l'ARNm de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques est régulée au cours du développement. Dans les tranches de cerveaux d'embryons de 14 et 16 jours, une forte

expression de l'ARNm de VGLUT2 est retrouvée dans le mésencéphale au niveau où les neurones dopaminergiques se forment (Kalsbeek et al., 1988). Toutefois à des âges plus avancés, tels que 18 et 21 jours embryonnaires, une baisse de l'expression du marquage de l'ARNm de VGLUT2 a été observée dans les cellules TH positives. A 18 jours embryonnaires, les neurones dopaminergiques sont retrouvés à la position relative qu'elles occuperont dans les animaux adultes et leurs projections commencent à atteindre leurs cibles dans le néostriatum (Bayer et al., 1994 ; Specht et al., 1981; Voorn et al., 1988). Notons qu'une décroissance du marquage de VGLUT2 a déjà été rapportée dans l'ensemble du cerveau de rats au cours du développement (Boulland et al., 2004), suggérant qu'une répression du phénotype se produit effectivement au cours de la maturation dans l'ensemble du système nerveux central. Il se peut que lorsque les neurones dopaminergiques arrivent à leur place définitive, l'expression de VGLUT2 soit réprimée. Une hypothèse serait donc que cette expression transitoire du phénotype glutamatergique soit importante pour la migration cellulaire ou une autre étape du développement des neurones dopaminergiques telle que la synaptogénèse. Notons aussi que la technique de double hybridation *in situ* que nous avons utilisée ne nous a pas permis de faire une véritable évaluation du nombre de neurones TH positifs exprimant les ARNm de VGLUT2, puisque dans le tissu embryonnaire la révélation du marquage à la digoxigénine pour la tyrosine hydroxylase n'a pas permis de délimiter clairement les corps cellulaires individuels des neurones dopaminergiques.

Toutefois, il faut soulever que nos résultats bien qu'en accord avec les études de Kawano et collaborateurs (2006), et Yamaguchi et collaborateurs (2007), diffèrent au niveau des proportions observées. En effet, dans nos conditions expérimentales, la proportion de neurones dopaminergiques coexprimant les ARNm de VGLUT2 était de 2% dans l'ATV, et de 24% dans le LRI, contre 19 % dans l'AVT et 52.7% dans le LRI dans l'étude de Kawano et collaborateurs (2006) effectuée sur des rats adultes. De plus, dans l'étude de Yamaguchi et collaborateurs (2007) menée aussi sur des rats adultes, seulement 7 neurones dopaminergiques sur un total de 6357 ont montré une expression de VGLUT2. Les 3 études

ont en commun la détection de l'ARNm de VGLUT2 à l'aide de grains d'argent, mais la détection de la tyrosine hydroxylase diffère puisqu'une immunodétection a été utilisée dans l'étude de Kawano. La différence de sensibilité entre l'hybridation *in situ* et l'immunocytochimie pourrait expliquer la différence observée dans les proportions. Nous savons qu'il existe une hétérogénéité entre les neurones dopaminergiques du mésencéphale entre l'ATV et la SN, mais aussi à l'intérieur d'un même noyau. Plusieurs gènes sont exprimés à des niveaux différents entre les neurones dont la tyrosine hydroxylase, la calbindine, les DATs, VMAT2, les récepteurs D1 et D2 (Ciliax et al., 1995; Fallon & Moore, 1978; Gates et al., 2006; Gerfen et al., 1987; Gibb & Lees, 1991; Graybiel et al., 1987; Gonzalez-Hernandez et al., 2004; Korotkova et al., 2004; Matsushita et al., 2002; Raisman-Vozari et al., 1991). Des faibles niveaux de TH pourraient ne pas être détectés dans nos conditions, et mentionnons aussi qu'il existe une régulation particulière du promoteur de la tyrosine hydroxylase au cours du développement.

En utilisant des souris TH-GFP, des niveaux plus faibles d'expression des ARNm de la tyrosine hydroxylase ont été montrés vers la fin de la période embryonnaire et à la naissance pour augmenter à nouveau à la fin de la première semaine postnatale et atteindre des niveaux proches de ceux retrouvés chez les animaux adultes à la fin de la 2^{ème} semaine postnatale (Matsushita et al., 2002). En utilisant ces souris et de la RT-PCR sur des neurones isolés après dissociation aigue, nous avons montré que 24% et 15% des neurones dopaminergiques du mésencéphale chez les souris néonatales et adultes, respectivement, exprimaient l'ARNm de VGLUT2 (Mendez et al., 2008). La RT-PCR est une technique d'amplification qui permet de détecter les faibles niveaux d'ARNm que l'hybridation *in situ* ne permet pas de montrer. Toutefois, si on se réfère aux résultats obtenus *in vitro* sur les cultures (Sulzer et al., 1998 ; Dal Bo et al., 2004) et ceux obtenus *in vivo* sur les tranches, nous concluons que la perturbation de l'homéostasie et de l'environnement des neurones dopaminergiques entraîne la surexpression du phénotype glutamatergique dans les neurones dopaminergiques. La dissociation aigue est aussi une technique traumatique importante qui pourrait entraîner la dérégulation des gènes tout comme la mise en culture.

Donc, nous ne pouvons donner qu'une approximation de la proportion de neurones dopaminergiques qui ont la capacité d'exprimer un phénotype glutamatergique dans des animaux témoins, et ces résultats peuvent varier en fonction des techniques de détection utilisées.

Un autre résultat intéressant obtenu dans notre étude d'hybridation *in situ* sur les animaux témoins, est la présence de neurones purement glutamatergiques dans l'ATV et la SNc. Ce résultat est en accord avec nos observations faites en culture (Dal Bo et al., 2004) ainsi qu'avec les autres recherches menées *in vivo* sur des rats adultes (Kawano et al., 2006; Nair-Roberts et al., 2008; Yamaguchi et al., 2007), et confirme la suggestion de l'existence d'une population de neurones purement glutamatergiques faite suite aux travaux de marquage rétrograde par injection de billes fluorescentes dans le cortex préfrontal de rats adultes (Hur & Zaborszky, 2005). Ces neurones purement glutamatergiques n'ont pas une distribution homogène à l'intérieur de l'ATV. Les sous-régions qui en contiennent le plus sont les plus antérieures et médiales. Elles correspondent à la région rostrale de l'ATV et le noyau paranigral. De plus faibles expressions ont été retrouvées dans le noyau parabrachial et la SN (Yamaguchi et al., 2007). Cette distribution ressemble à celle des neurones dopaminergiques qui expriment l'ARNm de VGLUT2.

Cette population correspondrait à 12% des neurones contenus dans l'ATV et la SN (Mendez et al., 2008), et pourrait expliquer en partie les réponses glutamatergiques obtenues dans le noyau accumbens chez la souris suite à la stimulation de l'ATV (Chuhma et al., 2004) et dans le cortex préfrontal chez le rat (Lavin et al., 2005). L'injection unilatérale de 6-OHDA dans l'ATV supprime les réponses excitatrices dans le cortex préfrontal unilatéral (Lavin et al., 2005). Toutefois, un gros doute subsiste sur le fait que la libération de glutamate provienne uniquement des fibres dopaminergiques. En effet, les latences des réponses suite à l'excitation électrique de l'ATV étaient en moyenne de 6.2ms (Lavin et al., 2005). Or, en considérant que les fibres dopaminergiques sont non-myélinisées et que leur vitesse de conduction est comprise entre 0.55 and 11.5 m/s (Deniau et al., 1980; Thierry et al., 1980), la latence attendue pour ces réponses devrait être

comprise entre 9.5 et 18ms (Lapish et al., 2006). Par conséquent, il est possible que des fibres de neurones purement glutamatergiques soient responsables de ces réponses excitatrices rapides obtenues chez les rats adultes. En comparaison, la moyenne des latences des réponses excitatrices dans le nAcb de tranches de cerveaux de jeunes souris, était de 19.1ms (Chuhma et al., 2004). De plus, dans les tranches de cerveau de souris de plus de 3 semaines postnatales, il n'est plus possible d'enregistrer des réponses glutamatergiques dans le nAcb suite à la stimulation électrique de l'ATV (Chuhma et al., 2004). Comme nous avons montré que la proportion de neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2 diminue au cours du développement, il semble raisonnable de penser que les réponses glutamatergiques enregistrées dans le cortex préfrontal de rats adultes sont dues à la population de neurones purement glutamatergiques. La seule technique qui permettrait de s'assurer qu'un neurone dopaminergique libère du glutamate sur un neurone cible, serait de faire un double enregistrement cellulaire à la fois dans un neurone dopaminergique de l'ATV et d'un de ces neurones cibles dans le nAcb ou le CPF. Cependant, vu la faible proportion de neurones dopaminergiques qui expriment l'ARNm de VGLUT2 et le faible taux de réponses obtenues par stimulation électrique de l'ATV dans les études de Lavin et de Chuhma, la probabilité de réussir ce type d'enregistrement est très faible.

1.3 Modulation de l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques de rats lésés

Dans la perspective de trouver une explication à propos des différences des proportions de neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2 entre les conditions *in vitro* et *in vivo*, nous avons décidé d'utiliser un modèle de lésion à la 6-hydroxydopamine afin de perturber l'homéostasie des neurones dopaminergiques du mésencéphale. L'utilisation d'une injection intraventriculaire de 6-OHDA dans de jeunes rats est un modèle qui permet d'étudier la plasticité du système dopaminergique suite à un traumatisme (Fernandes Xavier et al., 1994; Joyce et al., 1996; Neal-Beliveau and Joyce, 1999; Penit-Soria et al., 1997). Bien qu'il puisse s'y apparenter au premier abord, ce modèle ne représente pas réellement un modèle de la maladie de Parkinson, principalement à cause de l'âge précoce auquel est effectuée la lésion. En fait ce modèle de lésion reproduit chez les rats adultes les symptômes de la maladie de Lesch-Nyhan, qui est une maladie développementale affectant les ganglions de la base (Visser et al., 2000).

Dans notre étude, pour étudier l'effet à court terme de l'adaptation du système dopaminergique, nous avons choisi de sacrifier les animaux soumis à la lésion à la 6-OHDA 10 jours après l'injection, à 15 jours postnataux. Il s'agit de la période où la synaptogénèse de ces neurones au niveau de leurs cibles dans les striatum dorsal et ventral n'est pas terminée (Voorn ,et al., 1988). Les rats ont reçu une injection unique de désipramine afin de bloquer les transporteurs membranaires sérotoninergiques et noradrénergiques et de protéger l'intégrité de ces 2 systèmes avant l'injection bilatérale de 6-OHDA pour que la toxine n'agisse que sur les neurones dopaminergiques. Dans les animaux lésés par la 6-OHDA, une forte diminution du nombre de neurones dopaminergiques dans le VTA et la SN a été observée. Dans les neurones dopaminergiques survivants, nous avons constaté une augmentation du nombre de neurones TH positifs exprimant les ARNm de VGLUT2 (10.3 neurones par section contre 1.8 dans les animaux témoins) et par conséquent une forte augmentation de la proportion de neurones

TH+/VGLUT2+ (26.3% contre 1.8% dans les témoins). Une augmentation du nombre et de la proportion dans les neurones dopaminergiques de l'ATV exprimant l'ARNm de VGLUT2 a aussi été observée dans les animaux « shams » (6.9 neurones par section pour un pourcentage de 7.1% dans ce groupe), qui sont sensés reproduire les conditions contrôles, mais reçoivent juste la désipramine et l'injection bilatérale intraventriculaire d'une solution sans toxine.

Cette augmentation en proportion dans le groupe « sham » pourrait s'expliquer par un effet direct de la désipramine. Pour tester cette hypothèse, un autre groupe d'animaux a donc reçu une injection unique de désipramine sans chirurgie, et nous avons constaté aussi une augmentation faible de la proportion de neurones TH+/VGLUT2+ (3.4%). Ces observations mettent en évidence la capacité d'induction du phénotype glutamatergique dans les neurones dopaminergiques. De plus, il a déjà été montré que l'injection chronique d'anti-dépresseurs tels que la désipramine ou la fluoxétine entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de VGLUT1 dans certaines structures du cerveau dont le cortex et l'hippocampe (Moutsimilli et al., 2005; Tordera et al., 2005), et de l'ARNm de VGLUT2 dans le thalamus (Tordera et al., 2005). Ceci suggère qu'une perturbation de l'homéostasie noradrénergique et sérotoninergique peut influencer la régulation des gènes des VGLUTs. De plus, une forte augmentation de l'expression de VGLUT2 (21.5% des neurones dopaminergiques de l'ATV exprimant l'ARNm de VGLUT2 contre 3.4% dans les animaux témoins) a aussi été observée dans des animaux sacrifiés 2 jours suite à la lésion, à une période où le nombre de neurones dopaminergiques n'est que faiblement diminué. Ceci suggère qu'il y ait une activation rapide de l'expression de VGLUT2 dans ces conditions. Sans toutefois atteindre les valeurs observées dans les cultures, nos résultats suggèrent fortement que l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques *in vivo* est réprimée durant la période postnatale, mais que des perturbations physiologiques puissent induire l'expression de ce gène ou simplement lever sa répression.

Finalement, il est intéressant de noter que malgré que l'injection de désipramine ait été suivie ou non de l'injection de 6-OHDA, aucune augmentation de l'expression de

VGLUT2 n'a été observée dans les neurones dopaminergiques de la SNc. Ceci pourrait refléter une différence fondamentale entre les neurones dopaminergiques de l'ATV et ceux de la SN. Cette différence peut encore une fois être considérée dans le contexte de l'hétérogénéité observée dans l'expression de plusieurs gènes entre ces 2 noyaux, tel qu'il a déjà été montré pour la tyrosine hydroxylase, la calbindine, VMAT2 ou encore les DATs (Blanchard et al., 1994 ; Korotkova et al., 2005).

1.4 Expression de VGLUT2 dans les terminaisons axonales des neurones dopaminergiques

Notre modèle de culture cellulaire en microgouttes nous a donné la chance d'étudier la présence de la protéine VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques isolés. Nous avons donc montré que la protéine VGLUT2 se retrouvait dans la majorité des neurones TH+ isolés. L'expression de VGLUT2 est rapide puisque retrouvée 24h après la mise en culture, et cette expression est soutenue puisque retrouvée 3 semaines après la mise en culture. Nous avons montré qu'il existait une ségrégation dans l'expression de la protéine VGLUT2 dans les prolongements axonaux des neurones dopaminergiques en culture. Les expériences de triple marquage avec la protéine synaptique SV2 ont montré une colocalisation parfaite avec VGLUT2, mais aussi que certains prolongements positifs pour la tyrosine hydroxylase n'exprimaient pas VGLUT2. Le fait que la protéine VGLUT2 ne soit pas retrouvée dans toutes les terminaisons suggère que certains prolongements ne libèrent que de la dopamine et d'autres du glutamate ou une combinaison de dopamine et de glutamate. Cette hétérogénéité dans l'expression de VGLUT2 et du glutamate dans les terminaisons des neurones est très intéressante pour plusieurs raisons. D'une part, la majorité des terminaisons doublement marquées TH+ et VGLUT2+ font contact sur le corps cellulaire. Cette observation est compatible avec la démonstration que l'immunoréactivité anti-glutamate n'est retrouvée que dans quelques prolongements proche du corps cellulaire dans la même préparation (Sulzer et al., 1998). Cette différence de répartition suggère une possible ségrégation de l'expression de VGLUT2 au cours de la différenciation des branches axonales des neurones dopaminergiques. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que dans nos études, 24h après la mise en culture, certains neurones dopaminergiques isolés présentaient des prolongements seulement positifs pour le VGLUT2 sans exprimer de tyrosine hydroxylase. Trois jours après la mise en culture tous les prolongements VGLUT2+ étaient aussi positifs pour la TH.

Dans l'objectif d'évaluer la pertinence physiologique de nos observations *in vitro*, nous avons également voulu voir si la protéine VGLUT2 était retrouvée dans les terminaisons dopaminergiques *in vivo*. Comme la majorité des neurones dopaminergiques qui expriment l'ARNm de VGLUT2 sont retrouvés dans l'ATV, dans les sous-divisions LRI et PN qui projettent principalement au nAcb (Gerfen et al., 1987; Swanson et al., 1982 ; Voorn et al., 1986), nous avons visualisé par microscopie confocale l'expression de VGLUT2 et de TH dans le nAcb. Bien que cette approche nous ait permis de voir un certain nombre de terminaisons doublement marquées, la faible taille des terminaisons et la possibilité de détecter des faux positifs nous ont amené à avoir recours à la microscopie électronique. Avec cette approche, nous avons observés que 28% des terminaisons TH+ étaient doublement immuno-marquées pour VGLUT2 dans le nAcb de rats de 15 jours postnataux. Ces résultats représentent la première démonstration de la présence dans les mêmes terminaisons des protéines de VGLUT2 et de la TH, confirmant clairement qu'*in vivo*, certaines terminaisons dopaminergiques de l'ATV qui projettent au noyau accumbens peuvent aussi contenir des vésicules glutamatergiques. Toutefois une forte différence entre les proportions de co-localisation est observée entre les résultats d'hybridation *in situ* et en microscopie électronique. Cette différence peut être expliquée par de différentes façons. D'une part, la détection d'ARN par hybridation *in situ* est une technique qui est moins sensible que l'immunomarquage. D'autre part, un même neurone dopaminergique peut émettre plusieurs prolongements, et il est possible qu'à 15 jours postnataux, les terminaisons qui co-expriment les 2 neurotransmetteurs soient les premières à atteindre leurs cibles dans le nAcb. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le développement des prolongements des neurones dopaminergiques se poursuit jusqu'à la fin de la 3^{ème} semaine postnatale. Il se peut aussi que la demi-vie de VGLUT2 soit prolongée par rapport à celle de son ARN. Finalement, comme il a été décrit que les prolongements axonaux des neurones de l'ATV sont de 2 types différents : ils diffèrent par leur diamètre et donc leur vitesse de conduction, mais aussi par leur nombre de varicosités (Gerfen et al., 1987 ; Prensa & Parent, 2001); il se pourrait que les neurones qui expriment la protéine VGLUT2

soit ceux qui expriment le plus de prolongements ou de varicosités, mais pour répondre clairement à cette question, des marquages unitaires de neurones dopaminergiques à l'aide d'injection de traceurs antérogrades dans l'ATV de rongeurs nouveaux nés devront être réalisés. L'utilisation de rats adultes ne semble pas indiquée pour aborder cette question, puisque des données obtenues sur des rats adultes à 90 jours postnatals montrent une complète disparition de la protéine VGLUT2 au niveau des terminaisons dopaminergiques, alors qu'une faible proportion de ces neurones continue à exprimer l'ARN (Berubé-Carriere et al., 2008 ; Descarries et al., 2008 ; Kawano et al., 2006 ; Yamaguchi et al., 2007).

Un des éléments les plus intéressants trouvé grâce à la microscopie électronique, a été de constater que la totalité des terminaisons dopaminergiques exprimant VGLUT2 étaient synaptiques (voir aussi Berubé-Carriere et al., 2008 ; Descarries et al., 2008). Les neurones dopaminergiques forment 2 types de terminaisons avec ou sans contacts synaptiques (Descarries et al., 1980 ; Pickel et al., 1981). Environ 30 à 40% des terminaisons seulement sont de type synaptique, et forment des synapses symétriques sur les dendrites et les épines des neurones du nAcb et du néostriatum (Voorn et al., 1986 ; Descarries et al., 1996); le reste est de type asynaptique ce qui veut dire qu'aucun élément post-synaptique n'est détectable. La présence de ces 2 types de terminaisons renseigne sur la capacité des neurones dopaminergiques à communiquer de façon volumique par leurs terminaisons asynaptiques telle que retrouvée dans d'autres systèmes de neurotransmission (Descarries et al., 1975, 1977; Beaudet & Descarries, 1978). Toutefois, nous avons montré que les terminaisons dopaminergiques exprimant le VGLUT2 forment des synapses asymétriques correspondant à des synapses de type glutamatergique (Berubé-Carriere et al., 2008 ; Descarries et al., 2008). Ceci renforce l'hypothèse que les neurones dopaminergiques ont la capacité de libérer du glutamate à partir de ces terminaisons.

Chez les animaux soumis à la lésion à la 6-OHDA, une forte diminution du nombre de terminaisons dopaminergiques dans le nAcb a été observée. Tout comme l'expression de l'ARNm de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques, une augmentation de la

proportion des terminaisons doublement marquées TH+/VGLUT2+ a été observée chez les animaux lésés (37% contre 28% chez les animaux témoins). L'injection de 6-OHDA a donc eu le même effet d'induction de l'expression de VGLUT2 dans les terminaisons des neurones dopaminergiques survivants, suggérant une fois de plus que le phénotype glutamatergique semble être réactivé suite à une perturbation de l'équilibre physiologique. Nous observons toujours une différence entre les proportions de colocalisation TH et VGLUT2 entre les résultats d'immunomarquage et d'hybridation *in situ* chez les animaux lésés, mais cette différence est atténuée par rapport aux animaux témoins. Comme mentionné auparavant, les neurones dopaminergiques exprimant le VGLUT2 peuvent envoyer plusieurs terminaisons et former plusieurs varicosités synaptiques au niveau de leurs cibles. Toutefois, cette augmentation de la proportion de terminaisons doublement marquées pourrait aussi provenir de l'expression de tyrosine hydroxylase dans des terminaisons auparavant seulement glutamatergiques. Nous avons suggéré dans notre premier article que les neurones dopaminergiques qui expriment VGLUT2 pouvaient peut-être former des projections purement dopaminergiques et/ou purement glutamatergiques, et des terminaisons où les 2 protéines sont colocalisées. En considérant que la tyrosine hydroxylase n'est pas la meilleure protéine pour marquer les terminaisons dopaminergiques, l'utilisation d'anticorps contre les DATs pourrait permettre de répondre à la question si certains prolongements des neurones dopaminergiques ne libèrent que du glutamate.

Un dernier point intéressant de cette étude de lésion fut de voir la diminution de terminaisons purement glutamatergiques au niveau du nAcb. Une diminution de 35% a été observée dans les animaux lésés par rapport aux animaux témoins. L'effet de la 6-OHDA passe par une capture de la toxine à travers les DATs, et pour l'instant aucune étude n'a rapporté la présence de DATs sur d'autres neurones. Toutefois, cette perte a déjà été observée dans d'autres recherches (Aymerich et al., 2006 ; Day et al., 2006 ; Ingham et al., 1998), et il a été suggéré que la perte de ces terminaisons glutamatergiques serait attribuable à la déplétion de dopamine au niveau des épines des neurones striataux suite au

dérèglement des canaux calciques de type L présents sur les épines (Day et al., 2006). Mais à la lumière de nos résultats, il se pourrait que cette disparition des terminaisons glutamatergiques provienne de projections dopaminergiques qui n'expriment que le VGLUT2. Comme mentionné préalablement une détection avec un anticorps contre les DATs ou contre la dopamine directement pourrait répondre à cette question.

2 : Effets du glutamate et de la dopamine au cours du développement : plasticité fonctionnelle

De nos résultats, une hypothèse qui émerge est que l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate dans les neurones dopaminergiques joue un rôle particulier au cours du développement. De par l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques immatures en cultures, ou au cours des périodes prénatale et postnatale, et sa disparition au cours de la maturation du système nerveux central, il semble que la capacité des neurones dopaminergiques à libérer du glutamate participe d'une façon ou d'une autre à la mise en place des circuits dopaminergiques au cours de la neurogénèse. Cette hypothèse est aussi supportée par l'observation d'une régulation de l'expression de VGLUT2 dans l'ensemble du système nerveux central, qui est diminuée après la naissance au profit de l'expression de VGLUT1 (Boulland et al., 2004 ; Hallberg et al., 2006).

La neurogénèse est l'un des processus développementaux qui sous-tendent la formation du système nerveux. Ce phénomène regroupe plusieurs étapes : la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. La coordination entre les étapes dépendant de la régulation de plusieurs paramètres dont les facteurs de transcriptions, l'expression de canaux ioniques, l'apparition de récepteurs et la libération des neurotransmetteurs (Nguyen et al., 2001). Tous ces processus vont entraîner la formation des synapses et de réseaux neuronaux. Un des acteurs importants est l'excitabilité neuronale, qui a un rôle crucial dans le maintien des neurones au cours du développement du système nerveux et ensuite dans la transmission de l'information. Les neurotransmetteurs tels que le glutamate et le GABA sont présents très tôt au cours du développement et régulent la prolifération des précurseurs neuronaux ainsi que la migration neuronale (Behar et al., 1999; Benitez-Diaz et al., 2003; Haydar et al., 2000; LoTurco et al., 1995).

Les récepteurs NMDA et non-NMDA du glutamate sont exprimés très précocement dans les neurones post-mitotiques, et l'activation des récepteurs kainate et AMPA inhibe la prolifération cellulaire dans le cortex (LoTurco et al., 1995). Par contre, la prolifération des

cellules précurseurs des neurones striataux est quand à elle activée par les récepteurs NMDA (Luk et al., 2003). L'activation des récepteurs NMDA joue un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans plusieurs régions du cerveau où des populations de cellules gardent un potentiel neurogénique tout au long de la vie, par exemple dans le gyrus dentelé de l'hippocampe des rats, primates et humains (Cameron et al., 1995 ; Eriksson et al., 1998 ; Gould et al., 1998). Il en résulte que le blocage des récepteurs NMDA *in vivo* entraîne une augmentation de la formation et la prolifération neuronale des cellules granulaires dans le gyrus dentelé de rats adultes (Cameron et al., 1995). Toutefois le mécanisme de régulation de la prolifération exercée par les récepteurs NMDA reste pour l'instant inconnu. Les récepteurs mGluR sont aussi retrouvés dans les zones à forte activité de neurogénèse dans les cerveaux pré- et postnatals (Di Giorgi Gerevini et al., 2004). Les mGluRs seraient surtout impliqués dans la stabilisation des réponses synaptiques (Miskevich et al., 2002).

L'établissement de réseaux neuronaux commence par la croissance d'axones qui reconnaissent leurs cellules cibles et vont former des contacts synaptiques. Ce processus peut être divisé en 2 phases : la première, la formation de synapse qui comprend l'établissement de la communication synaptique fonctionnelle; la seconde, la maturation synaptique, qui comprend la différenciation fonctionnelle et morphologique des synapses. Les 2 phases requièrent l'implication des éléments pré- et post-synaptiques. Les récepteurs NMDA stimulent aussi la croissance des neurites et des dendrites et favorisent le branchement des cellules de l'hippocampe (Mattson et al., 1988 ; Brewer & Cotman, 1989 ; Wilson et al., 2000). Pour assurer un bon développement des synapses, il faut qu'il y ait accumulation de neurotransmetteurs au niveau de la spécialisation post-synaptique qui exprime les récepteurs. Les récepteurs NMDA sont les premiers récepteurs exprimés dans les synapses glutamatergiques. Par la suite, les synapses vont progressivement exprimer des récepteurs AMPA et kaïnate au cours du développement (Golshani et al., 1998 ; Petralia et al., 1999). Les mGluRs sont quand à eux exclus des éléments post-synaptiques au cours de

la formation des synapses, et commencent seulement à être exprimés après la première semaine postnatale (Golshani et al., 1998, Lopez-Bendito et al., 2002).

Ces données nous amènent à penser qu'un apport de glutamate puisse aider les neurones dopaminergiques à établir plus rapidement et/ou efficacement des contacts synaptiques. Il a été montré que l'activation des récepteurs mGluR du groupe 1 joue un rôle important dans le développement normal de la voie nigrostriée. En effet le blocage avec des antagonistes mGluR entraînent une diminution de l'innervation dans le striatum dorsal sur des tranches organotypiques de cerveaux de rats nouvellement nés, tandis que l'utilisation d'agonistes permet le développement normal (Plenz & Kitai, 1998), démontrant ainsi un rôle trophique du glutamate au cours du développement. L'influence positive d'un neurotransmetteur dans l'élongation et le développement des prolongements axonaux des neurones dopaminergiques semble d'autant plus importante dans le contexte des effets négatifs de la dopamine sur la maturation des terminaisons. En effet il a été montré que l'activation des récepteurs D1 inhibe la motilité des cônes de croissance de neurones de la rétine de poulet en culture (Lankford et al., 1987). De plus, dans le striatum de souris, l'injection d'agonistes des récepteurs D2 inhibe le développement des terminaisons dopaminergiques provenant de la substance noire, tandis que le blocage avec de l'halopéridol entraînait une augmentation de l'arborisation terminale (Parish et al., 2002; Fasano et al., 2008). Tout comme la sérotonine, la dopamine semble jouer un rôle inhibiteur sur l'élongation des neurites (McCobb et al., 1988). Il est donc intéressant de penser que l'expression de VGLUTs dans les neurones dopaminergiques et sérotoninergiques puissent constituer un stimulus essentiel au développement normal de leurs prolongements. Par ailleurs, des souris dont le gène de la tyrosine hydroxylase a été réprimé, bien qu'étant aphagiques et hypoactives, présentent un développement normal de leurs projections dopaminergiques (Zhou et al., 1995 ; Zhou & Palmiter, 1995).

3 : Modulation de l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques : plasticité du phénotype

Si on admet que l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques est transitoire et nécessaire seulement pour le développement des circuits neuronaux, nos résultats ont aussi montré qu'il est possible de réactiver ce phénotype dans diverses conditions. Premièrement, il faut noter que la mise en culture représente le meilleur modèle pour observer et étudier la réactivation du phénotype glutamatergique. La perturbation de l'équilibre homéostatique des neurones dopaminergiques permet d'amplifier l'expression de VGLUT2 dans ces neurones. Toutefois, nous avons observé des différences d'expression entre les différents types de cultures que nous utilisons. Il semble que l'interaction avec d'autres neurones puissent jouer un rôle dans la répression de l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques. En effet, la proportion de neurones TH positifs isolés exprimant VGLUT2 est de 80%. Toutefois, des évaluations sur des microgouttes contenant plus d'un neurone dopaminergique ont montré que la proportion de neurones dopaminergiques exprimant la protéine VGLUT2 n'était plus que de 30% (résultats non montrés). Suite à ces résultats préliminaires nous avons testé l'effet de différents agonistes ou antagonistes des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques ionotropes ou métabotropes sans toutefois observer de variations significatives de la proportion de neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2. Cependant, par RT-PCR sur cellule unique, une forte diminution de la proportion de neurones dopaminergiques exprimant l'ARNm de VGLUT2 a été observée entre les neurones dopaminergiques qui se développent dans des cultures standard (donc en présence d'autres neurones GABAergiques et glutamatergiques) (Mendez et al., 2008). Les connexions synaptiques des interneurones GABAergiques sur les neurones dopaminergiques s'établissent tardivement au cours du développement et se poursuivent après la naissance (Fishell & Van der Kooy, 1989). Il se peut que la répression observée de l'expression de VGLUT2 soit en partie due à ces interactions. La lésion des neurones GABAergiques striataux par l'injection unilatérale

d'acide quinolinique dans des souriceaux de 10 jours postnataux, entraîne une augmentation de la proportion de neurones dopaminergiques exprimant l'ARNm de VGLUT2 (Mendez et al., 2008). Comme ces neurones projettent sur les neurones dopaminergiques du VTA et de la SN, ces résultats suggèrent que les neurones GABAergiques jouent un rôle important dans la répression du phénotype glutamatergique des neurones dopaminergiques. Ces travaux suggèrent qu'une perturbation du programme développemental des neurones dopaminergiques puisse affecter l'expression de VGLUT2 dans ces neurones et donc modifier leur signalisation synaptique.

Une autre hypothèse à considérer est qu'il y aurait une survie préférentielle des neurones dopaminergiques qui ont la capacité d'exprimer le phénotype glutamatergique dans un contexte de perturbations traumatiques. Suite à l'injection de 6-OHDA dans les rats nouveaux nés nous avons observé que les neurones exprimant les ARNm de VGLUT2 semblaient survivre en plus grand nombre à la dégénérescence induite par la toxine. Cette hypothèse d'une survie préférentielle pourrait s'expliquer par plusieurs considérations. Il a déjà été montré que le glutamate, en plus de son action sur les processus de maturation des neurones au cours du développement, joue aussi un rôle dans le maintien et la survie de certains neurones. En effet, l'activation des récepteurs NMDA entraîne une augmentation de la survie des cellules granulaires cérébelleuses placées en culture (Balazs et al., 1988), tandis que l'application d'antagonistes des récepteurs NMDA entraîne la baisse de la survie de ces cellules (Balazs et al., 1988), ainsi que des neurones de la moelle épinière *in vitro* (Brenneman et al., 1990). Toutefois ces données ne semblent pas s'appliquer aux neurones dopaminergiques suite à une lésion unilatérale à la 6-OHDA chez les rats adultes, puisque l'administration prolongée sous-cutanée d'antagonistes des récepteurs NMDA et mGluR5 réduit la dégénérescence des neurones de la SNc (Armentero et al., 2006).

Dans notre étude, nous avons observé une différence dans la distribution des neurones dopaminergiques co-exprimant l'ARNm de VGLUT2 entre l'ATV et la SN. Il est aussi connu que les neurones dopaminergiques de l'ATV dégénèrent moins dans la maladie de Parkinson et sont moins sensibles à l'injection de toxines comme la 6-OHDA et le MPTP.

De plus, une hétérogénéité de l'expression de certains gènes existe entre les neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SN, avec par exemple une expression différentielle pour VMAT2 et les DATs (Blanchard et al., 1994 ; Gonzalez-Hernandez et al., 2004 ; Korotkova et al., 2005 ; Miller et al., 1999). Or une faible expression de DATs couplée à une forte expression de VMAT2 aurait un effet neuroprotecteur suite à l'administration de 6-OHDA ou de MPTP (Gonzalez-Hernandez et al., 2004 ; Miller et al., 1999). Une des explications possible serait que les neurones qui co-expriment le VGLUT2 soient justement ceux qui expriment de faibles niveaux de DATs et de forts niveaux de VMAT2.

Suite à la lésion à la 6-OHDA, il a été montré qu'une repousse axonale des neurones dopaminergiques survivants pouvait être observée dans les animaux lésés (Finkelstein et al., 2000), et que cette repousse est augmentée en bloquant les récepteurs D2 (Tripanichkul et al., 2003). Comme nous l'avons vu préalablement, la dopamine exerce un effet inhibiteur sur la croissance des neurones dopaminergiques, tandis que l'activation des récepteurs mGluR1 stimule cette croissance (Parish et al., 2002 ; Plenz & Kitai, 1998). Il est donc possible que les terminaisons dopaminergiques qui contiennent du VGLUT2 puissent être favorisées par cette libération de glutamate au détriment des autres terminaisons purement dopaminergiques.

Dans notre modèle de culture en microgouttes, nous avons observé qu'une forte proportion de neurones dopaminergiques isolés exprimait VGLUT2 et que cette expression augmentait au cours du temps, contrairement à l'expression observée *in vivo*. Nous avons émis l'hypothèse que notre système de microgouttes pouvait sélectionner la sous-population de neurones dopaminergiques ayant la capacité de libérer du glutamate et que cette libération favorisait leur survie en leur fournissant une excitabilité supplémentaire par rapports aux autres neurones dopaminergiques. En effet, il a été montré que l'augmentation de l'excitabilité des neurones dopaminergiques par la vératridine, un agoniste des canaux sodiques dépendant du voltage, favorisait la survie de ces neurones placés dans un système de culture provoquant leur dégénérescence sélective (Salthun-Lassalle et al., 2004). Pour tester cette hypothèse, nous avons ajouté de la vératridine dans nos cultures en

microgouttes. L'administration de vétratriidine a entraîné une augmentation de la survie des neurones dopaminergiques totaux et isolés, sans affecter le nombre de neurones dopaminergiques isolés exprimant VGLUT2; ce qui a mené à la diminution de la proportion des neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2. Ces résultats suggèrent que l'activité fournie par la libération de glutamate sur les neurones dopaminergiques au niveau de leurs autapses leur confère effectivement une capacité de survie supérieure par rapport aux autres neurones dopaminergiques.

Toujours dans l'optique de tester l'hypothèse que l'expression de VGLUT2 confère une survie préférentielle, nous avons également regardé l'effet de l'administration de MPTP sur la survie des neurones dopaminergiques dans des cultures standards de souris TH-GFP. Une semaine après avoir ajouté une seule dose de MPTP nous avons remarqué que l'immunoréactivité de la tyrosine hydroxylase était fortement et significativement diminuée alors que l'immunomarquage de VGLUT2 n'était pas changé de façon significative. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une perte préférentielle des neurones dopaminergiques qui n'expriment pas VGLUT2. Cette observation serait logique si les neurones TH+/VGLUT2+ survivants sont ceux qui expriment le moins fortement les DATs. Toutefois, il faut noter la variabilité importante de nos résultats dans ces expériences et la tendance à une baisse de l'immunoréactivité de VGLUT2 en parallèle avec celle de la TH. Dans ce contexte, la portée de notre conclusion d'une perte préférentielle des neurones n'exprimant pas VGLUT2 reste incertaine.

4 : Perspectives et Conclusion

Nos travaux ont montré qu'une sous-population des neurones dopaminergiques *in vitro* et *in vivo* a la capacité d'exprimer la protéine et l'ARNm d'un des 3 transporteurs vésiculaires du glutamate, le VGLUT2. L'ensemble de nos résultats confirme que les neurones dopaminergiques possèdent la machinerie nécessaire pour libérer du glutamate, et que sous certaines conditions, ils peuvent modifier leur répertoire de neurotransmetteurs. Après les démonstrations de l'expression de VGLUT2 par certains neurones noradrénergiques (Stornetta et al., 2002) et de VGLUT3 par les neurones sérotoninergiques (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002), nos données montrent bien que les neurones monoaminergiques ont la capacité d'utiliser 2 types de signalisation dans le système nerveux central. Toutefois, le rôle de la libération du glutamate par les neurones dopaminergiques reste à être déterminé. En se basant sur nos résultats, nous avons discuté deux hypothèses qui nous semblent les plus probables, soit un rôle dans la formation des synapses, soit un rôle « protecteur » dans des conditions traumatiques. D'autres expériences devront être menées pour vérifier ces hypothèses.

Au cours de la période embryonnaire, il semble que certains signaux développementaux contrôlent l'expression de VGLUT2 et qu'une inhibition progressive débute aux alentours du 17^{ème} jour de gestation chez les rats. Il serait intéressant de regarder les niveaux d'expression du gène homeobox *Tlx3* dans les neurones dopaminergiques au cours de la période embryonnaire. Le gène *Tlx3* joue un rôle dans la différenciation des cellules somatiques en contrôlant l'expression de plusieurs marqueurs glutamatergiques dont VGLUT2 (Cheng et al., 2004; 2005; Kondo et al., 2008).

Les facteurs trophiques associés au développement des neurones dopaminergiques pourraient aussi contribuer à la régulation de l'expression du phénotype glutamatergique. Dans les cellules granulaires de l'hippocampe, le BDNF permet de réactiver le phénotype GABAergique embryonnaire de ces neurones (Gomez-Lira et al., 2005). L'application de GDNF sur des neurones dopaminergiques en culture augmente la capacité de ces neurones

à libérer du glutamate (Bourque & Trudeau, 2000). Le GDNF est connu pour intervenir dans la différenciation des neurones dopaminergiques au cours du développement et promouvoir la survie de ces cellules dans des conditions traumatiques (Bowenkamp et al., 1995; Burke et al., 1998; Choi-Lundberg et al., 1997). Il serait intéressant de tester les effets du GDNF sur l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques dans nos cultures.

En ce qui concerne l'impact que pourrait exercer l'expression de VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques au niveau de leur survie, une analyse plus étendue devrait être effectuée. Il faudrait regarder si cette survie préférentielle est conférée par une expression plus faible de DATs, ainsi que les niveaux de VMAT2. Des expériences de surexpression de VGLUT2 pourraient être envisagées pour étudier si la libération de glutamate exerce effectivement un rôle protecteur dans les neurones dopaminergiques. Dans un autre ordre d'idée, l'inhibition de l'expression de VGLUT2 à l'aide d'ARN interférant pourrait aussi fournir un élément de réponse à cette question.

Plusieurs études ont montré que les niveaux de VGLUTs pouvaient varier en fonction de l'activité des certaines populations neuronales ou alors suite à la perturbation de leur homéostasie. L'administration d'antidépresseurs tels que la fluoxétine et surtout la désipramine entraîne des augmentation d'expression de VGLUT1 dans le cortex et l'hippocampe de souris et de rats adultes (Moutsimilli et al., 2005; Tordera et al., 2005), de VGLUT2 dans le noyau thalamique ventropostéromédial (Tordera et al., 2005) et de VGLUT3 dans le raphé dorsal (Tordera et al., 2005). L'administration dans des souris adultes d'halopéridol et de clozapine, des antipsychotiques respectivement typique et atypique utilisés dans le traitement de la schizophrénie, augmente les niveaux d'ARNm de VGLUT2 dans plusieurs noyaux thalamiques et de la protéine dans le striatum (Moutsimilli et al., 2008). L'injection unilatérale de 6-OHDA intrastriatale diminue l'immunoréactivité de VGLUT2 dans le striatum de rats mais augmente l'expression des ARNm dans le noyau parafasciculaire du thalamus (Aymerich et al., 2006). Ces résultats amènent à penser que les VGLUTs pourraient servir d'indicateurs d'activité comme d'autres gènes à expression

rapide tels que *Arc* et *c-fos* (Pei et al., 2003), BDNF (Coppell et al., 2003), et CREB (Thome et al., 2000), et jouer un rôle dans l'adaptation dans des conditions pathophysiologiques. Une étude menée sur des cerveaux humains de la maladie de Parkinson a montré des augmentations des marquages VGLUT1 et -2 au niveau du striatum dorsal (Kashani et al., 2007). Les augmentations de VGLUT1 et -2 seraient reliées aux projections corticales et thalamiques. Par contre l'expression de ces protéines au niveau du noyau accumbens de cerveau parkinsonien n'a pas été étudiée. Il serait intéressant de regarder si, dans le cerveau des personnes souffrant de la maladie de Parkinson, les niveaux d'expression de VGLUT2 sont modifiés dans les neurones dopaminergiques survivants comme le laissent supposer les résultats de notre étude de lésion.

En conclusion, l'expression d'un phénotype glutamatergique par les neurones dopaminergiques présente un attrait considérable pour étudier l'adaptation de ces neurones dans différentes conditions pathophysiologiques telles que la schizophrénie, la maladie de Parkinson, la dépendance aux drogues et la simple prise de médicament. Nos études ont ouvert la voie à de nombreuses questions, telles que les signaux impliqués dans la régulation de ce phénotype. Le modèle de culture que nous utilisons représente un outil formidable pour répondre à ces questions, et peut-être comprendre quel est l'intérêt des neurones monoaminergiques de modifier leur signalisation en réponse à des perturbations de leur environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I. and Takeda, J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* **74**, 2622-5.
- Aktas, O., Ullrich, O., Infante-Duarte, C., Nitsch, R. and Zipp, F. (2007) Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurol* **64**, 185-9.
- Anden, N.E., Carlsson, A., Dahlstroem, A., Fuxe, K., Hillarp, N.A. and Larsson, K. (1964) Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci* **3**, 523-30.
- Andreasen, N.C., O'Leary, D.S., Cizadlo, T., Arndt, S., Rezai, K., Ponto, L.L., Watkins, G.L. and Hichwa, R.D. (1996) Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9985-90.
- Armentero, M.T., Fancellu, R., Nappi, G., Bramanti, P. and Blandini, F. (2006) Prolonged blockade of NMDA or mGluR5 glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration while inducing selective metabolic changes in the basal ganglia circuitry in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **22**, 1-9.
- Arundine, M. and Tymianski, M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**, 325-37.

- Aymerich, M.S., Barroso-Chinea, P., Perez-Manso, M., Munoz-Patino, A.M., Moreno-Igoa, M., Gonzalez-Hernandez, T. and Lanciego, J.L. (2006) Consequences of unilateral nigrostriatal denervation on the thalamostriatal pathway in rats. *Eur J Neurosci* **23**, 2099-108.
- Balazs, R. (2006) Trophic effect of glutamate. *Curr Top Med Chem* **6**, 961-8.
- Baskys, A., Bayazitov, I., Fang, L., Blaabjerg, M., Poulsen, F.R. and Zimmer, J. (2005) Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* **49 Suppl 1**, 146-56.
- Batten, T.F., Gamboa-Esteves, F.O. and Saha, S. (2002) Evidence for peptide co-transmission in retrograde- and anterograde-labelled central nucleus of amygdala neurones projecting to NTS. *Auton Neurosci* **98**, 28-32.
- Bayer, S.A., Triarhou, L.C., Thomas, J.D. and Ghetti, B. (1994) Correlated quantitative studies of the neostriatum, nucleus accumbens, substantia nigra, and ventral tegmental area in normal and weaver mutant mice. *J Neurosci* **14**, 6901-10.
- Beal, M.F. (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* **2**, 325-34.
- Beaudet, A. and Descarries, L. (1978) The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* **3**, 851-60.
- Behar, T.N., Scott, C.A., Greene, C.L., Wen, X., Smith, S.V., Maric, D., Liu, Q.Y., Colton, C.A. and Barker, J.L. (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* **19**, 4449-61.
- Bellocchio, E.E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V.M. and Edwards, R.H. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* **18**, 8648-59.

- Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Freneau, R.T. Jr and Edwards, R.H. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**, 957-60.
- Benitez-Diaz, P., Miranda-Contreras, L., Mendoza-Briceno, R.V., Pena-Contreras, Z. and Palacios-Pru, E. (2003) Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. *Dev Neurosci* **25**, 366-74.
- Benoit-Marand, M., Jaber, M. and Gonon, F. (2000) Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur J Neurosci* **12**, 2985-92.
- Bertler, A. and Rosengren, E. (1959) Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* **15**, 10-1.
- Bérubé-Carrière, N., Riad, M., Dal Bo, G., Lévesque, D., Trudeau, L.-E., and Descarries, L. (2008) Regression of the dual dopamine-glutamate phenotype of mesencephalic neurons in mature brain, *Program No. 827.6. 2008. Abstract Viewer/Itinerary Planner*, Society for Neuroscience, Washington, DC (2008) Online.
- Betarbet, R., Sherer, T.B. and Greenamyre, J.T. (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* **24**, 308-18.
- Bezard, E., Gross, C.E., Fournier, M.C., Dovero, S., Bloch, B. and Jaber, M. (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol* **155**, 268-73.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E. and Volterra, A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* **7**, 613-20.

- Bjorklund, A. and Lindvall, O. (1984). Dopamine-containing systems in the CNS. In A. Bjorklund and T. Hokfelt (Eds.). Handbook of Chemical Neuroanatomy. Classical Neurotransmitters in the CNS. Vol. 2, Part 1, Elsevier, Amsterdam, pp. 55-112.
- Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Vyas, S., Michel, P.P., Javoy-Agid, F., Uhl, G. and Agid, Y. (1994) Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res* **22**, 29-38.
- Bliss, T.V. and Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**, 331-56.
- Bogerts, B., Hantsch, J. and Herzer, M. (1983) A morphometric study of the dopamine-containing cell groups in the mesencephalon of normals, Parkinson patients, and schizophrenics. *Biol Psychiatry* **18**, 951-69.
- Boulland, J.L., Qureshi, T., Seal, R.P., Rafiki, A., Gundersen, V., Bergersen, L.H., Fremeau, R.T. Jr, Edwards, R.H., Storm-Mathisen, J. and Chaudhry, F.A. (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol* **480**, 264-80.
- Bourque, M.J. and Trudeau, L.E. (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* **12**, 3172-80.
- Bowenkamp, K.E., Hoffman, A.F., Gerhardt, G.A., Henry, M.A., Biddle, P.T., Hoffer, B.J. and Granholm, A.C. (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* **355**, 479-89.

- Brazel, C.Y., Nunez, J.L., Yang, Z. and Levison, S.W. (2005) Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience* **131**, 55-65.
- Breese, G.R., Knapp, D.J., Criswell, H.E., Moy, S.S., Papadeas, S.T. and Blake, B.L. (2005) The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Res Brain Res Rev* **48**, 57-73.
- Breese, G.R. and Traylor, T.D. (1972) Developmental characteristics of brain catecholamines and tyrosine hydroxylase in the rat: effects of 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol* **44**, 210-22.
- Brenneman, D.E., Forsythe, I.D., Nicol, T. and Nelson, P.G. (1990) N-methyl-D-aspartate receptors influence neuronal survival in developing spinal cord cultures. *Brain Res Dev Brain Res* **51**, 63-8.
- Brewer, G.J. and Cotman, C.W. (1989) NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* **99**, 268-73.
- Brodski, C., Schaubmar, A. and Dechant, G. (2002) Opposing functions of GDNF and NGF in the development of cholinergic and noradrenergic sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* **19**, 528-38.
- Brownstein, M.J., Saavedra, J.M., Axelrod, J., Zeman, G.H. and Carpenter, D.O. (1974) Coexistence of several putative neurotransmitters in single identified neurons of Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4662-5.
- Buchsbaum, M.S., Yang, S., Hazlett, E., Siegel, B.V. Jr, Germans, M., Haznedar, M., O'Flaithbheartaigh, S., Wei, T., Silverman, J. and Siever, L.J. (1997) Ventricular volume and asymmetry in schizotypal personality disorder and schizophrenia assessed with magnetic resonance imaging. *Schizophr Res* **27**, 45-53.

- Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Grandy, D.K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A. and Civelli, O. (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* **336**, 783-7.
- Bureau, I. and Mulle, C. (1998) Potentiation of GABAergic synaptic transmission by AMPA receptors in mouse cerebellar stellate cells: changes during development. *J Physiol* **509 (Pt 3)**, 817-31.
- Burke, R.E., Antonelli, M. and Sulzer, D. (1998) Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture. *J Neurochem* **71**, 517-25.
- Burnstock, G. (1990) Changes in expression of autonomic nerves in aging and disease. *J Auton Nerv Syst* **30 Suppl**, S25-34.
- Burnstock, G. (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* **1**, 239-48.
- Caille, I., Dumartin, B. and Bloch, B. (1996) Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res* **730**, 17-31.
- Cameron, H.A., McEwen, B.S. and Gould, E. (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* **15**, 4687-92.
- Carr, D.B. and Sesack, S.R. (1996) Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol* **369**, 1-15.
- Cenci, M.A. (2002) Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Amino Acids* **23**, 105-9.

- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H.B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R.E., Battaglia, G., German, D.C., Castillo, P.E. and Sudhof, T.C. (2004) Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14966-71.
- Charvin, D., Vanhoutte, P., Pages, C., Borrelli, E. and Caboche, J. (2005) Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12218-23.
- Cheng, L., Arata, A., Mizuguchi, R., Qian, Y., Karunaratne, A., Gray, P.A., Arata, S., Shirasawa, S., Bouchard, M., Luo, P., Chen, C.L., Busslinger, M., Goulding, M., Onimaru, H. and Ma, Q. (2004) Tlx3 and Tlx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nat Neurosci* **7**, 510-7.
- Cheng, L., Samad, O.A., Xu, Y., Mizuguchi, R., Luo, P., Shirasawa, S., Goulding, M. and Ma, Q. (2005) Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci* **8**, 1510-5.
- Choi-Lundberg, D.L., Lin, Q., Chang, Y.N., Chiang, Y.L., Hay, C.M., Mohajeri, H., Davidson, B.L. and Bohn, M.C. (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* **275**, 838-41.
- Chuhma, N., Zhang, H., Masson, J., Zhuang, X., Sulzer, D., Hen, R. and Rayport, S. (2004) Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *J Neurosci* **24**, 972-81.
- Ciliax, B.J., Drash, G.W., Staley, J.K., Haber, S., Mobley, C.J., Miller, G.W., Mufson, E.J., Mash, D.C. and Levey, A.I. (1999) Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. *J Comp Neurol* **409**, 38-56.

- Ciliax, B.J., Heilman, C., Demchyshyn, L.L., Pristupa, Z.B., Ince, E., Hersch, S.M., Niznik, H.B. and Levey, A.I. (1995) The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci* **15**, 1714-23.
- Collier, D.A. and Li, T. (2003) The genetics of schizophrenia: glutamate not dopamine? *Eur J Pharmacol* **480**, 177-84.
- Conn, P.J. and Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 205-37.
- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Harper, J.D., Williamson, R.E. and Lansbury, P.T. Jr (2000) Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. *Ann N Y Acad Sci* **920**, 42-5.
- Coppell, A.L., Pei, Q. and Zetterstrom, T.S. (2003) Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology* **44**, 903-10.
- Cottrell, G.A. (1976) Proceedings: Does the giant cerebral neurone of Helix release two transmitters: ACh and serotonin? *J Physiol* **259**, 44P-45P.
- Cragg, S.J., Nicholson, C., Kume-Kick, J., Tao, L. and Rice, M.E. (2001) Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *J Neurophysiol* **85**, 1761-71.
- Creese, I., Sibley, D.R., Hamblin, M.W. and Leff, S.E. (1983) The classification of dopamine receptors: relationship to radioligand binding. *Annu Rev Neurosci* **6**, 43-71.
- Curtis, D.R., Phillis, J.W. and Watkins, J.C. (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* **183**, 611-2.

- Dahlstrom, A. and Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**, 398-9.
- Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D.B., Bach, A., Shivers, B.D. and Seeburg, P.H. (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* **8**, 4025-34.
- 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. and Surmeier, D.J. (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* **9**, 251-9.
- de Groot, J.F., Piao, Y., Lu, L., Fuller, G.N. and Yung, W.K. (2008) Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation. *J Neurooncol* **88**, 121-33.
- Dearry, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T. Jr, Bates, M.D. and Caron, M.G. (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* **347**, 72-6.
- Descarries, L., Beaudet, A. and Watkins, K.C. (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* **100**, 563-88.
- Descarries, L., Berthelet, F., Garcia, S. and Beaudet, A. (1986) Dopaminergic projection from nucleus raphe dorsalis to neostriatum in the rat. *J Comp Neurol* **249**, 511-20, 484-5.
- Descarries, L., Berube-Carriere, N., Riad, M., Bo, G.D., Mendez, J.A. and Trudeau, L.E. (2008) Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev* **58**, 290-302.

- Descarries, L., Bosler, O., Berthelet, F. and Des Rosiers, M.H. (1980) Dopaminergic nerve endings visualised by high-resolution autoradiography in adult rat neostriatum. *Nature* **284**, 620-2.
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Bosler, O. and Doucet, G. (1996) Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol* **375**, 167-86.
- Descarries, L., Watkins, K.C. and Lapierre, Y. (1977) Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Res* **133**, 197-222.
- Di Giorgi Gerevini, V.D., Caruso, A., Cappuccio, I., Ricci Vitiani, L., Romeo, S., Della Rocca, C., Gradini, R., Melchiorri, D. and Nicoletti, F. (2004) The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* **150**, 17-22.
- Diaz-Rios, M., Oyola, E. and Miller, M.W. (2002) Colocalization of gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivity and catecholamines in the feeding network of *Aplysia californica*. *J Comp Neurol* **445**, 29-46.
- Dumartin, B., Caille, I., Gonon, F. and Bloch, B. (1998) Internalization of D1 dopamine receptor in striatal neurons in vivo as evidence of activation by dopamine agonists. *J Neurosci* **18**, 1650-61.
- Eastwood, S.L. and Harrison, P.J. (2005) Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophr Res* **73**, 159-72.

- Ellis, J.L. and Burnstock, G. (1990) Modulation by prostaglandin E₂ of ATP and noradrenaline co-transmission in the guinea-pig vas deferens. *J Auton Pharmacol* **10**, 363-72.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. and Gage, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-7.
- Fallon, J.H. and Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* **180**, 545-80.
- Fasano, C., Poirier, A., DesGroseillers, L. and Trudeau, L.E. (2008) Chronic activation of the D₂ dopamine autoreceptor inhibits synaptogenesis in mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* **28**, 1480-90.
- Fasano, C., Thibault, D. and Trudeau, L.E. (2008) Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 3**, Unit 3.21
- Fatemi, S.H., Earle, J.A., Strydom, J.M., Lee, S. and Sedgewick, J. (2001) Altered levels of the synaptosomal associated protein SNAP-25 in hippocampus of subjects with mood disorders and schizophrenia. *Neuroreport* **12**, 3257-62.
- Faull, R.L. and Laverly, R. (1969) Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp Neurol* **23**, 332-40.
- Felder, C.C., Jose, P.A. and Axelrod, J. (1989) The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 171-5.

- Felder, C.C., Jose, P.A. and Axelrod, J. (1989) The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 171-5.
- Feldman, D.J., Frank, R.A., Kehne, J.H., Flannery, R., Brown, D., Soni, S., Byrd, G. and Shah, S. (1997) Mixed D2/5-HT2 antagonism differentially affects apomorphine- and amphetamine-induced stereotyped behavior. *Pharmacol Biochem Behav* **58**, 565-72.
- Fernandes Pereira, S.P. and Giestal de Araujo, E. (2000) Chronic depolarization induced by veratridine increases the survival of rat retinal ganglion cells 'in vitro'. *Int J Dev Neurosci* **18**, 773-780.
- Fernandes Xavier, F.G., Doucet, G., Geffard, M. and Descarries, L. (1994) Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* **59**, 77-87.
- Finkelstein, D.I., Stanic, D., Parish, C.L., Tomas, D., Dickson, K. and Horne, M.K. (2000) Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* **97**, 99-112.
- Fishell, G. and van der Kooy, D. (1989) Pattern formation in the striatum: developmental changes in the distribution of striatonigral projections. *Brain Res Dev Brain Res* **45**, 239-55.
- Fletcher, P.C., McKenna, P.J., Frith, C.D., Grasby, P.M., Friston, K.J. and Dolan, R.J. (1998) Brain activations in schizophrenia during a graded memory task studied with functional neuroimaging. *Arch Gen Psychiatry* **55**, 1001-8.

- Freneau, R.T. Jr, Burman, J., Qureshi, T., Tran, C.H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Reimer, R.J., Chaudhry, F.A. and Edwards, R.H. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14488-93.
- Freneau, R.T. Jr, Duncan, G.E., Fornaretto, M.G., Dearth, A., Gingrich, J.A., Breese, G.R. and Caron, M.G. (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3772-6.
- Freneau, R.T. Jr, Troyer, M.D., Pahner, I., Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J. and Edwards, R.H. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* **31**, 247-60.
- Freund, T.F., Powell, J.F. and Smith, A.D. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* **13**, 1189-215.
- Fujii, S., Kato, H. and Kuroda, Y. (2002) Cooperativity between extracellular adenosine 5'-triphosphate and activation of N-methyl-D-aspartate receptors in long-term potentiation induction in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience* **113**, 617-28.
- Fujiyama, F., Furuta, T. and Kaneko, T. (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* **435**, 379-87.

- Fuxe, K., Ferre, S., Zoli, M. and Agnati, L.F. (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev* **26**, 258-73.
- Gainetdinov, R.R., Fumagalli, F., Wang, Y.M., Jones, S.R., Levey, A.I., Miller, G.W. and Caron, M.G. (1998) Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J Neurochem* **70**, 1973-8.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* **27**, 107-44.
- Garris, P.A. and Wightman, R.M. (1994) Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci* **14**, 442-50.
- Gasbarri, A., Packard, M.G., Campana, E. and Pacitti, C. (1994) Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Res Bull* **33**, 445-52.
- Gasbarri, A., Verney, C., Innocenzi, R., Campana, E. and Pacitti, C. (1994) Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Res* **668**, 71-9.
- Gasnier, B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* **82**, 327-37.
- Gates, M.A., Torres, E.M., White, A., Fricker-Gates, R.A. and Dunnett, S.B. (2006) Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *Eur J Neurosci* **23**, 1384-90.

- Gerfen, C.R., Herkenham, M. and Thibault, J. (1987) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* **7**, 3915-34.
- Gerfen, C.R., Herkenham, M. and Thibault, J. (1987) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* **7**, 3915-34.
- German, D.C. and Manaye, K.F. (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol* **331**, 297-309.
- Ghoumari, A.M., Piochon, C., Tomkiewicz, C., Eychenne, B., Levenes, C., Dusart, I., Schumacher, M. and Baulieu, E.E. (2006) Neuroprotective effect of mifepristone involves neuron depolarization. *FASEB J* **20**, 1377-86.
- Gibb, W.R. and Lees, A.J. (1991) Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**, 388-96.
- Gibb, W.R. and Lees, A.J. (1991) Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**, 388-96.
- 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**, 923-6.

- Goldberg, M.S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T.A., Kitada, T., Costa, C., Tong, Y., Martella, G., Tscherter, A., Martins, A., Bernardi, G., Roth, B.L., Pothos, E.N., Calabresi, P. and Shen, J. (2005) Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* **45**, 489-96.
- Goldman, J.E., Yen, S.H., Chiu, F.C. and Peress, N.S. (1983) Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* **221**, 1082-4.
- Goldman-Rakic, P.S., Selemon, L.D. and Schwartz, M.L. (1984) Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience* **12**, 719-43.
- Golshani, P., Warren, R.A. and Jones, E.G. (1998) Progression of change in NMDA, non-NMDA, and metabotropic glutamate receptor function at the developing corticothalamic synapse. *J Neurophysiol* **80**, 143-54.
- Golshani, P., Warren, R.A. and Jones, E.G. (1998) Progression of change in NMDA, non-NMDA, and metabotropic glutamate receptor function at the developing corticothalamic synapse. *J Neurophysiol* **80**, 143-54.
- Gomez-Lira, G., Lamas, M., Romo-Parra, H. and Gutierrez, R. (2005) Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci* **25**, 6939-46.
- Gonzalez-Hernandez, T., Barroso-Chinea, P., Acevedo, A., Salido, E. and Rodriguez, M. (2001) Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons. *Eur J Neurosci* **13**, 57-67.

- Gonzalez-Hernandez, T., Barroso-Chinea, P., De La Cruz Muros, I., Del Mar Perez-Delgado, M. and Rodriguez, M. (2004) Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* **479**, 198-215.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G. and Fuchs, E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3168-71.
- Gourion, D., Goldberger, C., Olie, J.P., Loo, H. and Krebs, M.O. (2004) Neurological and morphological anomalies and the genetic liability to schizophrenia: a composite phenotype. *Schizophr Res* **67**, 23-31.
- Grandy, D.K., Marchionni, M.A., Makam, H., Stofko, R.E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J.B., Burke-Howie, K.J., Bunzow, J.R., Server, A.C. and et, a.l. (1989) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9762-6.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* **22**, 5442-51.
- Gras, C., Amilhon, B., Lopicard, E.M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., Dumas, S., Tzavara, E.T., Wade, M.R., Nomikos, G.G., Hanoun, N., Saurini, F., Kemel, M.L., Gasnier, B., Giros, B., El Mestikawy, S. (2008). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nature Neuros.* **3**, 292-300.
- Graybiel, A.M. (1978) Organization of the nigrotectal connection: an experimental tracer study in the cat. *Brain Res* **143**, 339-48.

- Graybiel, A.M., Hirsch, E.C. and Agid, Y.A. (1987) Differences in tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity characterize the mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix at maturity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 303-7.
- Gutierrez, R. (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* **87**, 2562-70.
- Gutierrez, R. (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* **84**, 3088-90.
- Hallberg, O.E., Bogen, I.L., Reistad, T., Haug, K.H., Wright, M.S., Fonnum, F. and Walaas, S.I. (2006) Differential development of vesicular glutamate transporters in brain: an in vitro study of cerebellar granule cells. *Neurochem Int* **48**, 579-85.
- Harkany, T., Holmgren, C., Hartig, W., Qureshi, T., Chaudhry, F.A., Storm-Mathisen, J., Dobszay, M.B., Berghuis, P., Schulte, G., Sousa, K.M., Fremeau, R.T. Jr, Edwards, R.H., Mackie, K., Ernfors, P. and Zilberter, Y. (2004) Endocannabinoid-independent retrograde signaling at inhibitory synapses in layer 2/3 of neocortex: involvement of vesicular glutamate transporter 3. *J Neurosci* **24**, 4978-88.
- Hassani, O.K., Francois, C., Yelnik, J. and Feger, J. (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* **749**, 88-94.
- Hasue, R.H. and Shammah-Lagnado, S.J. (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* **454**, 15-33.
- Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L. and Rakic, P. (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* **20**, 5764-74.

- Hegarty, J.L., Kay, A.R. and Green, S.H. (1997) Trophic support of cultured spiral ganglion neurons by depolarization exceeds and is additive with that by neurotrophins or cAMP and requires elevation of. *J Neurosci* **17**, 1959-70.
Notes: i within a set range
- Hersch, S.M., Ciliax, B.J., Gutekunst, C.A., Rees, H.D., Heilman, C.J., Yung, K.K., Bolam, J.P., Ince, E., Yi, H. and Levey, A.I. (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* **15**, 5222-37.
- Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* **21**, RC181
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P. and El Mestikawy, S. (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* **123**, 983-1002.
- Hiramoto, T., Kanda, Y., Satoh, Y., Takishima, K. and Watanabe, Y. (2007) Dopamine D2 receptor stimulation promotes the proliferation of neural progenitor cells in adult mouse hippocampus. *Neuroreport* **18**, 659-64.
- Hirsch, E.C., Faucheux, B., Damier, P., Mouatt-Prigent, A. and Agid, Y. (1997) Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **50**, 79-88.
- Hirsch, E.C., Mouatt, A., Faucheux, B., Bonnet, A.M., Javoy-Agid, F., Graybiel, A.M. and Agid, Y. (1992) Dopamine, tremor, and Parkinson's disease. *Lancet* **340**, 125-6.

- Hisano, S., Hoshi, K., Ikeda, Y., Maruyama, D., Kanemoto, M., Ichijo, H., Kojima, I., Takeda, J. and Nogami, H. (2000) Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res* **83**, 34-43.
- Hokfelt, T., Blacker, D., Broberger, C., Herrera-Marschitz, M., Snyder, G., Fisone, G., Cortes, R., Morino, P., You, Z.B. and Ogren, S.O. (2002) Some aspects on the anatomy and function of central cholecystokinin systems. *Pharmacol Toxicol* **91**, 382-6.
- Hokfelt, T., Everitt, B.J., Theodorsson-Norheim, E. and Goldstein, M. (1984) Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J Comp Neurol* **222**, 543-59.
- Hokfelt, T., Johansson, O. and Goldstein, M. (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science* **225**, 1326-34.
- Hokfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R. and Nilsson, G. (1977) Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3081-5.
- Hokfelt, T., Skirboll, L., Rehfeld, J.F., Goldstein, M., Markey, K. and Dann, O. (1980) A subpopulation of mesencephalic dopamine neurons projecting to limbic areas contains a cholecystokinin-like peptide: evidence from immunohistochemistry combined with retrograde tracing. *Neuroscience* **5**, 2093-124.
- Honore, T., Drejer, J., Nielsen, M., Watkins, J.C. and Olverman, H.J. (1987) Molecular target size of NMDA antagonist binding sites. *Eur J Pharmacol* **136**, 137-8.

- Hornykiewicz, O. (2006) The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl* 9-15.
- Hur, E.E. and Zaborszky, L. (2005) Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **483**, 351-73.
- Ibarretxe, G., Perrais, D., Jaskolski, F., Vimeney, A. and Mulle, C. (2007) Fast regulation of axonal growth cone motility by electrical activity. *J Neurosci* **27**, 7684-95.
- Ingham, C.A., Hood, S.H., Taggart, P. and Arbuthnott, G.W. (1998) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* **18**, 4732-43.
- Iwakura, Y., Nawa, H., Sora, I. and Chao, M.V. (2008) Dopamine D1 receptor-induced signaling through TrkB receptors in striatal neurons. *J Biol Chem* **283**, 15799-806.
- James, A.C., James, S., Smith, D.M. and Javaloyes, A. (2004) Cerebellar, prefrontal cortex, and thalamic volumes over two time points in adolescent-onset schizophrenia. *Am J Psychiatry* **161**, 1023-9.
- Jo, Y.H. and Role, L.W. (2002) Cholinergic modulation of purinergic and GABAergic co-transmission at in vitro hypothalamic synapses. *J Neurophysiol* **88**, 2501-8.
- Jo, Y.H. and Schlichter, R. (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* **2**, 241-5.
- Johnson, M.D. (1994) Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture. *Neuroscience* **63**, 775-87.

- Jomphe, C., Bourque, M.J., Fortin, G.D., St-Gelais, F., Okano, H., Kobayashi, K. and 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.
- Jonas, P., Bischofberger, J. and Sandkuhler, J. (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* **281**, 419-24.
- Jordan, B.D. (2000) Chronic traumatic brain injury associated with boxing. *Semin Neurol* **20**, 179-85.
- Joyce, J.N., Frohna, P.A. and Neal-Beliveau, B.S. (1996) Functional and molecular differentiation of the dopamine system induced by neonatal denervation. *Neurosci Biobehav Rev* **20**, 453-86.
- Joyce, M.P. and Rayport, S. (2000) Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience* **99**, 445-56.
- Kalivas, P.W. and Duffy, P. (1991) A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *J Neurochem* **56**, 961-7.
- Kalsbeek, A., Voorn, P., Buijs, R.M., Pool, C.W. and Uylings, H.B. (1988) Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol* **269**, 58-72.
- Kaneko, T., Akiyama, H., Nagatsu, I. and Mizuno, N. (1990) Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res* **507**, 151-4.
- Kaneko, T. and Fujiyama, F. (2002) Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res* **42**, 243-50.

- Kaneko, T., Fujiyama, F. and Hioki, H. (2002) Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol* **444**, 39-62.
- Kaneko, T. and Mizuno, N. (1994) Glutamate-synthesizing enzymes in GABAergic neurons of the neocortex: a double immunofluorescence study in the rat. *Neuroscience* **61**, 839-49.
- Kang, J.M., Park, H.J., Choi, Y.G., Choe, I.H., Park, J.H., Kim, Y.S. and Lim, S. (2007) Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. *Brain Res* **1131**, 211-9.
- Kapur, S. and Mamo, D. (2003) Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 1081-90.
- Kashani, A., Betancur, C., Giros, B., Hirsch, E. and El Mestikawy, S. (2007) Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiol Aging* **28**, 568-78.
- Kashani, A., Betancur, C., Giros, B., Hirsch, E. and El Mestikawy, S. (2007) Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiol Aging* **28**, 568-78.
- Kawano, M., Kawasaki, A., Sakata-Haga, H., Fukui, Y., Kawano, H., Nogami, H. and Hisano, S. (2006) Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* **498**, 581-92.
- Kebabian, J.W. and Calne, D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**, 93-6.

- Kennedy, M.B. (1999) On beyond LTP. Long-term potentiation. *Learn Mem* **6**, 417-21.
- King, A.E., Dickson, T.C., Blizzard, C.A., Foster, S.S., Chung, R.S., West, A.K., Chuah, M.I. and Vickers, J.C. (2007) Excitotoxicity mediated by non-NMDA receptors causes distal axonopathy in long-term cultured spinal motor neurons. *Eur J Neurosci* **26**, 2151-9.
- Kirov, G., Murphy, K.C., Arranz, M.J., Jones, I., McCandles, F., Kunugi, H., Murray, R.M., McGuffin, P., Collier, D.A., Owen, M.J. and Craddock, N. (1998) Low activity allele of catechol-O-methyltransferase gene associated with rapid cycling bipolar disorder. *Mol Psychiatry* **3**, 342-5.
- Kirvell, S.L., Esiri, M. and Francis, P.T. (2006) Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **98**, 939-50.
- Kondo, T., Sheets, P.L., Zopf, D.A., Aloor, H.L., Cummins, T.R., Chan, R.J. and Hashino, E. (2008) Tlx3 exerts context-dependent transcriptional regulation and promotes neuronal differentiation from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5780-5.
- Koob, G.F. and Le Moal, M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**, 97-129.
- Korotkova, T.M., Ponomarenko, A.A., Brown, R.E. and Haas, H.L. (2004) Functional diversity of ventral midbrain dopamine and GABAergic neurons. *Mol Neurobiol* **29**, 243-59.
- Koyama, R., Yamada, M.K., Nishiyama, N., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. (2002) Group II metabotropic glutamate receptor activation is required for normal hippocampal mossy fibre development in the rat. *J Physiol* **539**, 157-62.

- Kuczenski, R., Segal, D.S. and Aizenstein, M.L. (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *J Neurosci* **11**, 2703-12.
- Labrakakis, C., Tong, C.K., Weissman, T., Torsney, C. and MacDermott, A.B. (2003) Localization and function of ATP and GABAA receptors expressed by nociceptors and other postnatal sensory neurons in rat. *J Physiol* **549**, 131-42.
- Landis, S.C. (2002) Quick-change artist: from excitatory to inhibitory synapse in minutes. *Nat Neurosci* **5**, 503-4.
- Langston, J.W. and Ballard, P.A. Jr (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* **309**, 310
- Lankford, K., De Mello, F.G. and Klein, W.L. (1987) A transient embryonic dopamine receptor inhibits growth cone motility and neurite outgrowth in a subset of avian retina neurons. *Neurosci Lett* **75**, 169-74.
- Lapish, C.C., Seamans, J.K. and Chandler, L.J. (2006) Glutamate-dopamine cotransmission and reward processing in addiction. *Alcohol Clin Exp Res* **30**, 1451-65.
- Laruelle, M., Kegeles, L.S. and Abi-Dargham, A. (2003) Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Ann N Y Acad Sci* **1003**, 138-58.
- Lauri, S.E., Vesikansa, A., Segerstrale, M., Collingridge, G.L., Isaac, J.T. and Taira, T. (2006) Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron* **50**, 415-29.

- Lavin, A., Nogueira, L., Lapish, C.C., Wightman, R.M., Phillips, P.E. and Seamans, J.K. (2005) Mesocortical dopamine neurons operate in distinct temporal domains using multimodal signaling. *J Neurosci* **25**, 5013-23.
- Lavoie, B. and Parent, A. (1991) Dopaminergic neurons expressing calbindin in normal and parkinsonian monkeys. *Neuroreport* **2**, 601-4.
- Lavoie, B., Smith, Y. and Parent, A. (1989) Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* **289**, 36-52.
- Le Moine, C., Normand, E. and Bloch, B. (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4205-9.
- Legault, M., Rompre, P.P. and Wise, R.A. (2000) Chemical stimulation of the ventral hippocampus elevates nucleus accumbens dopamine by activating dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *J Neurosci* **20**, 1635-42.
- Levey, A.I., Hersch, S.M., Rye, D.B., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., Kitt, C.A., Price, D.L., Maggio, R., Brann, M.R., Ciliax, B.J. and et, a.l. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8861-5.
- Lewis, S.J., Zammit, S., Gunnell, D. and Smith, G.D. (2005) A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **135B**, 2-4.

- Leysen, J.E., Gommeren, W., Mertens, J., Luyten, W.H., Pauwels, P.J., Ewert, M. and Seeburg, P. (1993) Comparison of in vitro binding properties of a series of dopamine antagonists and agonists for cloned human dopamine D2S and D2L receptors and for D2 receptors in rat striatal and mesolimbic tissues, using. *Psychopharmacology (Berl)* **110**, 27-36.
- Lindgren, N., Usiello, A., Goiny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., Hokfelt, T., Borrelli, E. and 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**, 4305-9.
- Lindner, M.D., Cain, C.K., Plone, M.A., Frydel, B.R., Blaney, T.J., Emerich, D.F. and Hoane, M.R. (1999) Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behav Brain Res* **102**, 1-16.
- Lipska, B.K. (2004) Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* **29**, 282-6.
- Lipska, B.K., Halim, N.D., Segal, P.N. and Weinberger, D.R. (2002) Effects of reversible inactivation of the neonatal ventral hippocampus on behavior in the adult rat. *J Neurosci* **22**, 2835-42.
- Lipska, B.K., Jaskiw, G.E. and Weinberger, D.R. (1993) Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **9**, 67-75.
- Lipska, B.K. and Weinberger, D.R. (1995) Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8906-10.

- Lisman, J. (2003) Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 829-42.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z. and Lansbury, P.T. Jr (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* **111**, 209-18.
- Lopez-Bendito, G., Shigemoto, R., Fairen, A. and Lujan, R. (2002) Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex* **12**, 625-38.
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B. and Kriegstein, A.R. (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287-98.
- Luk, K.C., Kennedy, T.E. and Sadikot, A.F. (2003) Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* **23**, 2239-50.
- Lundberg, J.M. (1996) Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* **48**, 113-78.
- Luscher, C. and Frerking, M. (2001) Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* **24**, 665-70.
- Luyt, K., Varadi, A., Durant, C.F. and Molnar, E. (2006) Oligodendroglial metabotropic glutamate receptors are developmentally regulated and involved in the prevention of apoptosis. *J Neurochem* **99**, 641-56.

- Manns, I.D., Mainville, L. and Jones, B.E. (2001) Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience* **107**, 249-63.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J.H., Bunzow, J.R., Civelli, O., Akil, H. and Watson, S.J. (1990) Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci* **10**, 2587-600.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J.H., Zhou, Q.Y., Civelli, O., Akil, H. and Watson, S.J. (1991) A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience* **45**, 359-71.
- Martins, R.A., Linden, R. and Dyer, M.A. (2006) Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development. *Eur J Neurosci* **24**, 969-80.
- Masson, J., Sagné, C., Hamon, M., El Mestikawy, S. (1999) Neurotransmitters transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev.* **51**, 439-64.
- Matsuoka, Y., Vila, M., Lincoln, S., McCormack, A., Picciano, M., LaFrancois, J., Yu, X., Dickson, D., Langston, W.J., McGowan, E., Farrer, M., Hardy, J., Duff, K., Przedborski, S. and Di Monte, D.A. (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis* **8**, 535-9.
- Matsushita, N., Okada, H., Yasoshima, Y., Takahashi, K., Kiuchi, K. and Kobayashi, K. (2002) Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem* **82**, 295-304.
- Mattson, M.P., Dou, P. and Kater, S.B. (1988) Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **8**, 2087-100.

- McCobb, D.P., Haydon, P.G. and Kater, S.B. (1988) Dopamine and serotonin inhibition of neurite elongation of different identified neurons. *J Neurosci Res* **19**, 19-26.
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Healy, D.J., Kuehn, R., Zhou, Q.Y., Bunzow, J.R., Akil, H., Civelli, O. and Watson, S.J. Jr (1991) Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* **5**, 231-42.
- Mendez, J.A., Bourque, M.J., Dal Bo, G., Bourdeau, M.L., Danik, M., Williams, S., Lacaille, J.C. and Trudeau, L.E. (2008) Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci* **28**, 6309-18.
- Merighi, A. (2002) Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* **66**, 161-90.
- Michel, F.J. and Trudeau, L.E. (2000) Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* **39**, 1536-43.
- Miller, G.W., Erickson, J.D., Perez, J.T., Penland, S.N., Mash, D.C., Rye, D.B. and Levey, A.I. (1999) Immunochemical analysis of vesicular monoamine transporter (VMAT2) protein in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **156**, 138-48.
- Milosevic, J., Schwarz, S.C., Maisel, M., Poppe-Wagner, M., Dieterlen, M.T., Storch, A. and Schwarz, J. (2007) Dopamine D2/D3 receptor stimulation fails to promote dopaminergic neurogenesis of murine and human midbrain-derived neural precursor cells in vitro. *Stem Cells Dev* **16**, 625-35.

- Miskevich, F., Lu, W., Lin, S.Y. and Constantine-Paton, M. (2002) Interaction between metabotropic and NMDA subtypes of glutamate receptors in sprout suppression at young synapses. *J Neurosci* **22**, 226-38.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M. and Caron, M.G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**, 189-225.
- Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **29**, 365-402.
- Montagu, K.A. (1957) Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* **180**, 244-5.
- Montana, V., Ni, Y., Sunjara, V., Hua, X. and Parpura, V. (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* **24**, 2633-42.
- Moore, A.E., Cicchetti, F., Hennen, J. and Isacson, O. (2001) Parkinsonian motor deficits are reflected by proportional A9/A10 dopamine neuron degeneration in the rat. *Exp Neurol* **172**, 363-76.
- Morimoto, R., Hayashi, M., Yatsushiro, S., Otsuka, M., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2003) Co-expression of vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) and their association with synaptic-like microvesicles in rat pinealocytes. *J Neurochem* **84**, 382-91.
- Moutsimilli, L., Farley, S., Dumas, S., El Mestikawy, S., Giros, B. and Tzavara, E.T. (2005) Selective cortical VGLUT1 increase as a marker for antidepressant activity. *Neuropharmacology* **49**, 890-900.

- Mueser, K.T., Douglas, M.S., Bellack, A.S. and Morrison, R.L. (1991) Assessment of enduring deficit and negative symptom subtypes in schizophrenia. *Schizophr Bull* **17**, 565-82.
- Muly, E.C. 3rd, Szigeti, K. and Goldman-Rakic, P.S. (1998) D1 receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization. *J Neurosci* **18**, 10553-65.
- Nair-Roberts, R.G., Chatelain-Badie, S.D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J.P. and Ungless, M.A. (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* **152**, 1024-31.
- Namkung, Y. and Sibley, D.R. (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* **279**, 49533-41.
- Neal-Beliveau, B.S. and Joyce, J.N. (1999) Timing: A critical determinant of the functional consequences of neonatal 6-OHDA lesions. *Neurotoxicol Teratol* **21**, 129-40.
- Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P. and Moonen, G. (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* **305**, 187-202.
- Ni, B., Rosteck, P.R. Jr, Nadi, N.S. and Paul, S.M. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5607-11.
- Niznik, H.B. and Van Tol, H.H. (1992) Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J Psychiatry Neurosci* **17**, 158-80.

- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-5.
- Oertel, W.H., Nitsch, C. and Mugnaini, E. (1984) Immunocytochemical demonstration of the GABA-ergic neurons in rat globus pallidus and nucleus entopeduncularis and their GABA-ergic innervation. *Adv Neurol* **40**, 91-8.
- Olsen, D.P., Dunlap, K. and Jacob, M.H. (2007) Kainate receptors and RNA editing in cholinergic neurons. *J Neurochem* **101**, 327-41.
- Olverman, H.J., Jones, A.W. and Watkins, J.C. (1988) [³H]D-2-amino-5-phosphonopentanoate as a ligand for N-methyl-D-aspartate receptors in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* **26**, 1-15.
- Otmakhova, N.A. and Lisman, J.E. (1996) D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* **16**, 7478-86.
- Ottersen, O.P. (1981) Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. *J Comp Neurol* **202**, 335-56.
- Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J. (1986) Excitatory amino acid pathways in the brain. *Adv Exp Med Biol* **203**, 263-84.
- Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J. (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* **229**, 374-92.

- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J.R., Nicholl, D., Carrera, I.M., Pena, A.S., de Silva, R., Lees, A., Marti-Masso, J.F., Perez-Tur, J., Wood, N.W. and Singleton, A.B. (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* **44**, 595-600.
- Parent, A., Asselin, M.C. and Cote, P.Y. (1996) Dopaminergic regulation of peptide gene expression in the striatum of normal and parkinsonian monkeys. *Adv Neurol* **69**, 73-7.
- Parish, C.L., Stanic, D., Drago, J., Borrelli, E., Finkelstein, D.I. and Horne, M.K. (2002) Effects of long-term treatment with dopamine receptor agonists and antagonists on terminal arbor size. *Eur J Neurosci* **16**, 787-94.
- Pei, Q., Zetterstrom, T.S., Sprakes, M., Tordera, R. and Sharp, T. (2003) Antidepressant drug treatment induces Arc gene expression in the rat brain. *Neuroscience* **121**, 975-82.
- Penit-Soria, J., Durand, C., Herve, D. and Besson, M.J. (1997) Morphological and biochemical adaptations to unilateral dopamine denervation of the neostriatum in newborn rats. *Neuroscience* **77**, 753-66.
- Pennartz, C.M., Groenewegen, H.J. and Lopes da Silva, F.H. (1994) The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol* **42**, 719-61.
- Pereira, S.P. and Araujo, E.G. (1997) Veratridine increases the survival of retinal ganglion cells in vitro. *Braz J Med Biol Res* **30**, 1467-70.

- Perez, F.A. and Palmiter, R.D. (2005) Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2174-9.
- Petralia, R.S., Esteban, J.A., Wang, Y.X., Partridge, J.G., Zhao, H.M., Wenthold, R.J. and Malinow, R. (1999) Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci* **2**, 31-6.
- Petzinger, G.M., Quik, M., Ivashina, E., Jakowec, M.W., Jakubiak, M., Di Monte, D. and Langston, J.W. (2001) Reliability and validity of a new global dyskinesia rating scale in the MPTP-lesioned non-human primate. *Mov Disord* **16**, 202-7.
- Phillips, L.J., Velakoulis, D., Pantelis, C., Wood, S., Yuen, H.P., Yung, A.R., Desmond, P., Brewer, W. and McGorry, P.D. (2002) Non-reduction in hippocampal volume is associated with higher risk of psychosis. *Schizophr Res* **58**, 145-58.
- Pickel, V.M., Beckley, S.C., Joh, T.H. and Reis, D.J. (1981) Ultrastructural immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the neostriatum. *Brain Res* **225**, 373-85.
- Pinot, F., Alayrac, C., Mioskowski, C., Durst, F. and Salaun, J.P. (1994) New cytochrome P450-dependent reactions from wheat: terminal and sub-terminal hydroxylation of oleic acid by microsomes from naphthalic acid anhydride and phenobarbital induced wheat seedlings. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 795-803.
- Platel, J.C., Heintz, T., Young, S., Gordon, V. and Bordey, A. (2008) Tonic activation of GLUK5 kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone. *J Physiol* **586**, 3783-93.
- Plenz, D. and Kitai, S.T. (1998) Regulation of the nigrostriatal pathway by metabotropic glutamate receptors during development. *J Neurosci* **18**, 4133-44.

- Prensa, L. and Parent, A. (2001) The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci* **21**, 7247-60.
- Raisman-Vozari, R., Hirsch, E., Javoy-Agid, F., Vassort, C., Savasta, M., Feuerstein, C., Thibault, J. and Agid, Y. (1991) Quantitative autoradiography of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rat brain. *J Neurochem* **57**, 1212-22.
- Raiteri, L., Raiteri, M. and Bonanno, G. (2002) Coexistence and function of different neurotransmitter transporters in the plasma membrane of CNS neurons. *Prog Neurobiol* **68**, 287-309.
- Raju, D.V., Ahern, T.H., Shah, D.J., Wright, T.M., Standaert, D.G., Hall, R.A. and Smith, Y. (2008) Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *Eur J Neurosci* **27**, 1647-58.
- Rayport, S., Sulzer, D., Shi, W.X., Sawadikosol, S., Monaco, J., Batson, D. and Rajendran, G. (1992) Identified postnatal mesolimbic dopamine neurons in culture: morphology and electrophysiology. *J Neurosci* **12**, 4264-80.
- Remschmidt, H., Hennighausen, K., Clement, H.W., Heiser, P. and Schulz, E. (2000) Atypical neuroleptics in child and adolescent psychiatry. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **9 Suppl 1**, I9-19.
- Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C. and Patel, Y.C. (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**, 154-7.
- Rosin, D.L., Chang, D.A. and Guyenet, P.G. (2006) Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* **499**, 64-89.

- Salim, H., Ferre, S., Dalal, A., Peterfreund, R.A., Fuxe, K., Vincent, J.D. and Lledo, P.M. (2000) Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem* **74**, 432-9.
- Salthun-Lassalle, B., Hirsch, E.C., Wolfart, J., Ruberg, M. and Michel, P.P. (2004) Rescue of mesencephalic dopaminergic neurons in culture by low-level stimulation of voltage-gated sodium channels. *J Neurosci* **24**, 5922-30.
- Sams-Dodd, F., Lipska, B.K. and Weinberger, D.R. (1997) Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* **132**, 303-10.
- Sandler, R. and Smith, A.D. (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* **303**, 177-92.
- Sawamoto, K., Nakao, N., Kobayashi, K., Matsushita, N., Takahashi, H., Kakishita, K., Yamamoto, A., Yoshizaki, T., Terashima, T., Murakami, F., Itakura, T. and Okano, H. (2001) Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6423-8.
- Saykin, A.J., Shtasel, D.L., Gur, R.E., Kester, D.B., Mozley, L.H., Stafiniak, P. and Gur, R.C. (1994) Neuropsychological deficits in neuroleptic naive patients with first-episode schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **51**, 124-31.
- Schäfer, M.K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., Erickson, J.D. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem.* **277**, 50734-48.

- Schmidt, N. and Ferger, B. (2001) Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* **108**, 1263-82.
- Schmitz, Y., Lee, C.J., Schmauss, C., Gonon, F. and Sulzer, D. (2001) Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *J Neurosci* **21**, 5916-24.
- Schober, A. (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* **318**, 215-24.
- Schwartz, R.K. and Huston, J.P. (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* **50**, 275-331.
- Schwarzer, C. and Sperk, G. (1995) Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. *Neuroscience* **69**, 705-9.
- Seeman, P. and Niznik, H.B. (1990) Dopamine receptors and transporters in Parkinson's disease and schizophrenia. *FASEB J* **4**, 2737-44.
- Seiden, L.S. and Carlsson, A. (1964) Brain and heart catecholamine levels after L-Dopa administration in reserpine treated mice : Correlations with a conditioned avoidance response. *Psychopharmacologia* **5**, 178-81.
- Seiden, L.S. and Carlsson, A. (1963) Temporary and partial antagonism by L-Dopa of reserpine-induced suppression of a conditioned avoidance response. *Psychopharmacologia* **4**, 418-23.
- Shi, S.H., Hayashi, Y., Petralia, R.S., Zaman, S.H., Wenthold, R.J., Svoboda, K. and Malinow, R. (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* **284**, 1811-6.

- Shimoke, K., Kudo, M. and Ikeuchi, T. (2003) MPTP-induced reactive oxygen species promote cell death through a gradual activation of caspase-3 without expression of GRP78/Bip as a preventive measure against ER stress in PC12 cells. *Life Sci* **73**, 581-93.
- Silinsky, E.M. and Hubbard, J.I. (1973) Thermal synthesis of amino acids from a simulated primitive atmosphere. *Nature* **243**, 404-5.
- Sloviter, R.S., Dichter, M.A., Rachinsky, T.L., Dean, E., Goodman, J.H., Sollas, A.L. and Martin, D.L. (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* **373**, 593-618.
- Smeyne, R.J. and Jackson-Lewis, V. (2005) The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* **134**, 57-66.
- Smiley, J.F., Levey, A.I., Ciliax, B.J. and Goldman-Rakic, P.S. (1994) D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U A* **91**, 5720-4.
- Smith, R.E., Haroutunian, V., Davis, K.L. and Meador-Woodruff, J.H. (2001) Vesicular glutamate transporter transcript expression in the thalamus in schizophrenia. *Neuroreport* **12**, 2885-7.
- Snyder, S.H. and D'Amato, R.J. (1986) MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. The 1985 George C. Cotzias lecture. *Neurology* **36**, 250-8.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L. and Schwartz, J.C. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**, 146-51.

- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249**, 1580-5.
- Song, I. and Huganir, R.L. (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **25**, 578-88.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H. and Reis, D.J. (1981) Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. *J Comp Neurol* **199**, 255-76.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. and Goedert, M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6469-73.
- St-Gelais, F., Jomphe, C. and Trudeau, L.E. (2006) The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci* **31**, 229-45.
- Staal, R.G., Hogan, K.A., Liang, C.L., German, D.C. and Sonsalla, P.K. (2000) In vitro studies of striatal vesicles containing the vesicular monoamine transporter (VMAT2): rat versus mouse differences in sequestration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 329-35.
- Stevens, A.A., Goldman-Rakic, P.S., Gore, J.C., Fulbright, R.K. and Wexler, B.E. (1998) Cortical dysfunction in schizophrenia during auditory word and tone working memory demonstrated by functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* **55**, 1097-103.

- Storm-Mathisen, J., Leknes, A.K., Bore, A.T., Vaaland, J.L., Edminson, P., Haug, F.M. and Ottersen, O.P. (1983) First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature* **301**, 517-20.
- Stornetta, R.L., Sevigny, C.P. and Guyenet, P.G. (2002) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J Comp Neurol* **444**, 191-206.
- Stornetta, R.L., Sevigny, C.P., Schreihofner, A.M., Rosin, D.L. and Guyenet, P.G. (2002) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. *J Comp Neurol* **444**, 207-20.
- Strata, P. and Harvey, R. (1999) Dale's principle. *Brain Res Bull* **50**, 349-50.
- Sulzer, D., Joyce, M.P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S.N., Hattori, T. and Rayport, S. (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* **18**, 4588-602.
- 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. and et, a.l. (1990) Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* **347**, 80-3.
- Suzuki, M., Nelson, A.D., Eickstaedt, J.B., Wallace, K., Wright, L.S. and Svendsen, C.N. (2006) Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci* **24**, 645-53.
- Swanson, L.W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* **9**, 321-53.

- Takahashi, N., Miner, L.L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R.S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. and Uhl, G.R. (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9938-43.
- Takamori, S. (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res* **55**, 343-51.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. and Jahn, R. (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* **3**, 798-803.
- Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. and Jahn, R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189-94.
- Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. and Jahn, R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* **21**, RC182
- Talbot, K., Eidem, W.L., Tinsley, C.L., Benson, M.A., Thompson, E.W., Smith, R.J., Hahn, C.G., Siegel, S.J., Trojanowski, J.Q., Gur, R.E., Blake, D.J. and Arnold, S.E. (2004) Dysbindin-1 is reduced in intrinsic, glutamatergic terminals of the hippocampal formation in schizophrenia. *J Clin Invest* **113**, 1353-63.
- Tanaka, S. and Koike, T. (1997) Veratridine delays apoptotic neuronal death induced by NGF deprivation through a Na(+)-dependent mechanism in cultured rat sympathetic neurons. *Int J Dev Neurosci* **15**, 15-27.

- Tashiro, A., Dunaevsky, A., Blazeski, R., Mason, C.A. and Yuste, R. (2003) Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron* **38**, 773-84.
- Thierry, A.M., Deniau, J.M. and Feger, J. (1979) Effects of stimulation of the frontal cortex on identified output VMT cells in the rat. *Neurosci Lett* **15**, 102-7.
- Thome, J., Sakai, N., Shin, K., Steffen, C., Zhang, Y.J., Impey, S., Storm, D. and Duman, R.S. (2000) cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci* **20**, 4030-6.
- Todd, A.J. and Sullivan, A.C. (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* **296**, 496-505.
- Tordera, R.M., Pei, Q. and Sharp, T. (2005) Evidence for increased expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT1, by a course of antidepressant treatment. *J Neurochem* **94**, 875-83.
- Torres, I.J., Flashman, L.A., O'Leary, D.S., Swayze, V. 2nd and Andreasen, N.C. (1997) Lack of an association between delayed memory and hippocampal and temporal lobe size in patients with schizophrenia and healthy controls. *Biol Psychiatry* **42**, 1087-96.
- Tripanichkul, W., Stanic, D., Drago, J., Finkelstein, D.I. and Horne, M.K. (2003) D2 Dopamine receptor blockade results in sprouting of DA axons in the intact animal but prevents sprouting following nigral lesions. *Eur J Neurosci* **17**, 1033-45.
- Trudeau, L.E. (2004) Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *J Psychiatry Neurosci* **29**, 296-310.

- Tsai, G. and Coyle, J.T. (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 165-79.
- Ungerstedt, U. (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* **367**, 1-48.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G. and Wood, N.W. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-60.
- Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B. and Civelli, O. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**, 610-4.
- Varoqui, H., Schafer, M.K., Zhu, H., Weihe, E. and Erickson, J.D. (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* **22**, 142-55.
- Ventura, S., Dewalagama, R.K. and Lau, L.C. (2003) Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an excitatory cotransmitter with noradrenaline to the smooth muscle of the rat prostate gland. *Br J Pharmacol* **138**, 1277-84.
- Verney, C., Berger, B., Adrien, J., Vigny, A. and Gay, M. (1982) Development of the dopaminergic innervation of the rat cerebral cortex. A light microscopic immunocytochemical study using anti-tyrosine hydroxylase antibodies. *Brain Res* **281**, 41-52.

- Visser, J.E., Bar, P.R. and Jinnah, H.A. (2000) Lesch-Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 449-75.
- Voorn, P., Jorritsma-Byham, B., Van Dijk, C. and Buijs, R.M. (1986) The dopaminergic innervation of the ventral striatum in the rat: a light- and electron-microscopical study with antibodies against dopamine. *J Comp Neurol* **251**, 84-99.
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B. and 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**, 857-87.
- Weiner, D.M., Levey, A.I., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., O'Dowd, B.F., Seeman, P. and Brann, M.R. (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1859-63.
- Williams, G.V. and Goldman-Rakic, P.S. (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* **376**, 572-5.
- Wilson, M.T., Kisaalita, W.S. and Keith, C.H. (2000) Glutamate-induced changes in the pattern of hippocampal dendrite outgrowth: a role for calcium-dependent pathways and the microtubule cytoskeleton. *J Neurobiol* **43**, 159-72.
- Wise, R.A. and Rompre, P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* **40**, 191-225.
- Witkovsky, P. (2004) Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* **108**, 17-40.
- Wojcik, S.M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N. and Rhee, J.S. (2006) A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* **50**, 575-87.

- Wu, L.J., Li, Y. and Xu, T.L. (2002) Co-release and interaction of two inhibitory co-transmitters in rat sacral dorsal commissural neurons. *Neuroreport* **13**, 977-81.
- Yamada, T., McGeer, P.L., Baimbridge, K.G. and McGeer, E.G. (1990) Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res* **526**, 303-7.
- Yamaguchi, T., Sheen, W. and Morales, M. (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* **25**, 106-18.
- Zhang, L., Schessl, J., Werner, M., Bonnemann, C., Xiong, G., Mojsilovic-Petrovic, J., Zhou, W., Cohen, A., Seeburg, P., Misawa, H., Jayaram, A., Personius, K., Hollmann, M., Sprengel, R. and Kalb, R. (2008) Role of GluR1 in activity-dependent motor system development. *J Neurosci* **28**, 9953-68.
- Zhang, Q., Pangrsic, T., Kreft, M., Krzan, M., Li, N., Sul, J.Y., Halassa, M., Van Bockstaele, E., Zorec, R. and Haydon, P.G. (2004) Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* **279**, 12724-33.
- Zhou, F.M., Liang, Y., Salas, R., Zhang, L., De Biasi, M. and Dani, J.A. (2005) Corelease of dopamine and serotonin from striatal dopamine terminals. *Neuron* **46**, 65-74.
- Zhou, Q.Y., Grandy, D.K., Thambi, L., Kushner, J.A., Van Tol, H.H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R. and Civelli, O. (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* **347**, 76-80.
- Zhou, Q.Y. and Palmiter, R.D. (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* **83**, 1197-209.
- Zhou, Q.Y., Quaipe, C.J. and Palmiter, R.D. (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* **374**, 640-3.

- Zhou, W., Zhang, L., Guoxiang, X., Mojsilovic-Petrovic, J., Takamaya, K., Sattler, R., Huganir, R. and Kalb, R. (2008) GluR1 controls dendrite growth through its binding partner, SAP97. *J Neurosci* **28**, 10220-33.
- Zimprich, A., Muller-Myhsok, B., Farrer, M., Leitner, P., Sharma, M., Hulihan, M., Lockhart, P., Strongosky, A., Kachergus, J., Calne, D.B., Stoessl, J., Uitti, R.J., Pfeiffer, R.F., Trenkwalder, C., Homann, N., Ott, E., Wenzel, K., Asmus, F., Hardy, J., Wszolek, Z. and Gasser, T. (2004) The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet* **74**, 11-9.

