



HAL
open science

Propriétés de la synapse cortico-sous-thalamique : étude optogénétique chez le rongeur

Lionel Froux

► **To cite this version:**

Lionel Froux. Propriétés de la synapse cortico-sous-thalamique : étude optogénétique chez le rongeur. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0208 . tel-01169918

HAL Id: tel-01169918

<https://theses.hal.science/tel-01169918>

Submitted on 30 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Lionel FROUX

**Propriétés de la synapse cortico-sous-thalamique : étude
optogénétique chez le rongeur**

Sous la direction de : Dr. Anne Taupignon

Soutenue le 7 Novembre 2014

Membres du jury :

M. GROC, Laurent	Directeur de recherche CNRS, Bordeaux	Président
M. HERVE, Denis	Directeur de recherche INSERM, Paris	Rapporteur
M. GUBELLINI, Paolo	Chargé de recherche CNRS, Marseille	Rapporteur
M. MAURICE, Nicolas	Chargé de recherche CNRS, Marseille	Examineur
M. PALFI, Stéphane	Professeur universitaire Univ. Paris 12, Paris	Examineur
M. LANCIEGO, José Luis	Professeur universitaire Univ. de Navarre, Pampelune	Invité
Mme TAUPIGNON, Anne	Maître de conférences Univ. de Bordeaux, Bordeaux	Directrice de thèse

Propriétés de la synapse cortico-sous-thalamique : étude optogénétique chez le rongeur

Les ganglions de la base (GB) forment un réseau de structures sous-corticales impliquées dans la motricité volontaire, mais aussi dans des aspects plus cognitifs et motivationnels du comportement moteur. La dopamine est un neuromodulateur essentiel au bon fonctionnement de ce réseau.

La synapse cortico-sous-thalamique (cortico-NST) est une synapse glutamatergique (excitatrice) transmettant les informations corticales au noyau sous-thalamique (NST), ce qui forme la première partie d'une des trois voies des GB : la voie hyperdirecte.

La voie cortico-NST est impliquée dans des tâches de type « go-no-go » (arrêt d'un acte moteur débuté) et dans les effets bénéfiques de la stimulation cérébrale profonde du NST sur les symptômes de la maladie de Parkinson. Cependant, les propriétés des synapses cortico-NST ne sont pas connues. Ce manque d'informations provient, en partie, de l'anatomie particulière de cette voie, qui rend l'étude *in vitro* de la synapse cortico-NST difficile.

L'utilisation de l'optogénétique nous a permis de contourner ce problème. En associant cette technique à l'électrophysiologie sur tranches de cerveaux de rongeur, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur des récepteurs dopaminergiques D5 sur la transmission cortico-NST. Nous montrons également que les propriétés de plasticité à court terme de cette synapse lui permettent de réduire l'influence des messages corticaux à haute fréquence sur le NST.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent que l'optogénétique est un bon moyen d'étudier la synapse cortico-NST *in vitro* et contribuent à améliorer la compréhension des propriétés de la cette synapse.

Mots-clés : ganglions de la base, noyau-sous-thalamique, voie hyperdirecte, récepteur D5, optogénétique, patch-clamp.

Properties of the cortico-subthalamic synapse: an optogenetic study

Basal ganglia (BG) are a group of subcortical nuclei involved in action selection and in cognitive and motivational aspects of motor behavior. Dopamine is essential for proper functioning of BG.

The cortico-subthalamic (cortico-STN) synapse is a glutamatergic (excitatory) synapse involved in signal transmission from cortex to subthalamic nucleus (STN). The cortico-STN synapse is the first synapse in the hyperdirect pathway, one of the three pathways of BG.

Even if the cortico-STN pathway is involved in “go-no-go” tasks (stopping of an already started motor act) and in the beneficial effects of the high frequency stimulation of the STN on Parkinsonian symptoms, properties of the cortico-STN synapse are not well described. The lack of data is due, at least in part, to the specific anatomy of the cortico-STN pathway which does not allow the use of standard methods *in vitro*.

The use of optogenetics allowed us to circumvent this issue. By coupling this approach with electrophysiology on brain slices in rodents, we show that dopaminergic D5 receptors stimulation reduces glutamatergic transmission at cortico-STN synapses. We also show that short-term plasticity properties of this synapse reduce the influence of high frequency cortical inputs on the STN.

Our findings indicate that optogenetics enables studying the cortico-STN synapse *in vitro* and contributes to improving our knowledge of the properties of the synapse.

Keywords: basal ganglia, subthalamic nucleus, hyperdirect pathway, dopamine D5 receptor, optogenetics, patch-clamp.

Unité de recherche

Institut des Maladies Neurodégénératives – CNRS UMR 5293 – 146 rue Léo Saignat – 33076
BORDEAUX Cedex

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma Directrice de thèse, le Dr. Anne TAUPIGNON qui m'a fait confiance pour la réalisation de ce projet. Anne, merci pour votre patience, votre sympathie et vos encouragements. J'ai appris énormément de choses pendant cette thèse et c'est en grande partie grâce à vous. Merci également pour votre implication et votre disponibilité tout au long de cette thèse : vous m'avez permis de réaliser mon doctorat dans des conditions idéales.

Je remercie le Dr. Jérôme BAUFRETON, directeur de l'équipe « Dynamiques synaptique et cellulaire des réseaux neuronaux » qui m'a accueilli au sein de son équipe. Merci Jérôme pour votre sympathie, vos conseils, votre rigueur scientifique et votre disponibilité. Merci également d'avoir relu et corrigé une grande partie de ce manuscrit.

Je remercie également le Dr. Erwan BEZARD, directeur de l'Institut des Maladies Neurodégénératives (IMN) qui m'a permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier le Dr. Laurent Groc d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous suis reconnaissant de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider cette thèse.

Mes remerciements vont également aux Drs. Denis HERVE et Paolo GUBELLINI pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs.

Je remercie également le Dr. Nicolas MAURICE et le Pr. Stéphane PALFI d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs.

Je remercie aussi le Dr. José Luis LANCIEGO qui a accepté de participer à la discussion autour de ce travail en tant que membre invité du jury.

Je vous exprime ici toute ma gratitude pour l'intérêt que vous avez consenti à porter à ce travail.

Par ailleurs, je tiens particulièrement à remercier les membres de l'équipe pour leur aide, leurs conseils et leur bonne humeur : Stéphanie, Morgane, Liliana, Cristina, Raj, Azzedine, Julien, Marine et M. Bioulac.

Un grand merci à Stéphanie pour avoir réalisé les injections stéréotaxiques chez le rat et les expériences d'immunohistochimie.

Merci Morgane pour ton soutien logistique et pour avoir accepté de relire cette thèse.

Je remercie également les membres du bâtiment 1 que j'ai eu le plaisir de retrouver tous les jours : Estelle, Audrey M., Eric, Till, Caroline, Paul, Audrey D., Youna, Sylvia, Heather, Karine et Serge.

Une pensée particulière pour Till et Azzedine avec qui j'ai partagé le bureau pendant ces trois années. Un grand merci pour l'ambiance si studieuse qui régnait dans ce bureau !

Je remercie aussi les membres de l'IMN qui ont de près ou de loin contribué au bon déroulement de ma thèse.

Merci à Elisabeth Normand qui a réalisé les expériences de stéréotaxie chez la souris et aux animaliers qui se sont occupés des animaux utilisés pendant ma thèse : Elodie, Florian et Anne.

Je remercie également Quentin qui m'a accueilli à Lausanne dans le laboratoire du Pr. G. Courtine et nos collaborateurs des équipes de José Luis Lanciego et d'Alicia Rivera en Espagne.

Je tiens également à remercier les personnes qui m'ont soutenu et donné l'envie de continuer dans le domaine de la recherche : Yves Lefeuvre, Valérie Lacarrière, Jean-Michel Revest et Philippe De Deurwaerdère.

De plus, j'ai évidemment une pensée profonde pour mes amis et ma famille qui m'ont toujours soutenu et ont suivi cette aventure de près ou de loin.

Merci Carole pour ton soutien, ta présence, tes conseils et surtout de m'avoir supporté pendant la rédaction de cette thèse.

Une pensée toute particulière pour ma mère : Maman, merci de m'avoir soutenu durant toutes ces années et d'avoir toujours tout fait pour que je puisse poursuivre mes études dans les meilleures conditions.

Un grand merci à tous !

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
TABLE DES ABREVIATIONS	5
INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	7
INDEX DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION GENERALE	10
CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	12
1. LES GANGLIONS DE LA BASE	12
1.1. Rôle des ganglions de la base	12
1.2. Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base.....	13
1.3. Dopamine et ganglions de la base	20
1.3.1 Présentation du système dopaminergique	20
1.3.2 Projections dopaminergiques au sein des GB	25
1.3.3 Effets de la dopamine sur les neurones épineux moyens.....	25
1.4. La maladie de Parkinson, une pathologie des GB	28
1.4.1 Présentation de la maladie de Parkinson.....	28
1.4.2 Physiopathologie de la maladie de Parkinson	28
1.4.3 Traitements de la maladie de Parkinson	30
2. LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE	32
2.1. Fonction de la voie cortico-sous-thalamique	32
2.2. Anatomie fonctionnelle de la voie cortico-sous-thalamique.....	34
2.2.1 Les projections corticales	34
2.2.2 Le noyau-sous-thalamique	37
<i>Organisation du noyau sous-thalamique.....</i>	<i>37</i>
<i>Connectivité du NST.....</i>	<i>40</i>

2.3. La synapse cortico-sous-thalamique, une synapse glutamatergique.....	42
2.3.1 Généralités : les synapses glutamatergiques	42
<i>Récepteurs au glutamate</i>	44
<i>Effets des récepteurs dopaminergiques sur les synapses glutamatergiques.</i>	46
2.3.2 Organisation de la synapse cortico-sous-thalamique	48
<i>Récepteurs au glutamate</i>	48
<i>Récepteurs dopaminergiques</i>	49
<i>Récepteurs sérotoninergiques</i>	51
2.3.3 Elément pré-synaptique : les neurones pyramidaux de la couche V du cortex.....	51
2.3.4 Elément post-synaptique : les neurones sous-thalamiques	53
<i>Propriétés électrophysiologiques</i>	53
<i>Modulation dopaminergique</i>	57
3. PLASTICITE SYNAPTIQUE A COURT TERME.....	58
3.1. Présentation des différents types de plasticité synaptique	58
3.1.1 Généralités : la plasticité synaptique	58
3.1.2 La plasticité synaptique à long terme	59
3.1.3 La plasticité synaptique à court terme.....	61
<i>Présentation de la plasticité à court terme</i>	61
<i>Intérêt fonctionnel de la plasticité à court terme</i>	63
<i>Bases biologiques de la plasticité à court terme</i>	65
3.2. Plasticité à court-terme de la synapse cortico-sous-thalamique	68
DEMARCHE SCIENTIFIQUE	71
MATERIEL ET METHODES	74
1. ANIMAUX	74
2. OPTOGENETIQUE.....	75
2.1. Généralités	75
2.2. Justification de l'approche utilisée	75
2.3. Mise en place de la technique.....	78
3. INJECTIONS STEREOTAXIQUES	79

3.1. Injection intracérébrale de virus et/ou de neurotoxine (6-OHDA)	79
3.1.1 Protocole chirurgical	79
3.1.2 Injection de solution virale.....	81
3.1.3 Injection de neurotoxine (6-OHDA).....	81
<i>Mode d'action de la 6-OHDA</i>	<i>81</i>
<i>Injections de 6-OHDA.....</i>	<i>81</i>
<i>Evaluation pré-enregistrement du niveau de lésion.....</i>	<i>83</i>
3.2. Injection de solution de virus rétrograde dans la moelle épinière.....	83
4. IMMUNOHISTOCHIMIE	84
4.1. Prélèvement et préparation des tissus (cerveau et moelle épinière).....	84
4.2. Immunofluorescence.....	84
4.3. Révélation de la tyrosine hydroxylase par réaction enzymatique	85
4.4. Acquisition des images en microscopie optique	87
5. ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES.....	87
5.1. Préparation des tranches de cerveau	87
5.2. Solutions utilisées	88
5.2.1 Solutions de prélèvement et de maintien	88
5.2.2 Solutions intracellulaires.....	89
5.3. Enregistrements électrophysiologiques : patch-clamp, configuration « cellule entière ».....	89
5.3.1 Principe de la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière ».....	89
5.3.2 Installation des tranches dans la chambre d'enregistrement	90
5.3.3 Enregistrements de patch-clamp en configuration « cellule entière ».....	90
5.3.4 Stimulations électriques et optiques.....	91
<i>Stimulations électriques de l'ensemble des afférences du NST.....</i>	<i>91</i>
<i>Stimulations optiques des neurones pyramidaux et des fibres cortico-NST</i>	<i>91</i>
5.3.5 Acquisition des données et protocoles utilisés.....	91
<i>Enregistrements en courant imposé.....</i>	<i>91</i>
<i>Enregistrements en potentiel imposé</i>	<i>92</i>
5.3.6 Pharmacologie.....	92
5.3.7 Analyse des données	94
<i>Propriétés membranaires intrinsèques</i>	<i>94</i>
<i>Profils électrophysiologiques des neurones corticaux</i>	<i>96</i>

<i>Fidélité de la réponse des neurones corticaux à la stimulation optique</i>	<i>96</i>
<i>Caractérisation des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC).....</i>	<i>97</i>
6. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	99
6.1. Prélèvement, immunohistochimie et préparation des tissus	99
6.2. Quantification.....	99
RESULTATS.....	100
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	142
1. CONTROLE DE L'ACTIVITE DES NEURONES PYRAMIDAUX DE LA COUCHE V DU CORTEX PAR LA LUMIERE.....	143
2. UTILISATION DE L'OPTOGENETIQUE POUR ETUDIER LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE ET LES PHENOMENES DE PLASTICITE A COURT TERME DE LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE	145
3. LE RECEPTEUR D5 REDUIT LA TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE DEPENDANTE DES RECEPTEURS AMPA AU NIVEAU DE LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE.....	146
4. LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE JOUE UN ROLE DE FILTRE PASSE-BAS	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	158
ANNEXES	175
ANNEXE 1 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	175
ANNEXE 2 : CHAPITRE DE LIVRE	186
ANNEXE 3 : ARTICLE EN PREPARATION ET COMMUNICATIONS AFFICHEES	209
ANNEXE 4 : FORMATIONS EFFECTUEES PENDANT LA THESE.....	209

TABLE DES ABREVIATIONS

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AAV	Adéno-associated virus (Virus adéno-associé)
AC	Adénylate cyclase
ACSF	Artificial cerebrospinal fluid (liquide céphalo-rachidien artificiel)
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP	Antéro-postériorité
ATP	Adénosine triphosphate
ATV	Aire tegmentale ventrale
BDA	Biotinylated dextran amines
BSA	Bovine serum albumin (Albumine de sérum bovin)
CaMKII	Protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante de type 2
ChR2	Channelrhodopsine de type 2
COM-T	Catéchol-O-méthyltransférase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAT	Transporteur de la dopamine
EPSC	Courant post-synaptique excitateur
FMT	Faisceau médian du télencéphale
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GB	Ganglions de la base
GP	Globus Pallidus
GPe	Globus pallidus externe
GPI	Globus pallidus interne
GTP	Guanosine triphosphate
hSyn	Human synapsin (Synapsine humaine)
L	Latéralité
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
MAO	Monoamine oxydase
mGluR	Récepteur metabotropique au glutamate
NEM	Neurone épineux moyen
NEP	Noyau entopédonculaire

NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NST	Noyau sous-thalamique
P	Profondeur
PBS	Phosphate buffer saline
PFA	Paraformaldéhyde
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PPR	Paired-pulse ratio
SNc	Substance noire compacte
SNr	Substance noire réticulée
TH	Tyrosine hydroxylase
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines

INDEX DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : L'anatomie des ganglions de la base et leurs principales connexions.</i>	15
<i>Figure 2 : Modèle classique de l'anatomie fonctionnelle des ganglions de la base présentant les trois voies principales.</i>	17
<i>Figure 3 : Modèle des cinq boucles parallèles proposé par Alexander et Delong.</i>	18
<i>Figure 4 : Exemple de modèle d'interaction des différentes boucles fonctionnelles des ganglions de la base : le modèle des connexions en spirale.</i>	19
<i>Figure 5 : Modèle de sélection de l'action au sein des ganglions de la base proposé par Mink.</i>	21
<i>Figure 6 : Schéma simplifié du fonctionnement d'une synapse dopaminergique.</i>	22
<i>Figure 7 : Détail des principales voies de transduction des récepteurs dopaminergiques et leurs interactions avec la voie de signalisation du récepteur NMDA.</i>	24
<i>Figure 8 : Modèle classique de l'anatomie fonctionnelle des ganglions de la base intégrant les effets de la dopamine sur les voies directes et indirectes.</i>	27
<i>Figure 9 : Dégénérescence des neurones dopaminergiques et corps de Lewy dans la substance noire compacte d'un individu atteint de la maladie de Parkinson.</i>	29
<i>Figure 10 : Schéma simplifié du modèle classique des ganglions de la base réactualisé, expliquant le fonctionnement des ganglions de la base en condition normale et lors de la maladie de Parkinson.</i>	31
<i>Figure 11 : La stimulation cérébrale profonde.</i>	33
<i>Figure 12 : Une partie des fibres cortico-sous-thalamiques proviennent de collatérales de la voie cortico-spinale.</i>	36
<i>Figure 13 : Reconstruction d'un neurone du noyau sous-thalamique de singe.</i>	38
<i>Figure 14 : Les territoires fonctionnels du noyau sous-thalamique.</i>	39
<i>Figure 15 : Organisations des principales afférences du noyau sous-thalamique sur l'arborisation dendritique des neurones sous-thalamiques.</i>	41
<i>Figure 16 : Organisation générale des synapses glutamatergiques.</i>	43
<i>Figure 17 : Les récepteurs ionotropiques au glutamate.</i>	45
<i>Figure 18 : Schéma récapitulatif des principaux récepteurs exprimés au niveau des afférences glutamatergiques du noyau sous-thalamique et de leurs effets.</i>	52
<i>Figure 19 : Propriétés morphologiques et électrophysiologiques des neurones cortico-sous-thalamiques.</i>	54
<i>Figure 20 : Propriétés morphologiques et électrophysiologiques des neurones du NST.</i>	55
<i>Figure 21 : Principaux mécanismes de la plasticité à long terme dépendante des récepteurs NMDA.</i>	60
<i>Figure 22 : Exemples de facilitation et de dépression à court terme.</i>	62
<i>Figure 23 : La plasticité synaptique à court terme confère des propriétés de filtre de l'information neuronale aux synapses.</i>	64
<i>Figure 24 : Schéma simplifié expliquant les mécanismes de la transmission synaptique rapide.</i>	66

Figure 25 : Plasticité synaptique à court terme de la synapse cortico-sous-thalamique. 70

Figure 26 : Arbres récapitulatifs des types d'animaux utilisés et des expériences réalisées au cours de la thèse. 76

Figure 27 : Principe de la technique d'optogénétique et différents types d'opsines. 77

Figure 28 : Représentation schématique des paramètres utilisés pour le calcul de R_{in} , R_a et C_m 95

Figure 29 : Représentation schématique des paramètres utilisés pour caractériser les courants post-synaptiques excitateurs (EPSC). 98

Figure 30 : Les récepteurs D5 sont principalement localisés au niveau du tronc dendritique des neurones du NST et leur nombre augmente en condition de déplétion dopaminergique. 150

Figure 31 : Profil de plasticité à court terme des synapses glutamatergiques du NST obtenu par stimulation électrique de la capsule interne chez le rat. 152

Figure 32 : Repérage et enregistrements de neurones cortico-sous-thalamiques. 156

Figure 33 : Marquage rétrograde de neurones cortico-spinaux. 157

INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Vecteurs viraux utilisés pour les expériences d'optogénétique.....</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 2 : Coordonnées stéréotaxiques du cortex moteur (M1) chez le rat âgé de 17 à 24 jours.</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 3 : Coordonnées stéréotaxiques du cortex moteur (M1) chez la souris âgée de 21 à 28 jours.</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.</i>	<i>86</i>
<i>Tableau 5 : Substances pharmacologiques utilisées pendant la thèse.</i>	<i>93</i>

INTRODUCTION GENERALE

L'objectif de ma thèse est de contribuer à l'étude des propriétés de la synapse cortico-sous-thalamique.

Nous avons émis l'hypothèse que la synapse cortico-sous-thalamique est contrôlée par la dopamine *via* les récepteurs D5. Nous avons examiné si les récepteurs D5 étaient capables de moduler la transmission glutamatergique en agissant sur les récepteurs AMPA, contrôlant ainsi la transmission excitatrice rapide de cette synapse. Nous avons aussi voulu mettre en évidence les propriétés de plasticité à court terme de cette synapse, pour mieux comprendre comment elle transmet l'information corticale.

Afin d'étudier spécifiquement cette synapse, nous avons mis en place une approche expérimentale faisant appel à l'optogénétique, associée à la technique de patch-clamp en cellule entière sur des tranches sagittales de cerveau de rongeur.

La première partie du mémoire est un rappel du contexte scientifique dans lequel s'inscrit l'étude. Trois thèmes principaux y sont abordés : les ganglions de la base et la dopamine, la synapse cortico-sous-thalamique, et la plasticité synaptique à court terme.

La seconde partie appelée « démarche scientifique » présente une synthèse des éléments bibliographiques justifiant notre étude, les objectifs de la thèse, les questions posées et les moyens mis en œuvre pour répondre à ces questions.

La troisième partie se concentre sur l'ensemble des techniques utilisées au cours de la thèse, tout en abordant la démarche expérimentale utilisée.

La quatrième partie regroupe l'ensemble des résultats obtenus pendant la thèse, présentés sous la forme d'un article scientifique en préparation.

La cinquième partie récapitule les différents résultats obtenus et replace ces derniers dans leur contexte scientifique. Les limitations techniques rencontrées et les perspectives ouvertes au cours de la thèse y sont également abordées.

En annexe sont présentés les articles publiés auxquels j'ai contribué, les communications que j'ai faites, ainsi que les formations que j'ai suivies.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. LES GANGLIONS DE LA BASE

1.1. Rôle des ganglions de la base

Les ganglions de la base (GB) constituent avec le thalamus les noyaux gris centraux. Ils forment un réseau de structures sous-corticales interconnectées, intégrées à des boucles cortico-thalamo-corticales et impliquées dans la motricité volontaire, mais aussi dans des aspects plus cognitifs et motivationnels du comportement moteur. Cet ensemble de structures est présent chez la plupart des Vertébrés, de la lamproie à l'Homme (Reiner et al., 1998; Stephenson-Jones et al., 2012). Cependant, si l'anatomie de base et les connexions au sein des GB sont relativement bien conservées au cours de l'évolution, on observe un renforcement des connections à l'intérieur de ce réseau, ainsi qu'un renforcement des liens avec d'autres structures cérébrales, principalement le cortex au fil du temps. Ceci témoigne de l'importance des GB chez les animaux supérieurs et notamment les Primates.

Le lien entre GB et contrôle du mouvement fut décrit pour la première fois par David Ferrier à la fin du XIX^{ème} siècle (Ferrier, 1876). Puis, dans la première partie du XX^{ème} siècle, plusieurs études montrèrent que des lésions des GB entraînaient des troubles moteurs, ce qui renforça le lien entre GB et contrôle volontaire du mouvement (initiation du mouvement et sélection de l'action principalement) (Redgrave et al., 2010). Ce n'est qu'à la fin des années 1980 que plusieurs modèles fonctionnels des GB, expliquant leur fonctionnement en conditions normales et pathologiques, furent proposés (Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990; DeLong, 1990), le modèle d'Alexander et Crutcher étant le plus utilisé.

Même si le contrôle de la motricité volontaire et les pathologies qui y sont associées (maladies de Parkinson et de Huntington principalement) restent les aspects les plus étudiés des GB, il est actuellement admis que ces derniers sont également impliqués dans des aspects plus cognitifs et motivationnels du comportement moteur (Haber, 2003). En effet, ils jouent un rôle dans l'apprentissage et la formation des habitudes (Graybiel, 1998; Jog et al., 1999; Yin and Knowlton, 2006; Graybiel, 2008; Redgrave et al., 2010) et l'apprentissage d'un comportement en fonction d'une récompense (Redgrave et al., 2011). Chez l'Homme, il a été montré que les GB sont aussi impliqués dans des tâches cognitives complexes telles que la mémoire procédurale (Knowlton et al., 1996; Packard and Knowlton, 2002), l'attention

(Teicher et al., 2000; Ravizza and Ivry, 2001), la perception (Brown et al., 1997), le langage (Ullman et al., 1997; Teichmann et al., 2006; Prat et al., 2007) ou encore la mesure du temps (Coull et al., 2004; Meck et al., 2008).

L'implication des GB dans des pathologies telles que le syndrome de Gilles de la Tourette (Temel and Visser-Vandewalle, 2004) et les troubles obsessionnels compulsifs (Mallet et al., 2008) suggèrent que ces derniers seraient également impliqués dans des tâches d'ordre limbique. Récemment, des enregistrements du striatum ont montré son implication dans un modèle de troubles obsessionnels compulsifs chez l'animal et l'inhibition par optogénétique du striatum a été utilisée avec succès pour diminuer les actions répétées (Burguiere et al., 2013). De même, le développement d'une hypomanie et une augmentation de l'impulsivité a été observée chez des patients Parkinsoniens en réponse à la stimulation du noyau sous-thalamique, un noyau appartenant aux GB (Frank et al., 2007; Mallet et al., 2007).

Bien sûr, ces différentes fonctions ne sont pas totalement indépendantes. Les GB sont maintenant considérés comme ayant la capacité d'intégrer divers paramètres (environnement sensoriel, états émotionnel et surtout motivationnel) provenant des différentes aires corticales et du thalamus, principalement. Ceci leur permet de sélectionner un patron d'actes moteurs pour former une réponse comportementale adaptée, la sélection de l'action entraînant une réponse comportementale dirigée vers un but. Si la réponse comportementale est adaptée au contexte (obtention d'une récompense par exemple), ce comportement sera répété dans une situation similaire. Au fil des répétitions, l'enchaînement des actes moteurs formant la réponse comportementale est alors mémorisé jusqu'à devenir parfaitement fluide (apprentissage procédural), puis ce comportement devient une habitude. A ce niveau d'apprentissage, le comportement n'est plus dirigé vers le but ayant initialement induit la réponse comportementale, mais est uniquement lié au contexte. Les GB sont également capables de s'adapter : si le comportement devient inadapté (absence de récompense par exemple), une nouvelle stratégie comportementale sera mise en place.

1.2. Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base

Les structures appartenant aux GB sont : le striatum (noyau caudé et putamen chez le primate), le globus pallidus externe (GPe) ou globus pallidus (GP) chez le rongeur, le globus pallidus interne (GPi) ou noyau entopédonculaire (NEP) chez le rongeur, le noyau sous-thalamique (NST), la substance noire réticulée (SNr) et la substance noire compacte (SNc)

(figure 1). Ces structures forment un réseau recevant de multiples afférences glutamatergiques provenant des différentes aires du cortex (Bolam et al., 2000; Gerfen et al., 2002) et du thalamus (Smith et al., 2004; Doig et al., 2010). Après avoir transité par les GB, le message cortical est envoyé au thalamus, qui retourne l'information préalablement traitée par les GB au cortex. On parle alors de boucle cortico-sous-cortico-corticale. Pour les premiers modèles d'organisation anatomo-fonctionnelle des GB, le striatum est la structure d'entrée des informations corticales et le GPi et la SNr, les noyaux de sortie du réseau vers le thalamus (Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990). Au repos, en l'absence de message provenant du cortex, le GPi et la SNr étant des structures GABAergiques (inhibitrices) constitutivement actives, les GB inhibent le thalamus, ce qui bloque le retour de l'information vers le cortex (Chevalier and Deniau, 1990). Ainsi, sans influence extérieure, aucun transfert d'information n'est réalisé. De plus, toutes les structures des GB excepté le striatum ont une activité spontanée, ce qui laisse au striatum la possibilité d'exercer un contrôle de type bidirectionnel sur l'activité des noyaux de sortie des GB.

D'après le modèle classique des GB, lorsque le cortex envoie un message au striatum, deux voies sont impliquées : la voie directe et la voie indirecte. Cette dichotomie repose sur l'existence, dans le striatum, de deux sous-populations de neurones de projection GABAergiques, appelés neurones épineux moyens (NEM). La sous-population de NEM qui donne naissance à la voie directe exprime majoritairement les récepteurs dopaminergiques de la famille D1 et projette directement sur les noyaux de sortie des GB. La seconde, qui est à l'origine de la voie indirecte, exprime majoritairement les récepteurs dopaminergiques de la famille D2 et projette majoritairement sur le GPe, une autre structure GABAergique projetant massivement sur le NST (Gerfen et al., 1990; Surmeier et al., 1996). Lorsque le cortex envoie un message au striatum, les deux sous-populations de NEM sont activées : l'activation de la voie directe par le cortex stimule le striatum qui inhibe alors les noyaux de sortie des GB, ce qui lève le contrôle inhibiteur exercé par ces derniers sur le thalamus et facilite ainsi le passage de l'information vers le cortex, et donc faciliterait le mouvement. A l'inverse, l'activation de la voie indirecte active le striatum qui inhibe cette fois le GPe, levant l'inhibition du GPe sur le NST. Le NST, seul noyau glutamatergique (excitateur) des GB va ainsi stimuler les noyaux de sortie, ce qui inhibe le thalamus et bloque le passage de l'information vers le cortex, entraînant cette fois une inhibition du mouvement. C'est l'équilibre entre ces deux voies qui confère aux GB leur rôle de filtre de l'information

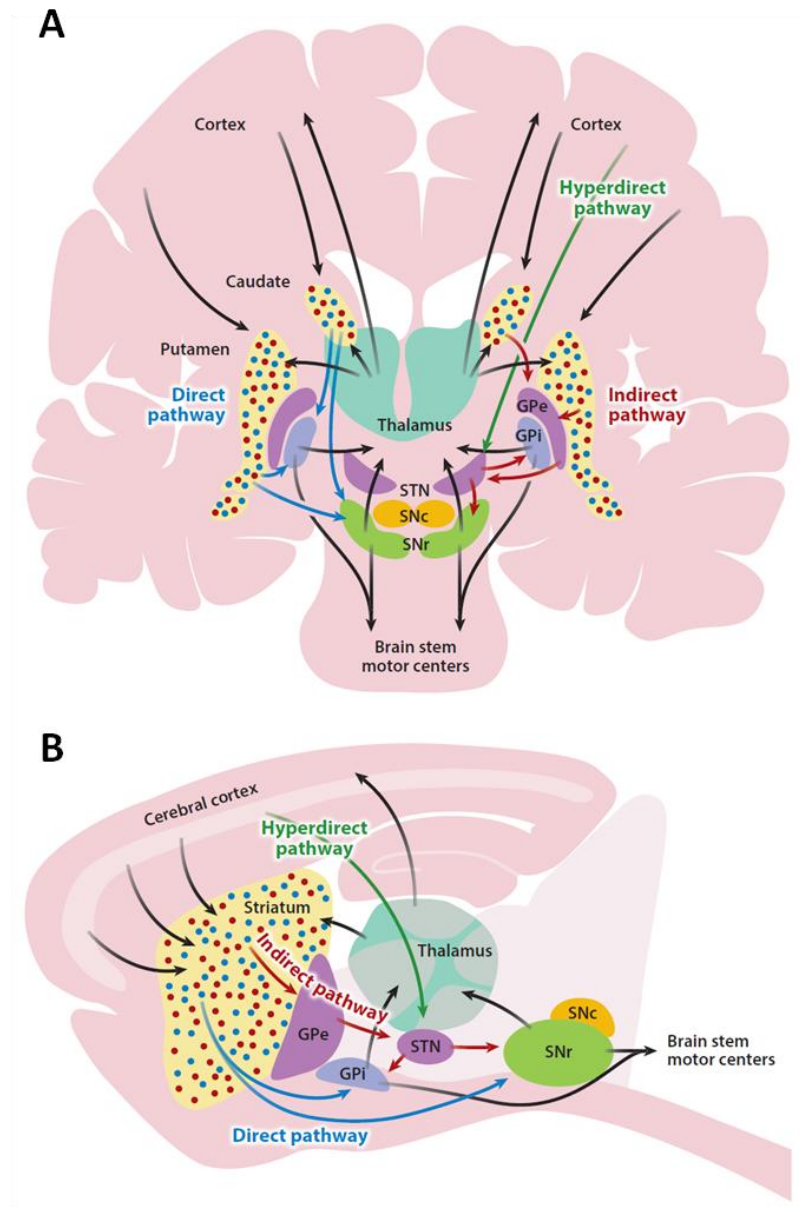


Figure 1 : L'anatomie des ganglions de la base et leurs principales connexions.

A : Schéma simplifié représentant les trois voies principales des ganglions de la base chez le primate (coupe coronale). **B** : Schéma simplifié représentant les trois voies principales des ganglions de la base chez le rongeur (coupe sagittale). En rouge : connexions faisant partie de la voie indirecte. En bleu : connexions faisant partie de la voie directe. En vert : connexions faisant partie de la voie hyperdirecte. En noir : connexions communes à plusieurs voies. GPe = globus pallidus externe (globus pallidus chez le rongeur) ; GPi = globus pallidus interne (noyau entopédonculaire chez le rongeur) ; STN = noyau-sous-thalamique ; SNr = substance noire réticulée ; SNc = substance noire compacte. D'après Nelson and Kreitzer 2014 (Nelson and Kreitzer, 2014).

corticale afin d'initier le mouvement (**figure 2**). Ce modèle a été l'objet de nombreux tests expérimentaux. Récemment, il a reçu une confirmation partielle. En effet, la stimulation sélective des NEM striataux D1-positifs à l'aide de la channelrhodopsine de type 2 (ChR2) chez la souris normale dans une enceinte ouverte entraîne une initiation des déplacements plus fréquente et un temps passé en ambulation plus long, ainsi qu'une baisse de la fréquence des épisodes sans mouvement, tandis que la stimulation des NEM D2-positifs a une action opposée (Kravitz et al., 2010). Cependant, *in vivo*, les voies directe et indirecte sont conjointement activées lors d'un acte moteur, infirmant l'idée d'une activation séquentielle des deux voies (Cui et al., 2013; Surmeier, 2013).

Le modèle proposé par Alexander et DeLong en 1990 (Alexander et al., 1990) propose d'étendre le modèle d'Alexander et Crutcher à d'autres fonctions : d'après ce modèle, il existerait cinq boucles cortico-sous-cortico-corticales fonctionnant en parallèle, chacune étant responsable d'une fonction précise : une boucle motrice et une boucle oculomotrice impliquées dans l'initiation et le contrôle du mouvement, deux boucles associatives impliquées dans les processus cognitifs et une boucle limbique impliquée dans le contrôle émotionnel (**figure 3**).

D'autres modèles présentent une vision plus intégrée du fonctionnement des GB : par exemple, le « modèle des trois territoires » propose que chaque structure des GB serait composée de territoires fonctionnels distincts (sensorimoteur, associatif et limbique) qui se recouvrent partiellement (Parent, 1990). Dans le modèle décrit plus tard par Haber (modèle des connexions en spirale), les différentes boucles fonctionnelles interagissent entre elles par le biais, entre autres, de projections du territoire fonctionnel striatal d'une boucle sur le territoire fonctionnel de la SNc d'une autre boucle (Haber et al., 2000) (**figure 4**). Ces deux modèles permettent d'expliquer comment les GB intègrent les informations provenant de différents cortex.

Même s'ils sont communément admis, les modèles originels ne tiennent pas compte d'une troisième voie dans leur explication du fonctionnement des GB : la voie hyperdirecte. Celle-ci projette directement du cortex sur le NST, qui une fois activé, va stimuler les noyaux de sortie des GB. Ainsi, l'activation de cette voie entraîne une inhibition généralisée du réseau (**figure 2**).

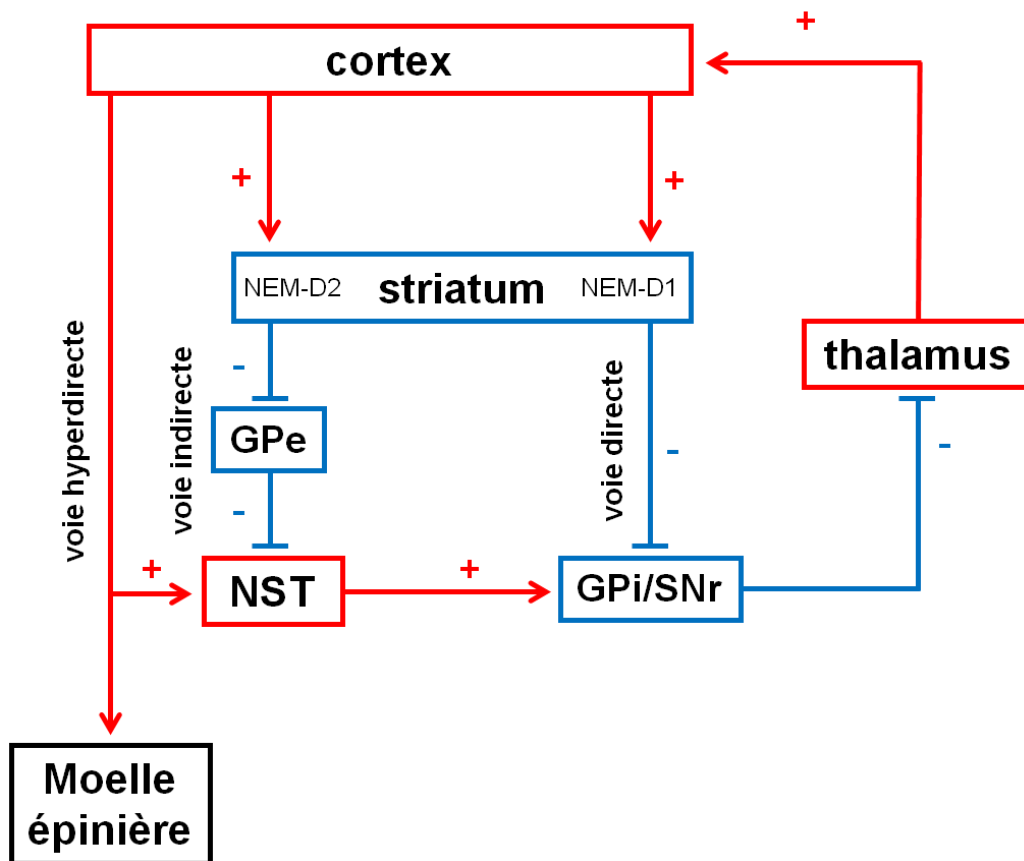


Figure 2 : Modèle classique de l'anatomie fonctionnelle des ganglions de la base présentant les trois voies principales.

La stimulation du striatum par le cortex peut avoir deux effets opposés : l'activation de la voie indirecte qui inhibe le thalamus et le mouvement et/ou l'activation de la voie directe qui stimule le thalamus et favorise le mouvement. Le cortex stimule également le noyau sous-thalamique par la voie hyperdirecte, ce qui conduit à l'inhibition du thalamus et donc du mouvement. Le bleu correspond à des structures GABAergiques et le rouge à des structures glutamatergiques. GPe = globus pallidus externe (globus pallidus chez le rongeur) ; GPi = globus pallidus interne (noyau entopédonculaire chez le rongeur) ; NST = noyau-sous-thalamique ; SNr = substance noire réticulée ; NEM-D1 = neurones épineux moyens D1 exprimant le récepteur D1 ; NEM-D2 = neurones épineux moyens exprimant le récepteur D2.

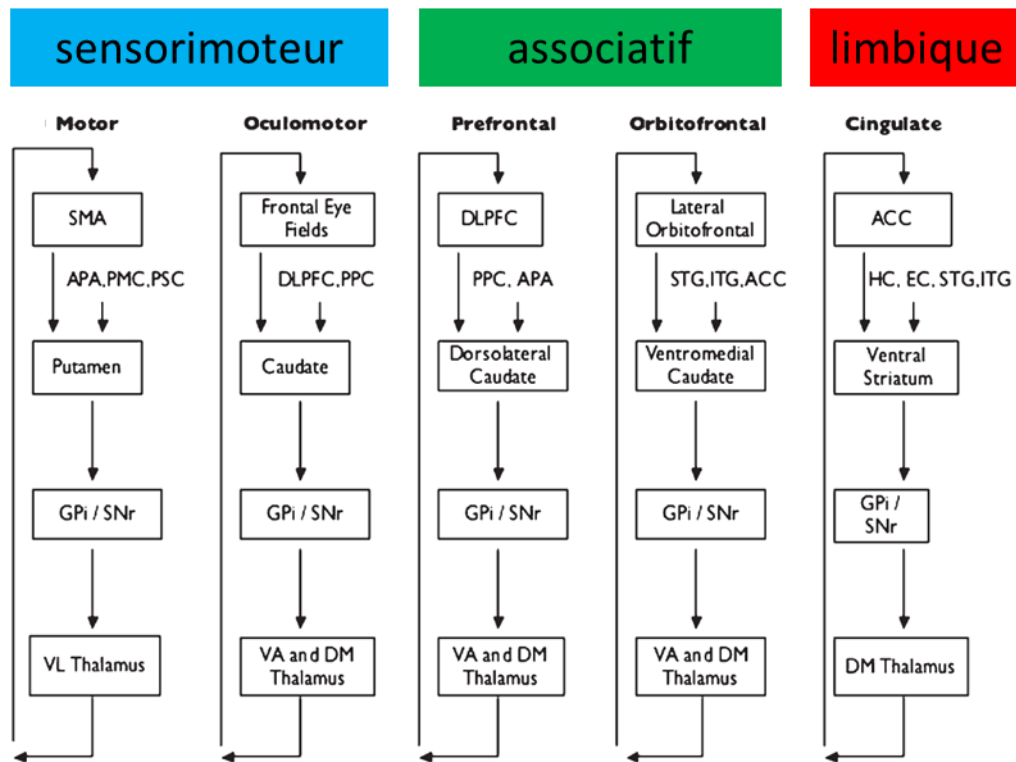


Figure 3 : Modèle des cinq boucles parallèles proposé par Alexander et Delong.

APA = aire prémotrice arquée ; PMC = cortex moteur primaire ; PSC = cortex somato-sensoriel primaire ; PPC = cortex pariétal postérieur ; STG = gyrus temporal supérieur ; ITG = gyrus temporal inférieur ; HC = hippocampe ; EC = cortex entorhinal ; GPi = globus pallidus interne ; SNr = substance noire réticulée ; VL = noyau ventro-latéral du thalamus ; VA = noyau ventro-antérieur du thalamus ; DM = noyau dorso-médial du thalamus ; VLPFC = cortex préfrontal ventrolatéral ; BLA = amygdale baso-latérale. D'après Alexander and Delong 1990 (Alexander et al., 1990).

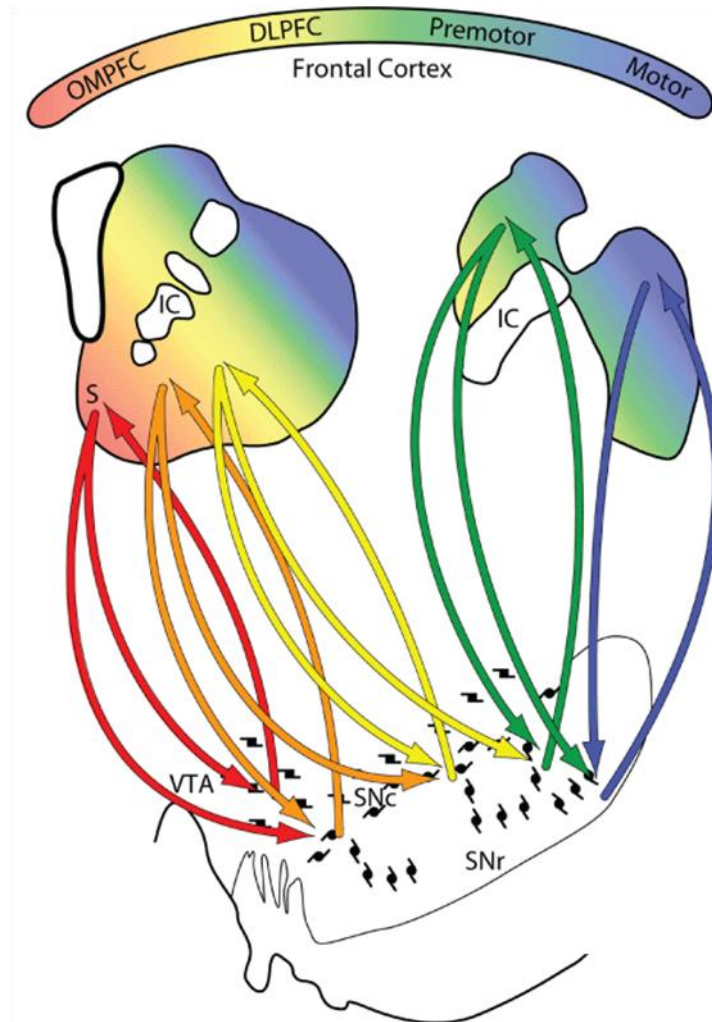


Figure 4 : Exemple de modèle d'interaction des différentes boucles fonctionnelles des ganglions de la base : le modèle des connexions en spirale.

L'échelle de couleurs représente les différents territoires fonctionnels du cortex et du striatum. Rouge = limbique ; vert = associatif ; bleu = moteur. D'après ce modèle, l'interaction entre les différentes boucles fonctionnelles des ganglions de la base se fait grâce aux projections du territoire fonctionnel striatal d'une boucle sur le territoire fonctionnel de la VTA (aire tegmentale ventrale), de la SNc (substance noire compacte) ou de la SNr (substance noire réticulée) d'une autre boucle. L'influence de ces trois structures sur le striatum se fait alors sur un territoire fonctionnel différent de celui d'origine. OMPFC = aires orbitales et médiales du cortex préfrontal ; DLPFC = cortex préfrontal dorso-latéral ; IC = capsule interne ; S = shell du noyau accumbens. D'après Haber 2000 (Haber et al., 2000).

Deux modèles ont proposé d'intégrer cette voie dans le fonctionnement des GB. Le modèle de Mink (Mink, 1996) propose une activation conjointe des voies hyperdirecte et directe par le cortex. D'après ce modèle, chaque voie exercerait son contrôle sur des territoires distincts des noyaux de sortie des GB, ce qui permettrait à la voie directe d'activer les programmes moteurs désirés et à la voie hyperdirecte de bloquer les programmes moteurs non désirés (**figure 5**). Le modèle de Nambu (Nambu et al., 2002) ajoute une dimension temporelle à celui de Mink en proposant une activation séquentielle des trois voies : en réponse à l'activation du cortex, la voie hyperdirecte inhiberait de larges zones thalamiques et corticales correspondant aussi bien aux programmes moteurs désirés qu'aux programmes moteurs compétiteurs. Ensuite, la voie directe lèverait l'inhibition imposée par la voie hyperdirecte sur une population précise de neurones des noyaux de sortie des GB pour permettre l'initiation et la réalisation du programme moteur désiré uniquement. Enfin, l'activation de la voie indirecte entraînerait une inhibition globale du système pour terminer l'action.

D'après ces deux modèles, la voie hyperdirecte serait donc principalement impliquée dans l'augmentation du rapport signal/bruit au niveau des noyaux de sortie des GB pour permettre une meilleure sélection de l'action et une inhibition accrue des actions concurrentes.

1.3. Dopamine et ganglions de la base

1.3.1 Présentation du système dopaminergique

La dopamine est un neuromodulateur appartenant à la famille des catécholamines. Elle est principalement produite au niveau des neurones dopaminergiques de la SNc et de l'aire tegmentale ventrale (ATV). Dans ces neurones, la tyrosine est transformée par la tyrosine hydroxylase (TH) en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), elle-même transformée en dopamine par la décarboxylase des acides aminés. Après stockage dans des vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT), la dopamine est libérée dans l'espace extracellulaire (Elsworth and Roth, 1997). La dopamine peut alors agir via ses récepteurs spécifiques au niveau des neurones ou des fibres post-synaptiques (**figure 6**). Les récepteurs dopaminergiques font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il en existe 5 types, classés en deux familles, principalement selon leur action sur l'adénylate

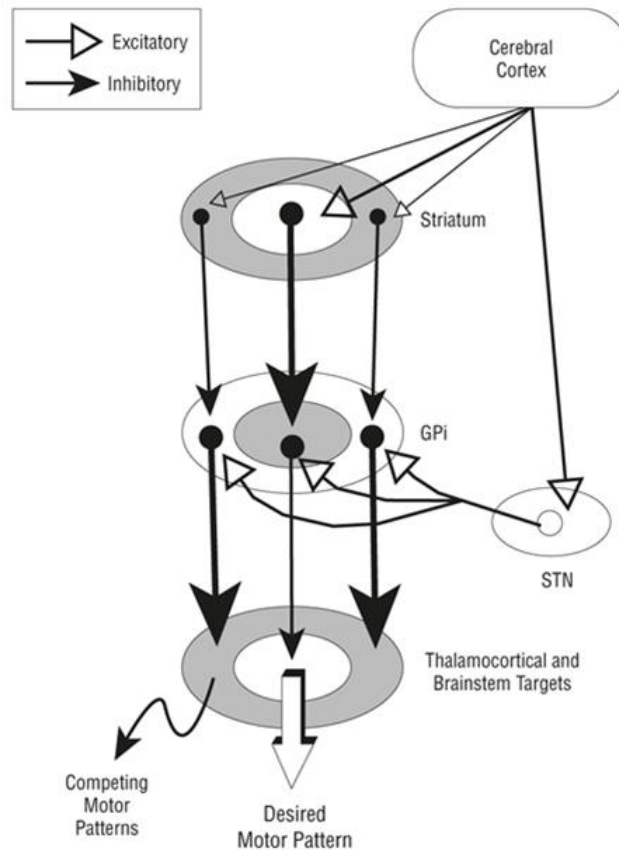


Figure 5 : Modèle de sélection de l'action au sein des ganglions de la base proposé par Mink.

D'après ce modèle, l'activation simultanée des voies hyperdirecte et directe entraîne l'inhibition des territoires du thalamus responsables des programmes moteurs indésirables, tout en favorisant l'activation des territoires responsables des programmes moteurs désirés. STN = noyau sous-thalamique ; GPi = globus pallidus interne. D'après Mink 2003 (Mink, 2003).

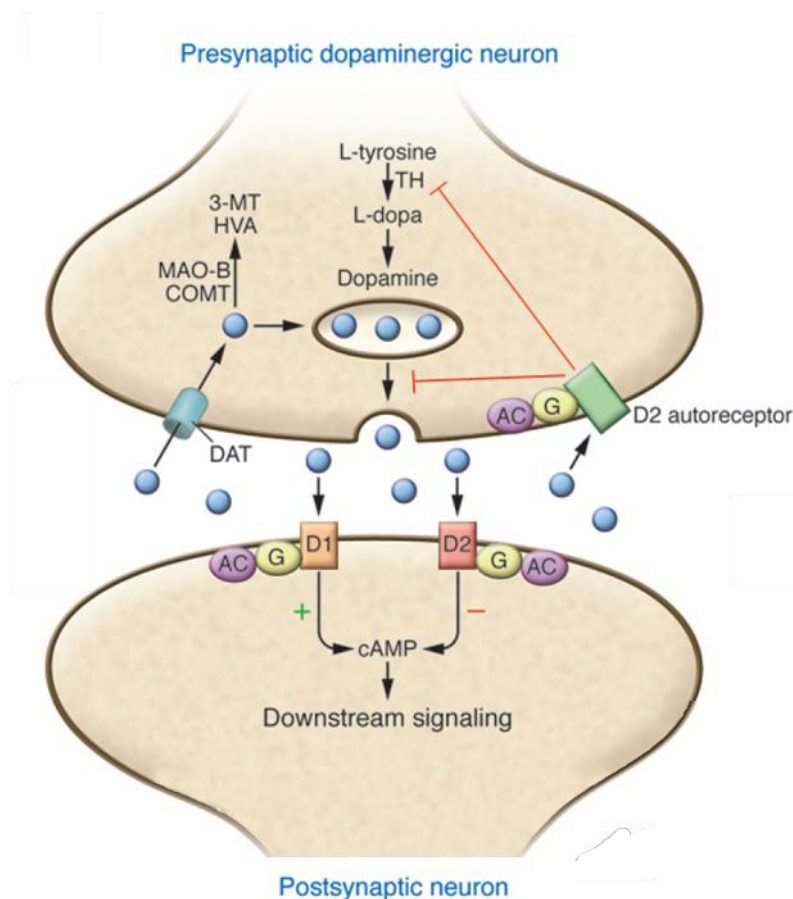


Figure 6 : Schéma simplifié du fonctionnement d'une synapse dopaminergique.

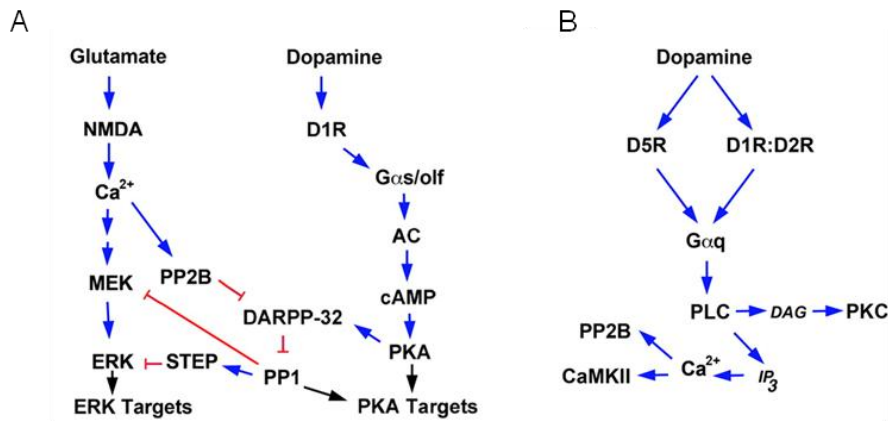
Au niveau pré-synaptique, la tyrosine est transformée par la tyrosine hydroxylase (TH) en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), elle-même transformée en dopamine par la décarboxylase des acides aminés. Après stockage dans des vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT), la dopamine est libérée dans l'espace extracellulaire où elle peut activer ses récepteurs post-synaptiques D1 et D2 ou pré-synaptiques D2. La dopamine est dégradée directement au niveau de la fente synaptique ou après recapture neuronale et astrocytaire par le transporteur de la dopamine (DAT). Deux enzymes entrent en jeu : la monoamine oxydase (MAO) et la cathécol-O-méthyltransférase (COMT). Les flèches rouges en T représentent une inhibition. TH = tyrosine hydroxylase ; AC = adénylate cyclase ; G = protéine G ; D1 = récepteur de la famille D1 ; D2 = récepteur de la famille D2 ; cAMP = adénosine monophosphate cyclique ; DAT = transporteur de la dopamine ; MAO-B = monoamine oxydase B ; COMT = catéchol-O-méthyltransférase ; 3-MT = 3-méthoxytyramine ; HVA = acide homovanillique ; L-DOPA = L-3,4-dihydroxyphénylalanine. D'après Blackstone 2009 (Blackstone, 2009).

cyclase (AC) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011) (**figure 7**) :

- la famille D1 comprenant les récepteurs D1 et D5. Les récepteurs de cette famille sont couplés positivement avec l'AC et stimulent la protéine kinase A (PKA). Ils exercent majoritairement leurs effets via les protéines G de la famille $G\alpha_{s/olf}$ (Neve et al., 2004). Il a cependant été rapporté que le récepteur D5 pourrait, dans certains cas, stimuler la phospholipase C (PLC), ce qui entraîne la stimulation de la protéine kinase C (PKC) et l'augmentation des taux de calcium intracellulaire. Dans ce cas, il est couplé à des protéines G de la famille $G\alpha_q$ (Friedman et al., 1997; So et al., 2009; Varela et al., 2009). Cette famille de récepteurs est exclusivement exprimée par les éléments post-synaptiques des synapses dopaminergiques. Le récepteur D5 présente une particularité par rapport aux autres récepteurs dopaminergiques. En effet, il est caractérisé par une activité intrinsèque constitutive qui lui permet d'activer les voies intracellulaires de manière significative sans qu'il soit stimulé par la dopamine (Tiberi and Caron, 1994; Demchyshyn et al., 2000). De plus, l'affinité du récepteur D5 pour la dopamine est 10 fois plus élevée que celle du récepteur D1 (Tiberi et al., 1991; Missale et al., 1998), ce qui le rend plus sensible aux faibles niveaux toniques de dopamine.
- la famille D2 comprenant les récepteurs D2, D3 et D4. Ces récepteurs sont couplés négativement avec l'AC. Ils exercent majoritairement leurs effets *via* les protéines G de la famille $G\alpha_{i/o}$ (Neve et al., 2004). Les récepteurs de cette famille peuvent être exprimés sur le neurone post-synaptique et/ou ses afférences (éléments post-synaptiques des synapses dopaminergiques), mais aussi sur les terminaisons dopaminergiques elles-mêmes (éléments pré-synaptiques des synapses dopaminergiques) où ils exercent un rétrocontrôle négatif sur la libération et la synthèse de dopamine. Ils sont alors considérés comme des autorécepteurs.

La dopamine peut être dégradée directement au niveau de la fente synaptique ou après recapture neuronale et astrocytaire par le transporteur de la dopamine (DAT). Deux enzymes entrent alors en jeu : la monoamine oxydase (MAO) et la cathécol-O-méthyltransférase (COMT). Une fois recaptée par le neurone pré-synaptique, la dopamine peut également être recyclée dans des vésicules synaptiques et être à nouveau libérée (**figure 6**).

Récepteurs de la famille D1



Récepteurs de la famille D2

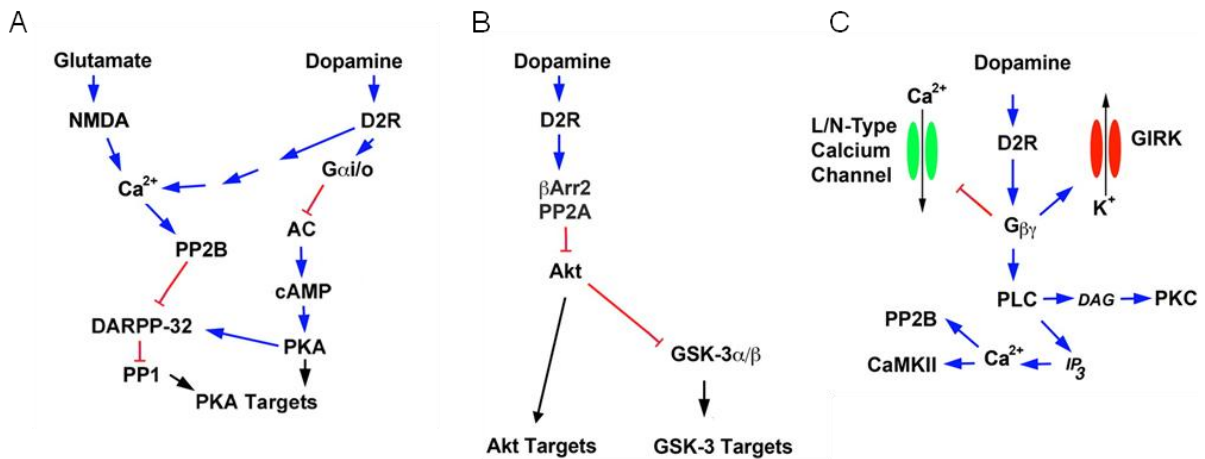


Figure 7 : Détail des principales voies de transduction des récepteurs dopaminergiques et leurs interactions avec la voie de signalisation du récepteur NMDA.

En haut : Voies de signalisation des récepteurs de la famille D1. **A.** Régulation de la voie de l'adénylate cyclase (AC) par les récepteurs de la famille D1 ; **B.** Régulation de la voie de la phospholipase C (PLC) par le récepteur D5 ou les hétéromères D1 :D2. En bas : Voies de signalisation des récepteurs de la famille D2. **A.** Régulation de la voie de l'AC par les récepteurs de la famille D2 ; **B.** Régulation de la voie β-arrestin 2/Akt/ GSK-3 par les récepteurs D2 et D3 ; **C.** Régulation de la voie des protéines Gβγ par les récepteurs de la famille D2. Les flèches bleues indiquent une activation, les flèches en T rouges indiquent une inhibition et les flèches noires indiquent une interaction pouvant être activatrice ou inhibitrice selon le substrat. D'après Beaulieu and Gainetdinov, 2011 (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

1.3.2 Projections dopaminergiques au sein des GB

La dopamine, présente en grande quantité dans le striatum, provient majoritairement de la SNc et de l'ATV, ce qui forme la voie nigro-striatale (Smith and Kieval, 2000). Selon le territoire fonctionnel innervé, les projections de la voie nigro-striatale proviennent de zones différentes. En effet, chez le singe, les territoires sensori-moteur et associatif du striatum reçoivent des fibres provenant de la zone ventrale de la SNc, alors que le territoire limbique reçoit des fibres provenant de l'ATV et de la SNc dorsale (Haber and Fudge, 1997). Dans le striatum, ces fibres sont fines et comportent un grand nombre de varicosités, ce qui permet à chaque fibre d'innover de grandes portions de striatum.

Même si le striatum reçoit la majorité des afférences dopaminergiques projetant sur les GB, les autres structures reçoivent, elles aussi, une innervation dopaminergique. En effet, des études ont mis en évidence de faibles taux de dopamine et/ou une expression du DAT dans le GPe et le GPi (Pifl et al., 1990; Ciliax et al., 1999), le NST (Coulter et al., 1995; Cragg et al., 2004) et la SNr (Korf et al., 1976; Nirenberg et al., 1996; Ciliax et al., 1999). Les fibres dopaminergiques innervant ces structures proviennent majoritairement de la SNc. Si une grande partie des fibres projetant sur le NST sont des collatérales de la voie nigro-striatale, il existerait cependant des projections nigro-NST directes (Rommelfanger and Wichmann, 2010). De même, plusieurs études suggèrent que les fibres nigro-pallidales et nigro-striatales proviendraient de populations neuronales distinctes de la SNc (Rommelfanger and Wichmann, 2010). Au niveau de la SNr, la dopamine proviendrait directement des neurones de la SNc voisine par un phénomène de libération dendritique (Korf et al., 1976). En effet, du fait de la proximité de ces deux structures, les neurones de la SNc pourraient fournir de la dopamine à la SNr sur plusieurs centaines de microns (Hausser et al., 1995). Cependant, le processus selon lequel ce type de libération est réalisé reste actuellement en débat.

1.3.3 Effets de la dopamine sur les neurones épineux moyens

Si les cinq récepteurs dopaminergiques sont exprimés au niveau des NEM dans le striatum, les récepteurs D1 et D2 sont de loin les plus représentés (Surmeier et al., 1996). Ces deux récepteurs sont exprimés sur différents types de NEM : les récepteurs D1 sont présents sur les NEM de la voie directe qui expriment également la substance P et la dynorphine alors que les récepteurs D2 sont exprimés sur les NEM de la voie indirecte qui expriment, eux,

l'enképhaline (Gerfen et al., 1990; Surmeier et al., 1996). Les NEM sont capables d'exprimer deux types d'états. Au repos, les NEM sont dans un état « inactivé » (en anglais, down state) au cours duquel les canaux potassiques Kir2 maintiennent les neurones à un potentiel de membrane très négatif (-90mV environ), empêchant ainsi toute activité de décharge. Lorsque l'activation corticale est suffisante, les NEM passent dans l'état « activé » (en anglais, up state), caractérisé par un potentiel de membrane plus dépolarisé et donc plus proche du seuil de déclenchement des potentiels d'action pendant quelques centaines de millisecondes. C'est pendant cette courte période que les NEM sont capables de déclencher des potentiels d'action en réponse à des stimulations corticales ou thalamiques (Wilson and Kawaguchi, 1996). Les récepteurs D1 facilitent le passage de l'état « inactivé » à l'état « activé » et augmentent la survenue des potentiels d'action dans les NEM de la voie directe alors que les récepteurs D2 exercent l'effet inverse sur les NEM de la voie indirecte (Surmeier et al., 2007). Ces effets passeraient par une modulation des canaux calciques Cav1 (type L) et Cav2, des canaux sodiques Nav1, de la libération de glutamate ou encore des récepteurs AMPA et NMDA.

Ainsi, d'après les premiers modèles de fonctionnement des GB, la libération de dopamine au niveau du striatum exerce deux effets opposés selon la voie : elle favorise l'activation de la voie directe et réduit l'activation de la voie indirecte lorsque le cortex active le striatum. Le mouvement peut alors être initié correctement (Chevalier and Deniau, 1990) (**figure 8**). De plus, des travaux postérieurs ont mis en évidence une implication de la dopamine dans les phénomènes de plasticité à long terme des synapses cortico-striatales (Calabresi et al., 1992; Calabresi et al., 2007; Surmeier et al., 2007; Shen et al., 2008). Etant donné l'implication de la plasticité à long terme dans les processus de mémorisation, la dopamine aurait donc la capacité de modifier durablement l'équilibre voie directe / voie indirecte au niveau du striatum.

La dopamine serait libérée de deux manières différentes au niveau des GB : une libération tonique contribuant à maintenir un niveau basal de dopamine qui serait nécessaire au bon fonctionnement des GB et permissif pour le mouvement et une libération phasique liée au caractère récompensant ou aversif d'un événement (Schultz, 1998). Ainsi, les mécanismes présentés dans ce paragraphe pourraient être à l'origine des processus de sélection de l'action et de mémorisation des comportements moteurs en fonction du contexte (Di Filippo et al., 2009; Gerfen and Surmeier, 2011).

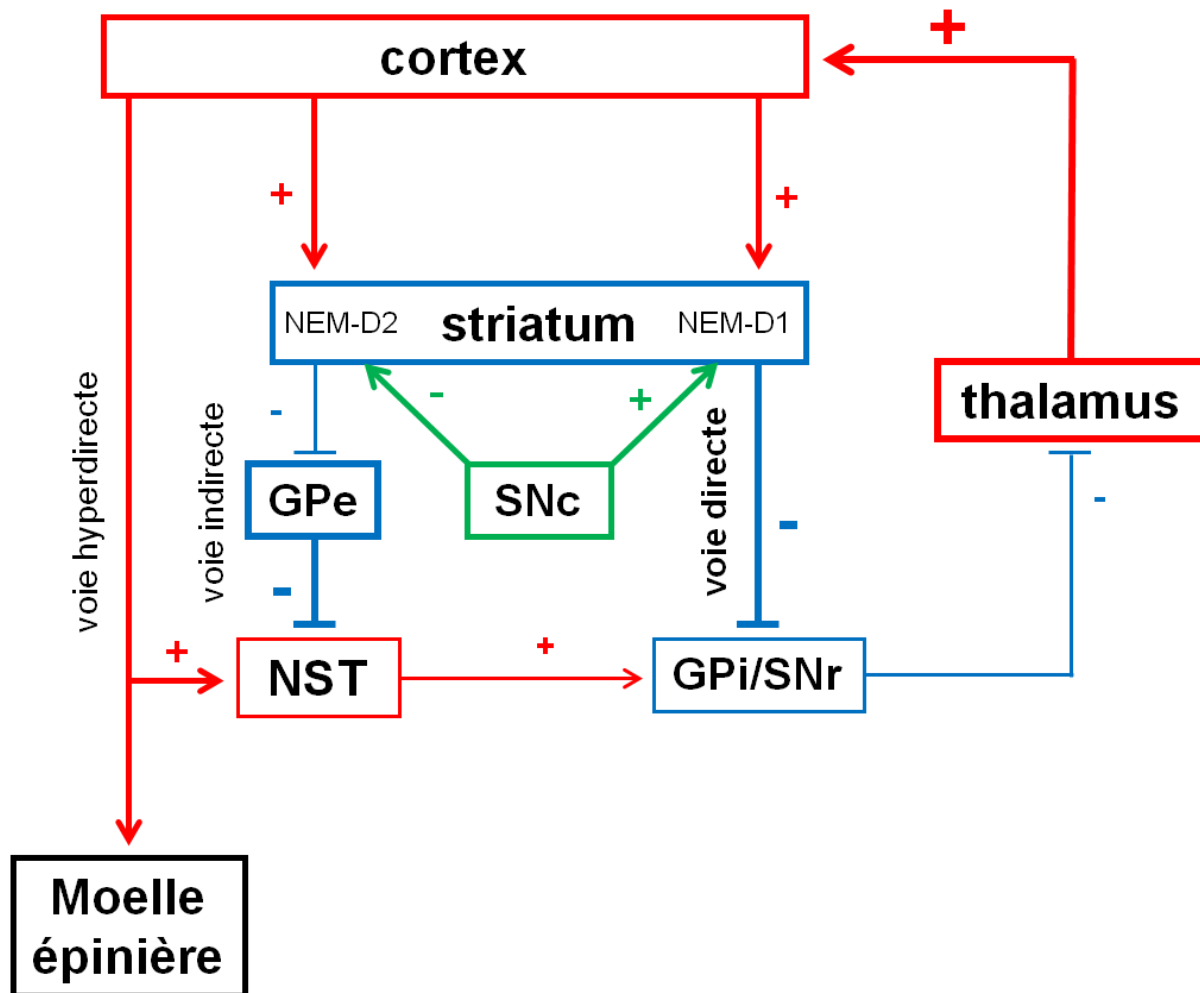


Figure 8 : Modèle classique de l'anatomie fonctionnelle des ganglions de la base intégrant les effets de la dopamine sur les voies directes et indirectes.

La dopamine exerce deux effets opposés sur les neurones épineux moyens (NEM) du striatum : elle favorise l'activation des NEM à l'origine de la voie directe et réduit l'activation des NEM à l'origine de la voie indirecte, ce qui se traduit globalement par une favorisation de l'activation du thalamus et donc du mouvement. Le bleu correspond à des structures GABAergiques, le rouge à des structures glutamatergiques et le vert à des structures dopaminergiques. GPe = globus pallidus externe (globus pallidus chez le rongeur) ; GPi = globus pallidus interne (noyau entopédonculaire chez le rongeur) ; NST = noyau-sous-thalamique ; SNr = substance noire réticulée ; SNc = substance noire compacte ; NEM-D1 = neurones épineux moyens D1-positifs ; NEM-D2 = neurones épineux moyens D2-positifs.

1.4. La maladie de Parkinson, une pathologie des GB

1.4.1 Présentation de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique d'évolution progressive affectant environ une personne sur 700 en France. Le risque de développer cette pathologie augmente considérablement avec l'âge, la prévalence de la maladie étant multipliée par 10 après 65 ans (Tison et al., 1994). C'est principalement une maladie idiopathique.

Cette pathologie est principalement caractérisée par une triade de symptômes moteurs : la rigidité musculaire, l'akinésie (perte de la capacité d'initier un mouvement) et le tremblement de repos (Obeso et al., 2000). Ces symptômes seraient principalement la conséquence d'une dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée, même si les voies méso-limbique et méso-corticale sont également touchées. De plus, certaines voies cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques seraient également affectées (Lang and Lozano, 1998). A cause de la mise en place de mécanismes de compensation, les symptômes moteurs de la maladie n'apparaissent que lorsque plus de 50 % des neurones dopaminergiques de la SNc ont disparu (Damier et al., 1999) (**figure 9**). De nos jours, les mécanismes impliqués dans la dégénérescence des neurones de la SNc restent encore mal connus. De même, si des causes environnementales et génétiques sont étudiées, l'étiologie de cette maladie reste encore mal connue (Beitz, 2014).

Des symptômes non moteurs ont également été décrits, tels que des perturbations olfactives, des troubles du système nerveux autonome (hypotension orthostatique, troubles gastro-intestinaux), des troubles de l'humeur, des douleurs chroniques ou encore des troubles du sommeil (Beitz, 2014). L'apparition de ces troubles semble relativement précoce par rapport aux symptômes moteurs, ce qui suscite un intérêt croissant pour ces derniers dans l'espoir d'un diagnostic plus précoce de la maladie.

1.4.2 Physiopathologie de la maladie de Parkinson

Les modèles classiques des GB relient les symptômes de la maladie de Parkinson à un déséquilibre de la balance voie directe / voie indirecte en faveur de la voie indirecte (Albin et al., 1989; Kravitz et al., 2010). Ce déséquilibre serait en partie dû à des modifications de

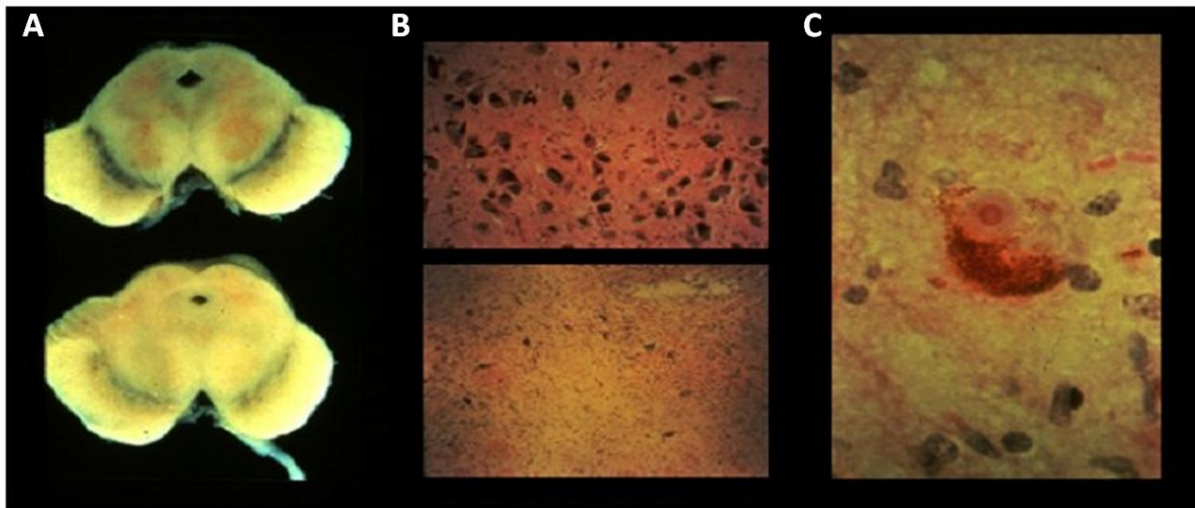


Figure 9 : Dégénérescence des neurones dopaminergiques et corps de Lewy dans la substance noire compacte d'un individu atteint de la maladie de Parkinson.

A : photographies de coupes coronales de cerveau d'un individu sain (en haut) et atteint de la maladie de Parkinson (en bas), réalisées au niveau de la substance noire compacte. On note une forte diminution du nombre de neurones dopaminergiques (bandes noires) chez l'individu Parkinsonien. **B :** images de microscopie optique montrant la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire chez le sujet parkinsonien (bas) comparé au sujet sain (haut). **C :** image de microscopie optique obtenue montrant les corps de Lewy dans les neurones de la substance noire compacte, un autre marqueur typique de la maladie de Parkinson. Images obtenues à partir du site internet : <http://accs.ens-lyon.fr/acces/ressources/neurosciences/maladies-et-traitements/parkinson/causes>. Photos Marc Savasta : INSERM Grenoble.

l'excitabilité des NEM en réponse à la diminution drastique des taux de dopamine dans le striatum. En effet, la perte de l'action inhibitrice des récepteurs D2 sur la voie indirecte provoquerait une baisse de l'activité du GPe, suivie d'une levée de l'inhibition exercée par ce dernier sur le NST qui devient alors hyperactif. En association avec la perte d'activation de la voie directe par les récepteurs D1, ces effets entraîneraient alors une hyperactivité des structures de sortie des GB et donc un blocage de l'initiation du mouvement (**figure 10**). Des travaux plus récents suggèrent une modification des phénomènes d'induction de la plasticité à long terme au niveau des synapses glutamatergiques projetant sur le striatum dans des modèles de la maladie de Parkinson. D'après ces travaux, la perte d'activité des récepteurs D1 favoriserait essentiellement l'expression de la dépression à long terme au niveau des neurones de la voie directe. A l'inverse, la perte d'activité des récepteurs D2 favoriserait l'expression d'une potentialisation à long terme au niveau des neurones de la voie indirecte (Mallet et al., 2006; Shen et al., 2008; Kravitz et al., 2010). La balance voie directe / voie indirecte serait ainsi profondément perturbée et ces modifications persisteraient dans le temps.

1.4.3 Traitements de la maladie de Parkinson

Les traitements utilisés contre la maladie de Parkinson sont uniquement symptomatiques. En effet, à l'heure actuelle, aucun traitement visant à ralentir ou stopper la dégénérescence des neurones dopaminergiques n'est disponible (Beitz, 2014).

En première intention, ce sont les approches pharmacologiques qui sont privilégiées (Gazewood et al., 2013). Parmi celles-ci, la L-DOPA, un précurseur de la dopamine (voir paragraphe 1.3.1), est la plus utilisée. La transformation de la L-DOPA en dopamine par les neurones dopaminergiques restants permet de rétablir les taux de dopamine au niveau du striatum. Malgré l'extrême efficacité de cette substance dans un premier temps (phase appelée « lune de miel »), des complications motrices apparaissent après 3 à 6 ans de traitement, puis lorsque la maladie est à un stade trop avancé, la L-DOPA perd de son efficacité. La L-DOPA ayant une durée d'utilisation limitée dans le temps, il est possible de retarder l'utilisation de cette dernière en utilisant des agonistes dopaminergiques de la famille D2. Ces substances miment les effets de la dopamine au niveau des neurones striataux de la voie indirecte et inhibent celle-ci, ce qui rééquilibre la balance voie directe / voie indirecte.

Lorsque les approches pharmacologiques atteignent leurs limites et que les patients y deviennent résistants ou développent des complications motrices, comme par exemple des

dyskinésies, une approche chirurgicale consistant à stimuler le NST à haute fréquence peut être envisagée (**figure 11**). En effet, on observe une hyperactivité du NST en condition Parkinsonienne (voir paragraphe 1.4.2). Ainsi, il a été proposé qu'une stimulation à haute fréquence du NST inhiberait ce dernier et donc permettrait de réduire l'hyperactivité des noyaux de sortie des GB pour lever leur inhibition sur le thalamus (Benazzouz et al., 1993). Il apparaît aujourd'hui que c'est en partie par un effet antidromique, régulateur, sur le cortex que la stimulation à haute fréquence du NST exerce son action bénéfique (Gradinaru et al., 2009; Li et al., 2012; Degos et al., 2013).

Même si les mécanismes exacts par lesquels la stimulation à haute fréquence du NST exerce ses effets sont toujours débattus, cette méthode de traitement s'avère très efficace puisqu'elle permet de réduire, voire de supprimer l'utilisation des traitements pharmacologiques dans certains cas (Limousin et al., 1998; Vingerhoets et al., 2002).

2. LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE

2.1. Fonction de la voie cortico-sous-thalamique

La voie hyperdirecte est une voie di-synaptique avec une synapse cortico-NST et une synapse subthalamo-nigrale (**figure 8**). La voie cortico-NST est la première partie de la voie hyperdirecte. A ce titre, c'est la deuxième voie d'entrée des informations corticales dans les GB. Même si cette voie a été décrite il y a presque 50 ans, elle a longtemps été laissée de côté pour expliquer le fonctionnement des GB. C'est dans la fin des années 1990 qu'il a été proposé pour la première fois d'intégrer cette voie dans un modèle de fonctionnement des GB (Mink, 1996) avant que ce modèle ne soit repris par Nambu quelques années plus tard (Nambu et al., 2002) (voir paragraphe 1.2 pour plus de détails sur les modèles). Dans ces deux modèles, la voie cortico-NST est impliquée dans les processus de sélection de l'action.

La place du NST dans les GB et les nombreuses afférences provenant des différentes aires corticales qu'il reçoit permettraient à la voie cortico-NST d'exercer un contrôle sur tous les programmes comportementaux transitant par les GB en mettant en place un seuil de prise de décision (Bogacz and Larsen, 2011; Cavanagh et al., 2011; Haynes and Haber, 2013).

La voie cortico-NST serait également impliquée dans des tâches cognitives comme l'attention, la persévérance et surtout l'arrêt d'une tâche en cours. En effet, des expériences de lésions bilatérales du NST chez des rats-modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson

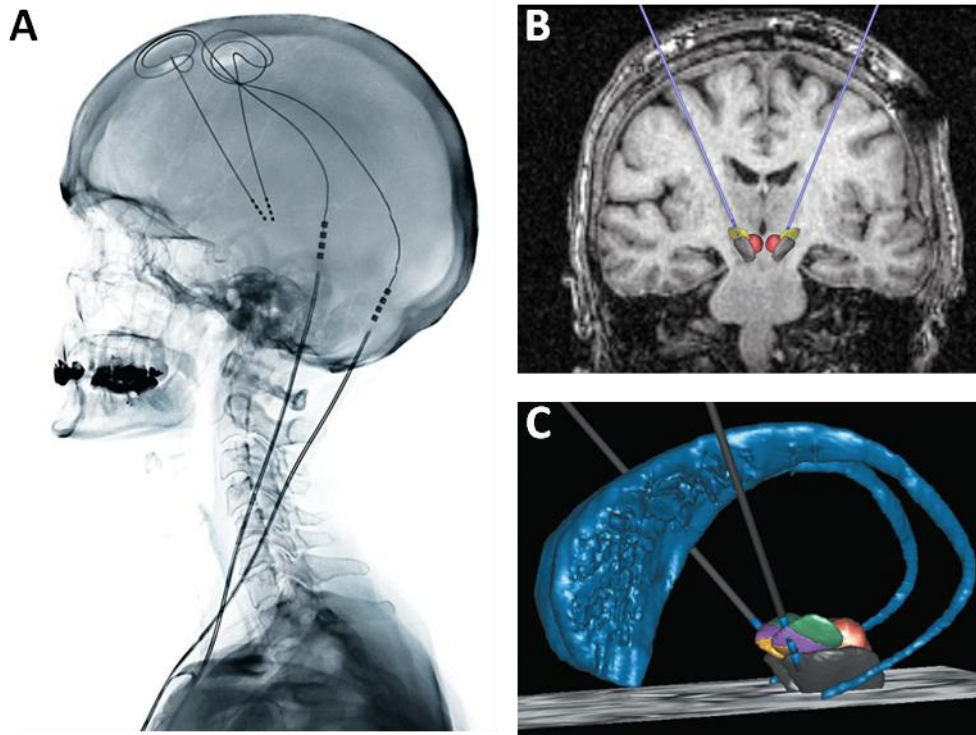


Figure 11 : La stimulation cérébrale profonde.

La stimulation cérébrale profonde nécessite l'implantation par stéréotaxie d'une électrode de stimulation dans chaque noyau sous-thalamique du patient (une électrode dans chaque hémisphère) (**B** et **C**). Les électrodes sont reliées à un stimulateur implanté au niveau de la poitrine du patient (**A**). Le NST est représenté par les couleurs jaune, violet et vert sur la modélisation en trois dimensions (**C**) et en jaune sur l'image **B**. Sources : A, site internet LesEchos.fr : http://www.lesechos.fr/10/03/2014/LesEchos/21643-045-ECH_la-stimulation-cerebrale-profonde-a-l-assaut-de-la-psychiatrie.htm ; B, site internet du Sénat : <http://www.senat.fr/rap/r11-476-1/r11-476-121.html> ; C, site internet de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) : <http://icm-institute.org/?s=stimulation+parkinson>.

ont lié pour la première fois NST et inhibition d'une réponse comportementale (Baunez et al., 1995). En effet, si la lésion du NST permettait de rétablir un temps de réaction correct lors d'un test de mesure du temps de réaction (« reaction time task » en anglais) chez les rats lésés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), ces derniers présentaient une augmentation du nombre de réponses prématurées lors de ce test. Quelques années plus tard, un lien entre voie cortico-NST, attention et persévération fut mis en évidence chez le rat (Chudasama et al., 2003). Depuis, des études d'IRM fonctionnelle et de tractographie réalisées chez l'humain ont montré que la voie cortico-NST était impliquée dans les processus d'arrêt d'une tâche motrice en cours (Aron et al., 2007; Forstmann et al., 2012). Cependant, d'autres études suggèrent que l'arrêt d'une tâche en cours impliquerait également la voie indirecte (Jahfari et al., 2011). Chez le rat, des processus complexes impliquent l'interaction de la voie cortico-NST avec les autres voies des GB (Schmidt et al., 2013). D'après cette dernière étude, l'arrêt d'une tâche en cours mettrait en jeu une « course » entre les voies hyperdirecte et directe, avec une possible implication de la voie indirecte.

Enfin, des études menées très récemment chez le rat lésé à la 6-OHDA suggèrent une implication de la voie cortico-NST dans les effets bénéfiques de la stimulation à haute fréquence du NST sur les symptômes parkinsoniens (Li et al., 2012; Degos et al., 2013). D'après ces études, la génération de potentiels d'action antidromiques dans les fibres cortico-NST serait à l'origine de la régularisation des patrons de décharge et des propriétés électriques des neurones corticaux, ce qui entraînerait une amélioration des symptômes moteurs induits par la lésion. De plus, la stimulation à haute fréquence du cortex chez le singe MPTP, un modèle expérimental de la maladie de Parkinson chez le primate, entraîne une amélioration des symptômes parkinsoniens (Drouot et al., 2004). Ceci va dans le sens d'une implication de la régularisation de l'activité corticale dans les effets bénéfiques de la stimulation à haute fréquence du NST.

2.2. Anatomie fonctionnelle de la voie cortico-sous-thalamique

2.2.1 Les projections corticales

Les fibres de la voie cortico-NST proviennent en partie des aires motrices du cortex frontal. A ce titre, on retrouve des projections provenant du cortex moteur primaire, de l'aire motrice supplémentaire, du cortex moteur cingulaire et des parties ventrale et dorsale du

cortex prémoteur (Nambu et al., 2002; Mathai and Smith, 2011). Une étude utilisant des méthodes de traçage antérograde chez le singe montre que la majeure partie des aires corticales préfrontales impliquées dans des fonctions cognitives ou limbiques projettent également sur le NST (Haynes and Haber, 2013). Ainsi, des structures telles que le cortex cingulaire dorsal antérieur, le cortex orbitofrontal, le cortex préfrontal ventromédial et dorsal projettent également sur le NST. Ces résultats ont également été trouvés chez l'humain par (Brunenberg et al., 2012).

D'un point de vue fonctionnel, la voie cortico-NST est responsable de la première phase de la réponse triphasique induite dans le NST lors d'une stimulation du cortex *in vivo* (Fujimoto and Kita, 1993; Maurice et al., 1998; Nambu et al., 2000; Kolomiets et al., 2001; Magill et al., 2004). En effet, une stimulation du cortex entraîne, dans un premier temps, une excitation rapide du NST imputée à l'activation de la voie cortico-NST. Dans un deuxième temps, le NST est inhibé par le GPe précédemment activé par le NST. Enfin, une excitation plus tardive du NST est observée. Cette dernière serait due à la désinhibition du NST par la voie indirecte et aux propriétés de rebond des neurones du NST.

Les projections cortico-NST proviennent des neurones pyramidaux de la couche V du cortex chez le rat et le singe. D'après une étude de Kita et Kita réalisée chez le rat, les fibres cortico-NST provenant des aires motrices seraient majoritairement des collatérales de la voie cortico-spinale (Kita and Kita, 2012) (**figure 12**). Ainsi, le NST recevrait une copie du message moteur envoyé par le cortex à la moelle épinière pour commander un mouvement. Cependant, nous ne savons pas si des fibres cortico-NST provenant d'aires corticales impliquées dans d'autres fonctions projettent, elles-aussi, sur d'autres structures que le NST.

De même, si les deux voies d'entrée des GB sont pour le moment considérées comme provenant de populations distinctes de neurones corticaux (Parent and Parent, 2006; Mathai and Smith, 2011), quelques études vont à l'encontre de cette idée et proposent, au moins en partie, une origine commune des voies cortico-striatale et cortico-NST (Feger et al., 1994; Kita and Kita, 2012). Pourtant, contrairement à la voie cortico-striatale, les projections cortico-NST seraient uniquement ipsilatérales, ce qui supporte l'hypothèse d'une ségrégation des voies cortico-striatale et sous-thalamique. Pour le moment, aucune étude ne s'est intéressée à la proportion de neurones corticaux projetant à la fois sur le striatum et le NST ou sur le NST ou le striatum uniquement.

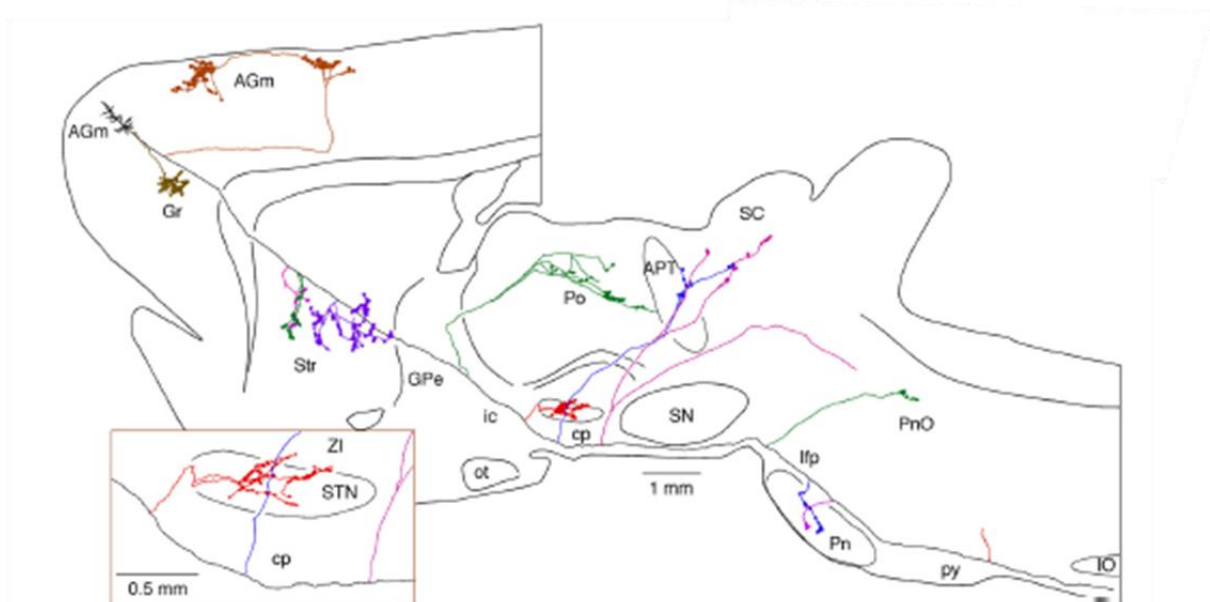


Figure 12 : Une partie des fibres cortico-sous-thalamiques proviennent de collatérales de la voie cortico-spinale.

Reconstruction d'un neurone cortico-sous-thalamique sur une coupe sagittale de cerveau de rat. Les neurones cortico-sous-thalamiques proviennent de la couche V du cortex moteur. L'axone du neurone cortico-sous-thalamique reconstruit est représenté en noir et projette initialement vers les pyramides du tronc cérébral, qui sont le lieu de passage des fibres cortico-spinales. Les fibres de couleur sont des collatérales de cet axone. L'une d'elles projette sur le noyau sous-thalamique (en rouge). Noter que le noyau sous-thalamique n'est pas la seule structure à recevoir des collatérales de ce neurone de la voie cortico-spinale. AGm = cortex agrulaire médian ; Gr = cortex granulaire ; Str = striatum ; GPe = globus pallidus externe ; ic = capsule interne ; ot = tractus optique ; Po = noyau postérieur du thalamus ; APT = noyau pré-tectal antérieur ; SC = ; cp = pédoncule cérébral ; ZI = zonula includens ; STN = noyau sous-thalamique ; SN = substance noire ; lfp : « longitudinal fasciculus of the pons » ; PnO : « pontine reticular nucleus » ; Pn : noyau du pont ; py : pyramides du tronc cérébral ; IO : olive inférieure. D'après Kita and Kita 2012 (Kita and Kita, 2012).

2.2.2 Le noyau-sous-thalamique

Organisation du noyau sous-thalamique

Le NST est une structure dense composée principalement de neurones de projection glutamatergiques dont le nombre varie, selon les espèces, de 13 600 chez le rat à 560 000 chez l'humain (Oorschot, 1996; Hardman et al., 2002). Les neurones du NST forment une population relativement homogène caractérisée par un diamètre somatique allant de 10 à 20 μm chez le rat et de 35 à 40 μm chez le singe, et une grande arborisation dendritique de forme ovoïde couvrant une portion importante du NST (Hamani et al., 2004) (**figure 13**). Ces neurones sont également caractérisés par l'expression de Pitx2, un facteur de transcription à homéodomaine qui n'est exprimé dans aucune autre structure des GB, au cours du développement et dans le cerveau mature chez le rongeur (Smidt et al., 2000; Martin et al., 2002; Martin et al., 2004).

Le NST, comme d'autres structures des GB a été divisé en trois territoires fonctionnels : moteur, associatif et limbique (Alexander et al., 1990; Parent and Hazrati, 1995; Joel and Weiner, 1997). Cette division a d'abord été réalisée à partir des connexions du NST avec le GPe. Ainsi, les parties dorso-médiale et dorso-latérale du NST reçoivent des informations motrices alors que les parties ventro-latérale et ventro-médiale reçoivent respectivement des informations associative et limbique. Cette compartimentation du NST est également valable pour les afférences corticales du NST et la somatotopie est également respectée pour les projections corticales motrices (Nambu et al., 2002; Hamani et al., 2004; Mathai and Smith, 2011) (**figure 14**). Cependant, il semblerait que la ségrégation des afférences corticales ne soit pas si nette, comparée à celle du striatum. En effet, certaines études ont mis en évidence l'existence de neurones sous-thalamiques répondant à la stimulation de deux aires corticales différentes (Kolomiets et al., 2001). Ce type d'observation a également été fait concernant les projections provenant du GPe (Bevan et al., 1997). Ce recouvrement des champs fonctionnels du NST pourrait être en partie dû à l'étendue de l'arborisation dendritique des neurones du NST qui peut couvrir jusqu'à la moitié du NST chez le rat (Kita et al., 1983) et un cinquième du NST chez le singe (Yelnik and Percheron, 1979).

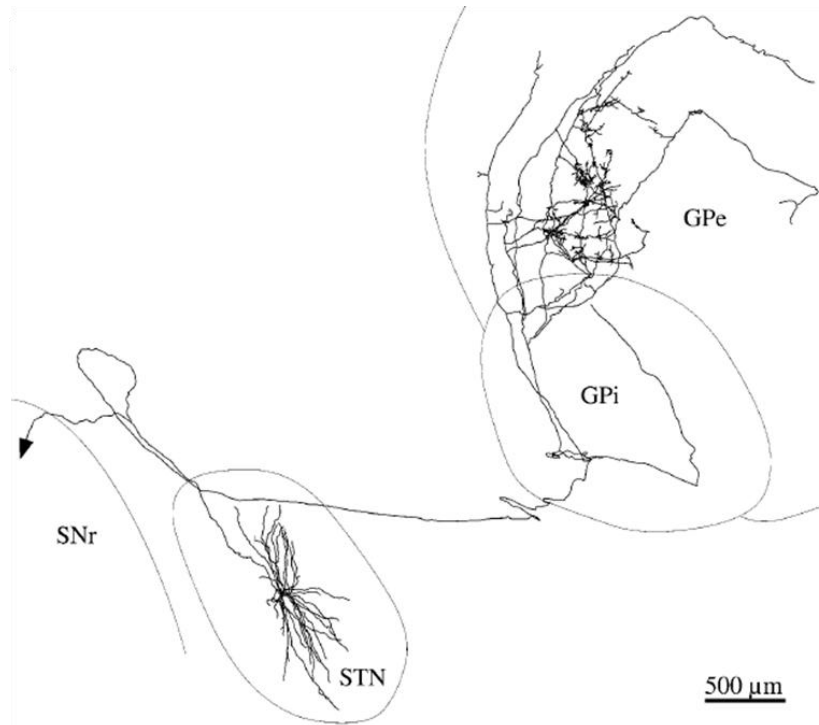


Figure 13 : Reconstruction d'un neurone du noyau sous-thalamique de singe.

Exemple représentatif de la morphologie des neurones du noyau sous-thalamique (STN). Noter la taille de son arborisation dendritique qui couvre une grande partie du noyau sous-thalamique et l'importance de l'innervation du globus pallidus externe (GPe). L'axone du neurone émet également des collatérales projetant sur le globus pallidus interne (GPi) et la substance noire réticulée (SNr). D'après Sato 2000 (Sato et al., 2000).

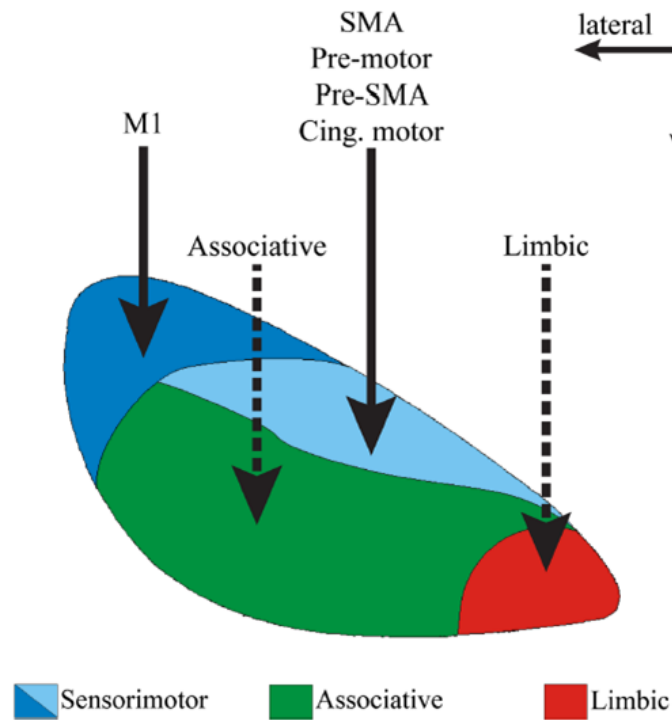


Figure 14 : Les territoires fonctionnels du noyau sous-thalamique.

Schéma d'une coupe coronale de noyau-sous-thalamique de primate présentant l'organisation topographique des projections cortico-sous-thalamiques. SMA = aire motrice supplémentaire ; Cing. = cortex cingulaire. D'après Mathai and Smith 2011 (Mathai and Smith, 2011).

Connectivité du NST

Le NST reçoit majoritairement des afférences provenant de nombreuses aires du cortex (voir paragraphe 2.2.1) et du GPe (Parent and Hazrati, 1995), les premières étant glutamatergiques (excitatrices) et les secondes GABAergiques (inhibitrices). Les synapses formées avec les fibres corticales se font essentiellement au niveau des dendrites distales et sur les épines dendritiques des neurones du NST, alors que les synapses formées avec les fibres pallidales se font principalement au niveau des troncs dendritiques et des corps cellulaires (Smith et al., 1990a; Hamani et al., 2004) (**figure 15**). Ainsi, cet emplacement privilégié des contacts pallidaux sur l'arbre dendritique des neurones du NST confère au GPe une grande capacité d'inhibition sur le NST. En retour, les fibres glutamatergiques des neurones du NST projettent sur le GPe (Smith et al., 1990b; Parent and Hazrati, 1995), formant une véritable boucle à l'activité auto-entretenu au sein des GB. En effet, ces deux structures sont spontanément actives et l'influence du GPe sur le NST permettrait, plutôt que d'inhiber le NST, de synchroniser et de renforcer les réponses des neurones sous-thalamiques lorsqu'ils reçoivent des signaux excitateurs provenant du cortex ou du thalamus en désactivant des canaux sodiques de type Na_v (Baufreton et al., 2005a). L'influence directe de ces deux structures sur les noyaux de sortie des GB et le fait qu'un changement d'activité, ainsi qu'une synchronisation de ces deux structures soient observés en condition pathologique (maladie de Parkinson) font de ce sous-réseau GPe-NST un élément important des GB (Bevan et al., 2002).

Le thalamus projette également sur le NST. Ces projections proviennent essentiellement des noyaux parafasciculaire et centro-médian (Sadikot et al., 1992; Feger et al., 1994). Chez le rat, ces deux noyaux ne sont pas dissociés. Comme les afférences corticales, les synapses thalamo-NST sont glutamatergiques et se trouvent principalement au niveau des dendrites distales des neurones sous-thalamiques (Mouroux and Feger, 1993).

Le NST projette sur les noyaux de sortie des GB, le GPi et la SNr, ce qui forme le second élément de la voie hyperdirecte, contribuant également à la voie indirecte (Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990; Nambu et al., 2002). La SNc reçoit également des afférences excitatrices provenant du NST (Smith et al., 1990b; Parent and Hazrati, 1995), ce qui constituerait un des moyens de contrôle de la libération de dopamine. En retour, la SNc envoie des projections dopaminergiques pénétrant dans le NST au niveau sa partie dorsale

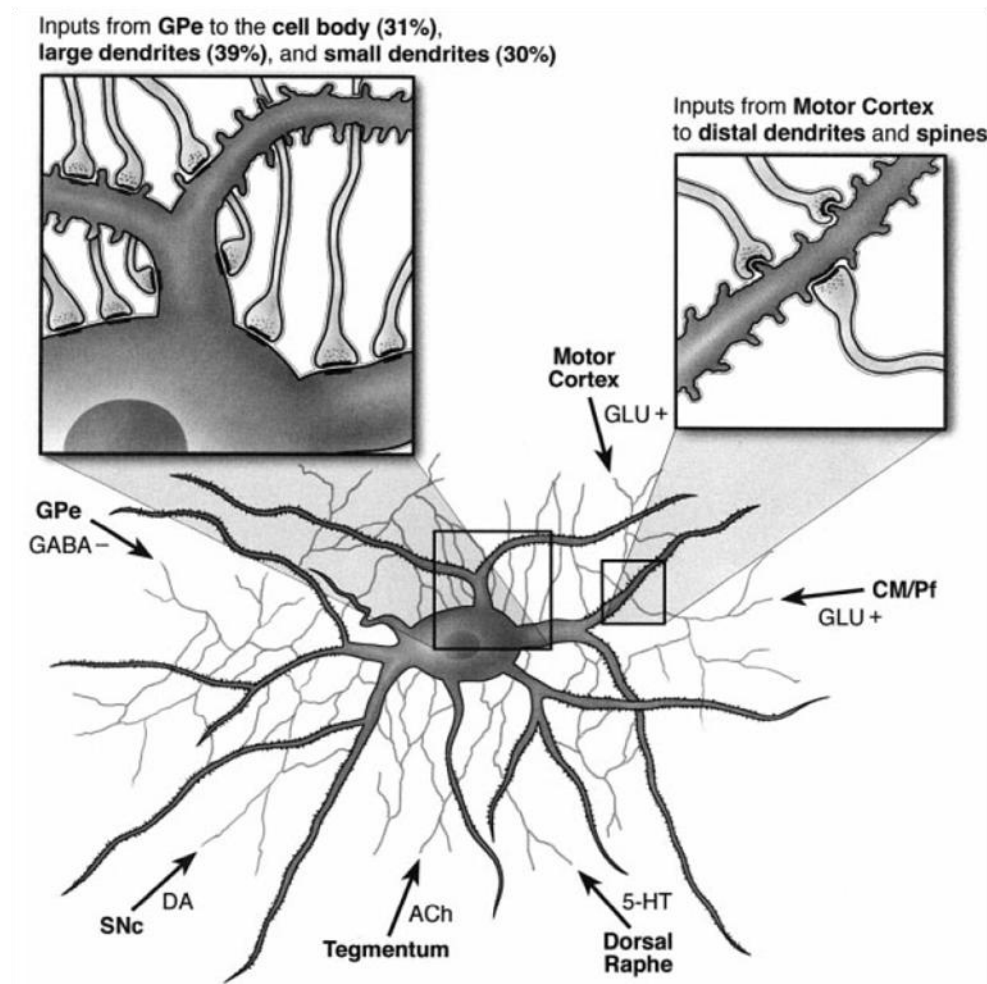


Figure 15 : Organisations des principales afférences du noyau sous-thalamique sur l'arborisation dendritique des neurones sous-thalamiques.

Noter que les afférences glutamatergiques projettent principalement sur les épines dendritiques au niveau des dendrites distales alors que les afférences GABAergiques du globus pallidus externe (GPe) projettent majoritairement au niveau des troncs dendritiques et des corps cellulaires. GLU = glutamate ; CM/Pf = noyaux centro-médian et parafasciculaire du thalamus ; 5-HT = sérotonine ; ACh = acétylcholine ; DA = dopamine ; SNc = substance noire compacte ; GPe = globus pallidus externe. D'après Hamani 2004 (Hamani et al., 2004).

(Hassani et al., 1997; Rommelfanger and Wichmann, 2010) (voir paragraphe 1.3.2). Les effets de la dopamine sur les neurones du NST seront détaillés au paragraphe 2.3.4.

Le NST interagit avec d'autres structures que les noyaux de sortie des GB, même si ces connexions sont moins conséquentes et moins étudiées. En effet, le NST reçoit des afférences glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques provenant du noyau pédonculopontin, une structure du tronc cérébral impliquée dans le mouvement et en lien direct avec la moelle épinière (Bevan and Bolam, 1995; Martinez-Gonzalez et al., 2011). En retour, le NST projette sur ce noyau (Jackson and Crossman, 1981; Kita and Kitai, 1987). L'utilisation d'agonistes cholinergiques a mis en évidence un effet global excitateur de l'acétylcholine sur les neurones du NST *in vitro* en augmentant leur activité spontanée et l'amplitude des réponses synaptiques excitatrices principalement (Flores et al., 1996; Shen and Johnson, 2000). Un faible retour excitateur du NST sur les couches superficielles du cortex (Degos et al., 2008), ainsi que des projections excitatrices sur le striatum (Kita and Kitai, 1987; Smith et al., 1990b) ont également été rapportés. De même, une innervation sérotoninergique du NST par le noyau du raphé a été décrite (Parent et al., 2010). Des approches pharmacologiques et lésionnelles rapportent que, à l'inverse de l'acétylcholine, la sérotonine aurait principalement une influence inhibitrice sur les neurones du NST en agissant à la fois sur leur excitabilité et la transmission synaptique (Ding and Zhou, 2014; Miguelez et al., 2014).

2.3. La synapse cortico-sous-thalamique, une synapse glutamatergique

2.3.1 Généralités : les synapses glutamatergiques

Les synapses glutamatergiques forment la source principale d'excitation dans le système nerveux central. Ces synapses sont caractérisées par une forte densité post-synaptique dense aux électrons qui leur donne un aspect asymétrique lorsqu'on les observe à très fort grossissement en microscopie électronique (Boeckers, 2006). Parmi les protéines de la densité post-synaptique, on trouve les quatre types de récepteurs au glutamate qui sont directement impliqués dans la transmission du signal au niveau des synapses glutamatergiques : les récepteurs AMPA, NMDA, kainate, et les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) principalement. L'organisation générale des synapses glutamatergiques est présentée dans la **figure 16**.

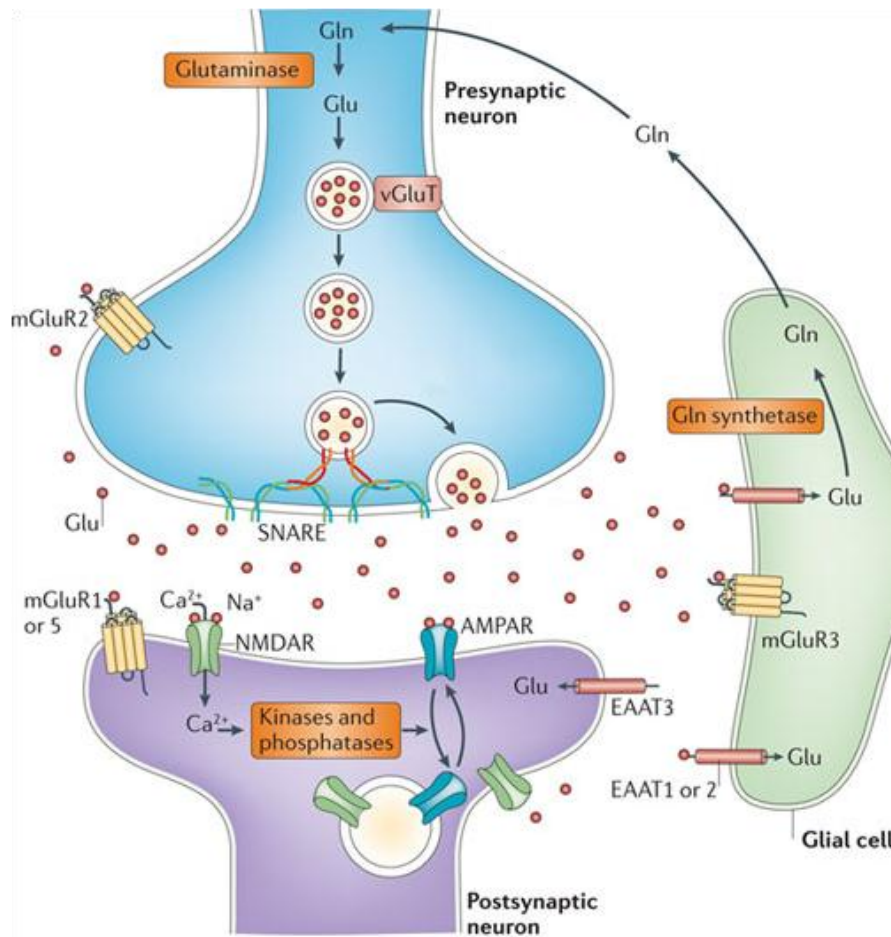


Figure 16 : Organisation générale des synapses glutamatergiques.

Le glutamate (Glu), obtenu après transformation de la glutamine (Gln) par la glutaminase, est stocké dans les vésicules synaptiques grâce au transporteur vésiculaire du glutamate (vGluT). Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, le glutamate est libéré dans la fente synaptique grâce, en particulier, au complexe protéique « SNARE » qui est responsable de la fusion vésiculaire. Le glutamate exerce alors ses effets en se liant à ses différents récepteurs. Au niveau post-synaptique, les récepteurs AMPA sont responsables de la transmission synaptique rapide, alors que les récepteurs NMDA sont impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique, notamment en affectant les mécanismes d'exo- et endocytose des récepteurs AMPA par modulation calcium-dépendante de diverses kinases et phosphatases intracellulaires. Le glutamate est réintégré au niveau du neurone post-synaptique et des cellules gliales par les transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT). Au niveau des cellules gliales, le glutamate est métabolisé en glutamine par la glutamine synthétase (Gln synthetase). La glutamine peut retourner dans le neurone pré-synaptique afin d'être à nouveau transformé en glutamate. D'après Popoli 2012 (Popoli et al., 2012).

Récepteurs au glutamate

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropiques perméables aux cations monovalents (sodium, potassium) et au calcium (Ca^{2+}) en présence de glutamate et de glycine. Ce sont des tétramères composés de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 (GluN2A à GluN2D) ou une sous-unité GluN2 associée à une sous-unité GluN3 (GluN3A et GluN3B) (Traynelis et al., 2010). La sous-unité GluN1 est essentielle au bon fonctionnement des récepteurs NMDA et les sous-unités GluN2 confèrent des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques particulières à ces récepteurs, telles que leur sensibilité au glutamate, leur perméabilité au calcium ou encore leur inhibition par le bloc magnésium (Sheng and Lin, 2001). Une des spécificités des récepteurs NMDA est que, lorsque le neurone post-synaptique est hyperpolarisé, le magnésium bloque le pore de ces récepteurs. Ainsi, les récepteurs NMDA ne sont perméables au calcium que lorsque du glutamate est libéré dans la fente synaptique et que le neurone post-synaptique est lui aussi activé. Ces récepteurs sont donc considérés comme des « détecteurs de coïncidence », essentiellement impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique (Traynelis et al., 2010) (voir paragraphe 3.1.2). Lorsqu'ils sont activés, les récepteurs NMDA entraînent des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) de longue durée (de l'ordre de la centaine de millisecondes) et ayant une cinétique lente (**figure 17**).

Les récepteurs non NMDA (AMPA et kaïnate) sont des récepteurs ionotropiques perméables au sodium et au potassium. Ces deux types de récepteurs sont les principaux responsables de la transmission synaptique rapide au niveau des synapses glutamatergiques. En effet, leur activation par le glutamate génère un EPSC de cinétique rapide et de courte durée (de l'ordre de la dizaine de millisecondes) qui dépolarise le neurone post-synaptique (**figure 17**). Les récepteurs AMPA sont des hétérotétramères formés par l'association de deux homodimères comportant l'une des sous-unités suivantes : GluA1 à GluA4 (Traynelis et al., 2010). Les récepteurs kaïnate sont aussi formés par l'association de deux homodimères, mais à partir des sous-unités GluA5 à GluA7 et KA1 et KA2 (Traynelis et al., 2010). A l'inverse des récepteurs NMDA, la plupart des récepteurs AMPA ne sont pas perméables au calcium. En effet, la présence de la sous-unité GluA2 rend les récepteurs AMPA imperméables au calcium. Cependant, il existe une sous-population de récepteurs AMPA n'ayant pas cette sous-unité GluA2, ce qui les rend perméables au calcium (Burnashev et al., 1992). Du fait de cette spécificité, cette sous-population de récepteurs AMPA pourrait jouer un rôle dans les

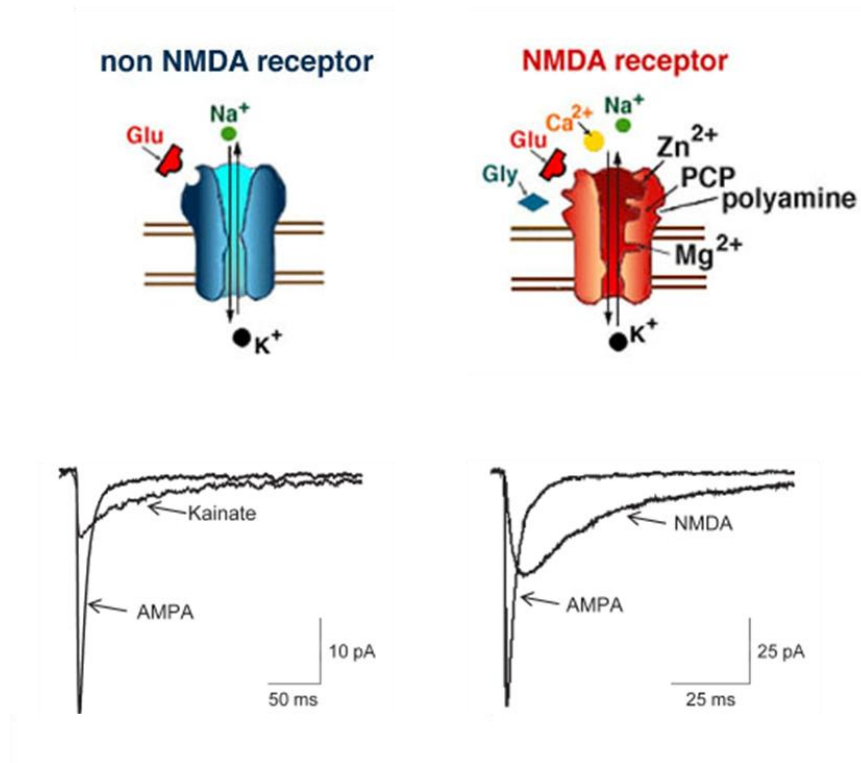


Figure 17 : Les récepteurs ionotropiques au glutamate.

Haut : Perméabilité ionique et sites de fixation des différents activateurs et modulateurs des récepteurs AMPA et kaïnate (gauche) et des récepteurs NMDA (droite). D'après Kandel 1991 (Kandel, 1991; Wang et al., 2007). Bas : Enregistrements électrophysiologiques de courants synaptiques miniatures AMPA et kaïnate (gauche) et AMPA et NMDA (droite). D'après Traynelis 2010 (Traynelis et al., 2010).

phénomènes de plasticité calcium-dépendants (Rao and Finkbeiner, 2007; Man, 2011). Nous verrons au paragraphe 2.3.2 qu'une expression de récepteurs AMPA perméables au calcium a été rapportée dans les neurones du NST d'animaux jeunes (Gotz et al., 1997).

Les mGluR exercent leurs effets par le biais de protéines G sur diverses voies intracellulaires contrairement aux autres récepteurs glutamatergiques. Ainsi, les réponses synaptiques induites par les mGluR sont bien plus lentes et durables (de l'ordre de la seconde, voire de la minute). On compte huit types de mGluR (mGluR1 à 8) classés en trois groupes selon la similitude de leurs séquences en acides aminés, leur mode d'action intracellulaire et leur pharmacologie (Yin and Niswender, 2014). Le groupe I comprend mGluR1 et mGluR5, le groupe II comprend mGluR2 et mGluR3 et le groupe III comprend mGluR4, 6, 7 et 8. Les récepteurs du groupe I sont couplés aux protéines G_q et donc stimulent la voie de la PLC, entraînant une augmentation de l'activité de la PKC et des taux de calcium intracellulaire, alors que ceux des groupes II et III sont couplés aux protéines $G_{i/o}$ et ont une influence inhibitrice sur l'adénylate cyclase, ce qui conduit à une baisse des taux d'AMPc intracellulaire (Willard and Koochekpour, 2013).

Effets des récepteurs dopaminergiques sur les synapses glutamatergiques

Plusieurs neuromodulateurs exercent un contrôle sur la transmission glutamatergique. L'un des objectifs de cette thèse étant d'étudier l'effet des récepteurs D5 sur la transmission glutamatergique rapide au niveau de la synapse cortico-NST, nous nous intéresserons uniquement aux effets de la dopamine sur la transmission glutamatergique rapide. La dopamine exerce ses effets sur la transmission glutamatergique rapide à deux niveaux : au niveau pré-synaptique en régulant la libération de glutamate et au niveau post-synaptique en régulant l'activité et le trafic des récepteurs AMPA et NMDA. Les effets de la dopamine sur la transmission glutamatergique sont le plus souvent étudiés dans l'hippocampe et le striatum.

La majorité des études ayant mis en évidence un effet de la dopamine sur la libération de glutamate ont rapporté un effet inhibiteur (Nicola et al., 1996; Flores-Hernandez et al., 1997; Otmakhova and Lisman, 1999; Behr et al., 2000; Bamford et al., 2004). Selon les études, cet effet serait dû dans certains cas à l'activation de récepteurs de la famille D1 (Nicola et al., 1996; Behr et al., 2000) et dans d'autres à l'activation de récepteurs de la famille D2 (Flores-Hernandez et al., 1997; Bamford et al., 2004). Une étude réalisée au niveau de la synapse voie perforante / CA1 dans l'hippocampe montre même que les deux

familles de récepteurs sont impliquées dans cet effet de la dopamine sur la transmission glutamatergique (Otmakhova and Lisman, 1999). Cet effet semble être dépendant de récepteurs pré-synaptiques. Cependant, pour la transmission cortico-striatale, l'inhibition de la libération de glutamate viendrait de l'activation de récepteurs D2 post-synaptiques et serait dépendante des endocannabinoïdes (Yin and Lovinger, 2006). Les endocannabinoïdes sont connus pour être libérés par le neurone post-synaptique et agir au niveau pré-synaptique en exerçant un contrôle négatif sur la libération de neurotransmetteur. Par ailleurs, une étude plus récente, elle aussi réalisée sur la synapse cortico-striatale, montre que les effets de la dopamine sur la libération de glutamate seraient bien plus complexes (Andre et al., 2010). En effet, les récepteurs de la famille D1 auraient un effet positif sur la transmission glutamatergique en réduisant la production d'endocannabinoïdes au niveau post-synaptique et les récepteurs de la famille D2 auraient un effet négatif sur la transmission glutamatergique en agissant directement au niveau pré-synaptique, mais aussi au niveau post-synaptique, en stimulant la libération d'endocannabinoïdes. Cette étude révèle donc une multiplicité de cibles possibles de la dopamine pour contrôler la libération de glutamate.

Au niveau post-synaptique, la dopamine module la transmission glutamatergique en agissant principalement sur l'activité, la localisation et le trafic des récepteurs AMPA et NMDA. La majorité des études réalisées sur ce sujet rapportent une augmentation des courants AMPA et/ou NMDA suite à l'activation des récepteurs de la famille D1 et une diminution lorsque les récepteurs de la famille D2 sont activés (Cepeda et al., 1993; Levine et al., 1996; Cepeda et al., 1998; Zheng et al., 1999; Flores-Hernandez et al., 2002; Chen et al., 2004; Hernandez-Echeagaray et al., 2004; Andre et al., 2010). L'activation de la voie de l'adénylate cyclase, conduisant à la stimulation de la PKA et de la protéine DARPP-32 serait en partie responsable des effets des récepteurs de la famille D1 en favorisant la phosphorylation des récepteurs AMPA (Price et al., 1999; Snyder et al., 2000; Chao et al., 2002) et NMDA (Blank et al., 1997; Snyder et al., 1998) au niveau des sous-unités GluA1 et GluN1 respectivement. A l'inverse, les effets des récepteurs de la famille D2 proviendraient d'une inhibition de la voie de l'adénylate cyclase, conduisant à une réduction de l'activité de la protéine kinase A et à l'augmentation de l'activité de phosphatases telles que PP-1, ce qui favoriserait la déphosphorylation des récepteurs AMPA et NMDA (Snyder et al., 1998; Higley and Sabatini, 2010). De plus, même si les mécanismes exacts ne sont pas encore connus, l'activation de la PKA par les récepteurs de la famille D1 favoriserait l'expression

des récepteurs AMPA et NMDA à la surface membranaire (Snyder et al., 2000; Hallett et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que les récepteurs D1 et NMDA pouvant interagir physiquement, ce qui pourrait contribuer à réguler la localisation et le trafic des récepteurs NMDA au niveau synaptique (Lee et al., 2002; Scott et al., 2006).

Ainsi, l'effet global de la dopamine sur la transmission glutamatergique met en jeu des voies et des effecteurs multiples. De plus, les effets de la dopamine varient selon la synapse étudiée, le type de récepteur glutamatergique étudié, les types de récepteurs dopaminergiques exprimés, leur localisation et les doses utilisées lors des expériences de pharmacologie, ce qui contribue à amplifier cette complexité.

2.3.2 Organisation de la synapse cortico-sous-thalamique

L'organisation de la synapse cortico-NST est très peu documentée. En effet, la plupart des études s'est intéressée à l'expression et aux effets des différents types de récepteurs glutamatergiques sur les neurones du NST sans faire de différence entre synapses cortico-NST, thalamo-NST ou encore pédonculo-ponto-NST. Cependant, il a été rapporté que les synapses cortico-NST représentent une grande proportion des synapses glutamatergiques des neurones du NST (Parent and Hazrati, 1995). Ainsi, il est possible que les données concernant l'expression de récepteurs au niveau des synapses glutamatergiques du NST soient valables pour les synapses cortico-NST.

Récepteurs au glutamate

Plusieurs études d'électrophysiologie *in vivo* et *in vitro* utilisant des approches pharmacologiques ont mis en évidence des récepteurs AMPA et NMDA synaptiques fonctionnels au niveau des neurones du NST (Gotz et al., 1997; Nambu et al., 2000; Wilson et al., 2004). L'ensemble des récepteurs glutamatergiques exprimés au niveau du NST sont essentiellement post-synaptiques (Galvan et al., 2006). En effet, aucun récepteur au glutamate n'a été mis en évidence au niveau des afférences glutamatergiques pour le moment.

Concernant le type de sous-unités exprimées au niveau des neurones du NST, une étude de double marquage associé à la microscopie électronique a mis en évidence que les sous-unités GluA1 et GluA2/3 (l'anticorps utilisé ne permet pas de discriminer entre GluA2 et GluA3) des récepteurs AMPA et la sous-unités GluN1 des récepteurs NMDA étaient exprimés dans le NST chez le rat (Clarke and Bolam, 1998). Même si la sous-unité GluA4 n'a

pas été détectée dans cette étude, des études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont rapporté une expression de cette sous-unité dans le NST chez le rat (Petralia and Wenthold, 1992; Sato et al., 1993). Même si l'étude de Clarke et Bolam ne s'est pas intéressée à l'expression des sous-unités de type GluN2, les récepteurs NMDA n'étant quasiment jamais composés uniquement de la sous-unité GluN1 (Traynelis et al., 2010), au moins l'une des sous-unités GluN2 doit être exprimée dans le NST. En effet, une étude a mis en évidence l'expression de la sous-unité GluN2D dans le NST (Standaert et al., 1994) et plus récemment, une expression de la sous-unité GluN2B dans le NST a également été rapportée chez le rat (Quintana et al., 2010), même si les approches utilisées ne permettent pas de conclure sur la localisation subcellulaire de cette sous-unité. Pour le moment, aucune étude ne fait état d'une expression de la sous-unité GluN2A dans le NST, même si cette sous-unité a été identifiée dans le striatum (Standaert et al., 1999) et la SNr (Chatha et al., 2000). Chaque sous-unité GluN2 conférant des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques particulières aux récepteurs NMDA (Sheng and Lin, 2001), l'expression préférentielle de l'une de ces sous-unités aurait des conséquences non négligeables sur la transmission glutamatergique au niveau du NST, notamment sur les phénomènes de plasticité synaptique.

Une expression sous-thalamique des récepteurs kaïnate a aussi été mise en évidence chez la souris (Bischoff et al., 1997). De même, les récepteurs métabotropiques au glutamate de la famille I (mGluR1a et 5) sont exprimés au niveau des compartiments péri- et extrasynaptiques des neurones du NST chez le singe (Kuwajima et al., 2004). Une étude électrophysiologique sur tranche chez le rat a mis en évidence une forte proportion de récepteurs AMPA perméables au calcium au niveau du NST, comparé aux autres noyaux des GB (Gotz et al., 1997). Cependant nous ne savons pas, pour le moment, sur quel type de synapse ces récepteurs sont présents, ni si ces récepteurs sont présents chez l'adulte. L'expression de récepteurs perméables au calcium au niveau des synapses cortico-NST aurait de fortes conséquences sur la physiologie de cette synapse, notamment en termes de plasticité synaptique.

Récepteurs dopaminergiques

Des études anatomiques et fonctionnelles utilisant des techniques telles que l'immunohistochimie couplée à la microscopie optique et électronique, l'électrophysiologie *in vivo* et *in vitro*, et la RT-PCR sur cellule unique ont mis en évidence la présence de récepteurs

fonctionnels des familles D1 (récepteurs D1 et D5) et D2 (récepteurs D2, D3 et D4) au niveau du NST (Rommelfanger and Wichmann, 2010; Wilson and Bevan, 2011) (Froux et al. 2014, chapitre de livre en annexe 2).

Au sein de la famille D1, les récepteurs D1 seraient exprimés préférentiellement au niveau des terminaisons pré-synaptiques et les récepteurs D5 au niveau des neurones du NST (post-synaptique) chez le rat et le singe (Flores et al., 1999; Svenningsson and Le Moine, 2002; Baufreton et al., 2003; Rommelfanger and Wichmann, 2010). Cependant, une étude très récente et complète de microscopie électronique et de pharmacologie réalisée chez le singe, montre que les récepteurs D5 seraient préférentiellement exprimés sur les terminaisons glutamatergiques afférentes au NST, même si des niveaux élevés de récepteur D5 sont également rapportés au niveau des dendrites des neurones sous-thalamiques (Galvan et al., 2014). Parmi ces études, seules deux précisent le type de synapse exprimant les récepteurs dopaminergiques. Au niveau post-synaptique, le récepteur D5 est exprimé au sein de synapses glutamatergiques chez le rat (Baufreton et al., 2003). Chez le singe, les récepteurs D1 et D5 sont tous les deux exprimés au niveau des synapses glutamatergiques (Galvan et al., 2014). Encore une fois, aucune de ces études ne précise si les synapses glutamatergiques exprimant ces récepteurs sont des synapses cortico-NST, thalamo-NST ou pédonculo-ponto-NST. Pour le moment, aucun effet des récepteurs de la famille D1 n'a été mis en évidence sur la transmission synaptique au niveau des synapses glutamatergiques du NST. Les effets des récepteurs de la famille D1 sur les neurones du NST seront abordés au paragraphe 2.3.4.

Les récepteurs de la famille D2 (principalement les récepteurs D2 et D3) sont également présents au niveau du NST chez le rat et le singe (Flores et al., 1999; Smith and Villalba, 2008; Rommelfanger and Wichmann, 2010). La seule étude anatomique s'intéressant à la localisation pré- ou post-synaptique des récepteurs D2 a été réalisée chez le singe et révèle que ces derniers sont majoritairement pré-synaptiques au niveau des synapses glutamatergiques dans le NST (Galvan et al., 2014). Cependant, ces résultats sont complétés par des études fonctionnelles décrivant des effets pré-synaptiques et post-synaptiques des récepteurs de la famille D2 sur le NST (Wilson and Bevan, 2011). Deux études d'électrophysiologie sur tranche chez le rat montrent l'implication des récepteurs de la famille D2 au niveau des synapses glutamatergiques du NST (Shen and Johnson, 2000; Yamawaki et al., 2012). En effet, d'après ces études, l'activation des récepteurs pré-synaptiques de la famille D2 entraînerait une réduction de l'amplitude des EPSCs glutamatergiques au niveau

des neurones sous-thalamiques. Les effets des récepteurs de la famille D2 sur l'activité des neurones sous-thalamiques seront abordés au paragraphe 2.3.4

Ainsi, la présence des récepteurs dopaminergiques au niveau pré- et post-synaptique des synapses glutamatergiques dans le NST laisse supposer que ces derniers ont la capacité de moduler la transmission glutamatergique au niveau des synapses cortico-NST. Pourtant, peu d'études ont mis en évidence un effet des récepteurs dopaminergiques sur la transmission glutamatergique au niveau du NST. La **figure 18** présente un schéma récapitulatif de l'organisation probable de la synapse cortico-NST.

Récepteurs sérotoninergiques

Les récepteurs à la sérotonine sont également exprimés au niveau du NST. Ainsi, la présence des récepteurs 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2C, 5-HT4 et 5-HT5A a été décrite au niveau des neurones du NST (Ding and Zhou, 2014; Miguez et al., 2014). Comme pour les récepteurs à la dopamine, peu d'informations sont disponibles concernant la localisation exacte de ces récepteurs dans le NST. Cependant, une étude fonctionnelle de patch-clamp sur tranches de cerveau chez le rat a mis en évidence un effet inhibiteur du récepteur 5-HT1B sur la transmission synaptique glutamatergique au niveau du NST (Shen and Johnson, 2008).

2.3.3 Élément pré-synaptique : les neurones pyramidaux de la couche V du cortex

Plusieurs études se sont intéressées aux propriétés anatomiques et électrophysiologiques des neurones pyramidaux de la couche V du cortex projetant sur le NST. D'après une étude de traçage antérograde réalisée chez le rat, les neurones cortico-NST du cortex moteur auraient un soma de grande taille et des dendrites lisses, ce qui correspond à certains profils de neurones cortico-spinaux (Kita and Kita, 2012). D'autres études d'électrophysiologie *in vivo* réalisées chez le rat ont utilisé des stimulations antidromiques des neurones corticaux à partir du NST pour repérer les neurones cortico-NST et se sont intéressées aux propriétés électrophysiologiques de ces neurones. D'après ces études, les neurones cortico-NST auraient un potentiel de repos autour de -60 mV (Paz et al., 2005; Degos et al., 2013) et un seuil de déclenchement des potentiels d'action à environ -53 mV (Degos et al., 2013). Si leur fréquence de décharge moyenne est relativement basse (environ 3 Hz), aussi bien chez l'animal anesthésié que chez l'animal éveillé au repos (Paz et al., 2005; Li et al., 2012), ils peuvent, en moyenne, atteindre une fréquence de décharge proche des 80 Hz lors d'injections

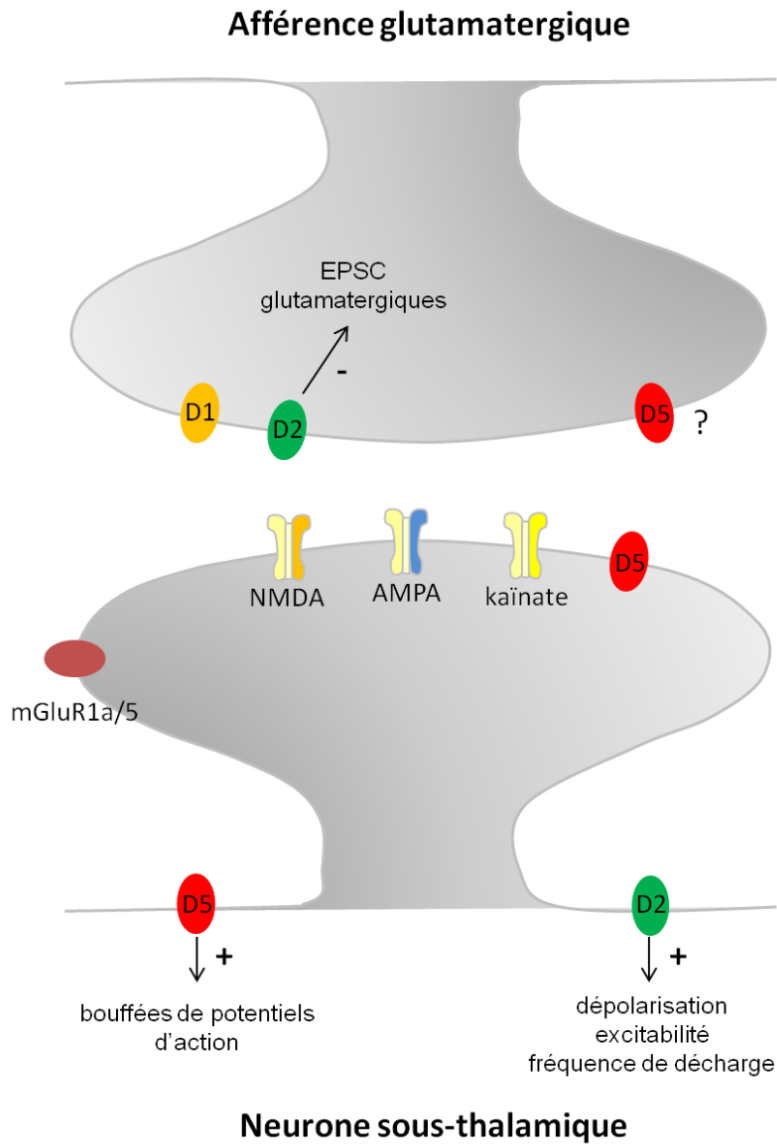


Figure 18 : Schéma récapitulatif des principaux récepteurs exprimés au niveau des afférences glutamatergiques du noyau sous-thalamique et de leurs effets.

Le point d'interrogation signifie que l'expression pré-synaptique du récepteur D5 au niveau des fibres glutamatergiques n'est pas encore totalement validée. D1 = récepteur D1 ; D5 = récepteur D5 ; D2 = récepteurs de la famille D2 (D2 et D3 principalement) ; EPSC = courant post-synaptique exciteur.

de courants dépolarisants (Paz et al., 2005). L'une de ces études a rapporté que la plupart des neurones cortico-NST exprimait un courant rectifiant lors d'une hyperpolarisation (appelé « sag » en anglais) et des propriétés de rebond post-inhibiteur (Paz et al., 2005) (**figure 19**). De plus, ces neurones auraient la capacité de décharger en bouffées (« bursts » en anglais) et cette capacité serait d'ailleurs amplifiée chez des rats lésés à la 6-OHDA (Paz et al., 2005; Li et al., 2012; Degos et al., 2013). Cependant, malgré la connaissance de ces caractéristiques, aucun profil spécifique permettant de différencier les neurones cortico-NST des autres sous-populations de neurones pyramidaux n'a été mis en évidence (Kita and Kita, 2012). L'étude de ces neurones *in vitro* pourrait permettre une étude plus complète de leurs propriétés électrophysiologiques.

2.3.4 Élément post-synaptique : les neurones sous-thalamiques

Propriétés électrophysiologiques

Trois types d'activités électrophysiologiques produites par les neurones du NST ont été rapportés *in vivo* : un profil de décharge « régulier », un autre « irrégulier » et un dernier caractérisé par un mode de décharge en bouffées de potentiels d'action (bursty en anglais), le profil « irrégulier » étant le plus fréquent chez le rat anesthésié (Wilson and Bevan, 2011). Au repos, la fréquence moyenne de décharge des neurones du NST est comprise entre 18 et 28 Hz chez le singe éveillé (Georgopoulos et al., 1983; Matsumura et al., 1992; Wichmann et al., 1994; Isoda and Hikosaka, 2008), alors que chez le rat anesthésié, celle-ci est plus basse (7 à 12 Hz) (Hollerman and Grace, 1992; Ryan and Clark, 1992; Fujimoto and Kita, 1993).

In vitro, c'est le profil de décharge « régulier » qui est le plus fréquent chez le rat. Seuls quelques neurones expriment spontanément le profil de décharge en bouffées, même si la majorité des neurones sous-thalamiques ont la capacité d'exprimer ce type d'activité en réponse à une hyperpolarisation ou lorsqu'ils sont maintenus à des potentiels hyperpolarisés (entre -50 et -60 mV) (Beurrier et al., 1999; Bevan and Wilson, 1999) (**figure 20**). En revanche, le profil « irrégulier » n'a pas été rapporté *in vitro* (Wilson and Bevan, 2011). La fréquence moyenne de décharge des neurones sous-thalamiques dans ces conditions, en l'absence de transmission synaptique, est comprise entre 5 et 15 Hz selon les études (Bevan et al., 2006). Cette différence par rapport aux études réalisées chez l'animal éveillé pourrait être due à l'absence d'influence corticale sur le NST *in vitro*.

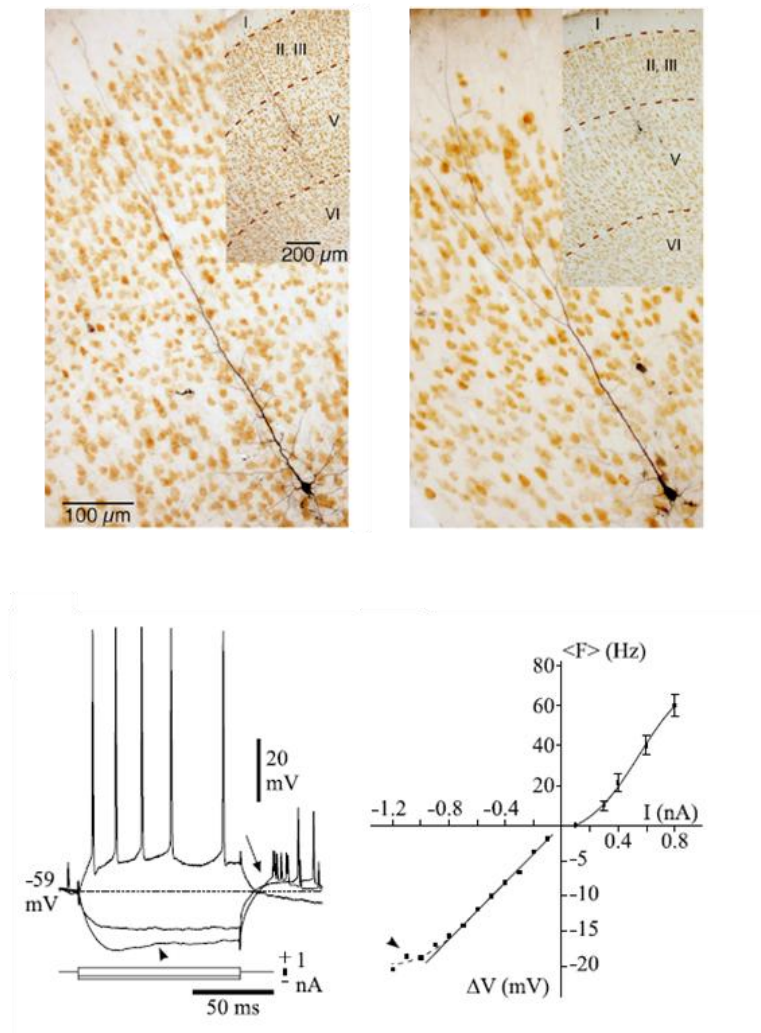


Figure 19 : Propriétés morphologiques et électrophysiologiques des neurones cortico-sous-thalamiques.

En haut : images de microscopie optique montrant deux neurones cortico-sous-thalamiques après révélation de la BDA (biotinylated dextran amine) sur des coupes de cerveau de rat avec une révélation du marqueur neuronal NeuN permettant de différencier les différentes couches du cortex. D'après Kita and Kita 2012 (Kita and Kita, 2012). En bas : Propriétés électrophysiologiques de neurones cortico-sous-thalamiques *in vivo*. A gauche : réponse d'un neurone cortico-sous-thalamique à l'injection de créneaux de courant positifs et négatifs. A droite : courbe intensité/voltage (I/V) d'un neurone cortico-sous-thalamique pour les valeurs d'intensité sous-liminaire et intensité/fréquence de décharge pour les valeurs d'intensité supra-liminaire. Ces neurones expriment un courant rectifiant appelé SAG en réponse à une hyperpolarisation (pointe noire) et un rebond post-inhibiteur (flèche entière) D'après Paz 2005 (Paz et al., 2005).

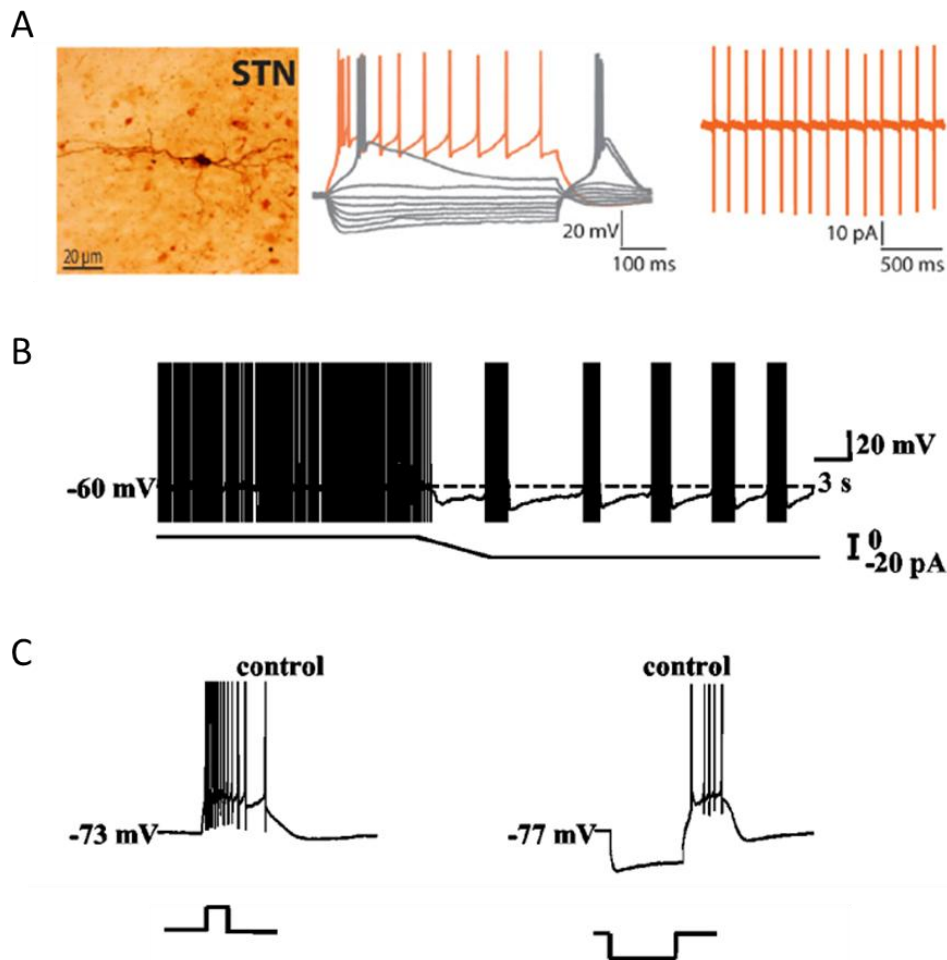


Figure 20 : Propriétés morphologiques et électrophysiologiques des neurones du NST.

A : Image de microscopie optique montrant un neurone du noyau sous-thalamique après révélation de la biocytine (gauche). Enregistrements électrophysiologiques de patch-clamp *in vitro* montrant les variations du potentiel de membrane (mode courant imposé) d'un neurone du NST à l'injection de créneaux de courants positifs et négatifs (milieu) et le rythme de décharge régulier d'un neurone du NST enregistré en configuration cellule attachée (droite). Ces neurones expriment un courant rectifiant appelé SAG en réponse à une hyperpolarisation. Noter la capacité des neurones du NST à exprimer des bouffées de potentiels d'action lors d'injections de créneaux de courant positif et au retour d'une hyperpolarisation (milieu). D'après Bosch 2012 (Bosch et al., 2012). **B :** Enregistrement électrophysiologique montrant un neurone du NST passant d'un rythme de décharge régulier à un mode de décharge en bouffées, lorsqu'il est hyperpolarisé. **C :** Enregistrement de patch-clamp en cellule entière montrant un neurone du NST exprimant des bouffées de potentiels d'action en réponse à l'injection de courant positif (gauche) ou au retour d'une hyperpolarisation (droite). Noter que la bouffée de potentiels d'action est maintenue, même après la fin de la stimulation. D'après Baufreton 2003 (Baufreton et al., 2003).

L'activité autonome des neurones sous-thalamiques est due à la présence de canaux sodiques persistants et réurgents voltage-dépendants de type Na_v qui sont actifs sous le seuil de déclenchement des potentiels d'action (Beurrier et al., 2000; Do and Bean, 2003; Bevan et al., 2006; Wilson and Bevan, 2011). Les courants induits par ces canaux (I_{NaP}) étant sensiblement plus puissants que les courants potassiques persistants également actifs à ces potentiels de membrane, le potentiel de membrane augmente lentement pendant l'intervalle inter-potentiel d'action jusqu'à déclencher un nouveau potentiel d'action (Bevan and Wilson, 1999; Beurrier et al., 2000; Farries et al., 2010). La faible entrée de calcium induite lors du potentiel d'action active des canaux potassiques calcium dépendants (canaux SK_{Ca}) responsables de la phase d'hyperpolarisation après le potentiel d'action. Cette phase permet de réactiver les canaux sodiques persistants et réurgents voltage-dépendants qui entraînent l'émission d'un nouveau potentiel d'action. Le blocage des courants SK montre que ces derniers sont responsables de la régularité de l'activité autonome des neurones sous-thalamiques (Bevan and Wilson, 1999; Hallworth et al., 2003).

Les bouffées de potentiels d'action exprimées par les neurones du NST sont essentiellement dues aux canaux calciques exprimés par les neurones sous-thalamiques (Wilson and Bevan, 2011). En effet, aux potentiels hyperpolarisés, les canaux calciques à bas seuil de type Cav3 et cationiques de type HCN (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels) sont réactivés et dépolarisent le neurone jusqu'à entraîner l'émission d'une bouffée de potentiels d'action. La dépolarisation est alors maintenue par l'activation de canaux calciques à haut seuil de type Cav1 et Cav2 (Beurrier et al., 1999; Song et al., 2000; Hallworth et al., 2003). C'est l'activation des canaux SK_{Ca} par le calcium accumulé qui entraîne petit à petit la réduction de la fréquence des potentiels d'action de la bouffée, puis mène à la repolarisation du neurone. L'hyperpolarisation ainsi créée réactive les canaux calciques à bas seuil et une nouvelle bouffée est émise.

Les propriétés électrophysiologiques particulières des neurones du NST peuvent influencer les effets des entrées synaptiques reçues par ces derniers. Par exemple, la levée d'une forte inhibition GABAergique de ces neurones imposée par le GPe peut entraîner l'apparition de rebonds d'activité pouvant parfois se prolonger par une bouffée de potentiels d'action. Ainsi, une inhibition des neurones du NST peut, paradoxalement, entraîner une forte activité de ces neurones (Bevan et al., 2000). De plus, la réactivation des canaux Na_v par une inhibition GABAergique avant l'arrivée d'un EPSC glutamatergique accroît l'efficacité de ce

dernier en termes de rapidité et de précision du déclenchement des potentiels d'action (Baufreton et al., 2005a). Ainsi, l'interaction des propriétés électrophysiologiques intrinsèques et des propriétés synaptiques des neurones du NST conditionnent la manière dont l'information sera reçue, traitée et transmise par le NST aux noyaux de sortie des GB.

Modulation dopaminergique

L'apparition d'une synchronisation et l'augmentation de l'activité de décharge des neurones du NST, associées à l'augmentation de l'occurrence du profil de décharge en bouffées dans la maladie de Parkinson a suscité un intérêt croissant pour les effets de la dopamine sur les neurones du NST.

L'activation des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques entraîne une dépolarisation des neurones du NST et une augmentation de leur fréquence de décharge (Wilson and Bevan, 2011). Ces effets sont en majeure partie induits par les récepteurs de la famille D2. En effet, l'activation des récepteurs D2 et D3 dépolarisent les neurones sous-thalamiques et augmentent leur fréquence de décharge et leur excitabilité, tout en réduisant leur régularité chez le rat. Ainsi, les effets des récepteurs de la famille D2 peuvent entraîner un changement d'activité des neurones du NST en favorisant le passage d'un profil de décharge en bouffées vers un profil de décharge tonique (Zhu et al., 2002; Baufreton et al., 2005b; Ramanathan et al., 2008).

De même, l'activation des récepteurs de la famille D1 entraînent une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du NST dans des tranches de cerveau de rat (Baufreton et al., 2005b; Loucif et al., 2008). En revanche, les récepteurs D5 favorisent l'apparition de l'activité de décharge en bouffées dans les neurones du NST et stimulent la durée de ces événements dans les neurones ayant la capacité de décharger en bouffées (Baufreton et al., 2003; Baufreton et al., 2005b; Chetrit et al., 2013). Cet effet passe par l'augmentation de la conductance des canaux calciques de type Ca_v1 via l'activation de la voie de l'adénylate cyclase et de la PKA.

Les effets des récepteurs à la dopamine observés *in vitro* ne sont que partiellement confirmés *in vivo*. En effet, si les effets des récepteurs de la famille D1 sur l'activité de décharge en bouffées ont été confirmés chez le rat (Chetrit et al., 2013) et le singe (Galvan et al., 2014), l'activation des récepteurs de la famille D1 par injection de SKF82958 dans le NST chez le singe entraîne une diminution de la fréquence de décharge des neurones sous-

thalamique (Galvan et al., 2014). De même, dans cette étude, l'injection de quinpirole, un agoniste des récepteurs de la famille D2, n'entraîne pas de modification de la fréquence de décharge des neurones du NST (Galvan et al., 2014). Cependant, un grand nombre de facteurs comme, par exemple, le fait que toutes les afférences du NST soient préservées *in vivo* doit être pris en compte dans l'interprétation des données obtenues *in vivo*, ce qui pourrait expliquer ces différences de résultats avec la pharmacologie *in vitro*.

3. PLASTICITE SYNAPTIQUE A COURT TERME

3.1. Présentation des différents types de plasticité synaptique

3.1.1 Généralités : la plasticité synaptique

Une des propriétés les plus importantes des synapses est leur capacité à garder une trace de leur activité passée. La trace est encodée grâce à divers phénomènes de plasticité synaptique. La plasticité synaptique correspond à la modification plus ou moins durable de l'efficacité d'une synapse. La modification est fonction de l'activité de la synapse concernée et dans certains cas, elle apparaît à la suite de la détection de la coïncidence de deux événements. Ainsi, en agissant de concert avec d'autres types de plasticité, tels que la plasticité moléculaire (modification durable de l'activité de certaines protéines), la plasticité morphologique (création ou élimination de synapses) ou encore la neurogénèse (production de nouveaux neurones), la plasticité synaptique serait à l'origine de nos capacités d'apprentissage, de mémorisation, d'adaptation mais aussi d'oubli (Citri and Malenka, 2008; Takeuchi et al., 2014).

En effet, la plasticité synaptique est caractérisée par des changements bidirectionnels : l'efficacité synaptique peut être renforcée, ce qui correspond aux phénomènes de facilitation et de potentialisation ou, à l'inverse, être affaiblie, ce qui correspond au phénomène de dépression. De plus, les modifications d'efficacité synaptique peuvent perdurer dans le temps. On parle ainsi de plasticité à court terme lorsque l'effet perdure de la dizaine de millisecondes à quelques minutes ou de plasticité à long terme pour des effets allant de quelques minutes à plusieurs heures, voire même plusieurs jours (Citri and Malenka, 2008).

3.1.2 La plasticité synaptique à long terme

La plasticité à long terme et les mécanismes impliqués dans son établissement et son maintien sont les plus étudiés. En effet, du fait de la persistance de ses effets dans le temps, ce serait la plasticité à long terme, plus que la plasticité à court terme, qui serait responsable des processus d'apprentissage et de mémorisation. Le modèle le plus utilisé pour étudier la plasticité à long terme est la région CA1 de l'hippocampe, une structure impliquée dans les processus de mémorisation (Zola-Morgan and Squire, 1993; Martin et al., 2000). Le principal acteur de la plasticité à long terme est le récepteur NMDA (Citri and Malenka, 2008). En effet, l'activation de ce récepteur entraîne une entrée de calcium dans les dendrites du neurone post-synaptique. Il faut préciser que l'activation du récepteur NMDA nécessite non seulement l'activation du neurone pré-synaptique entraînant une libération de glutamate dans l'espace synaptique, mais aussi la dépolarisation simultanée du neurone post-synaptique pour lever le bloc magnésium (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Le récepteur NMDA fait ainsi figure de détecteur de coïncidence entre les activités pré- et post-synaptiques. C'est la modification de la concentration de calcium post-synaptique qui va orienter la synapse vers une potentialisation ou une dépression à long terme. En effet, l'induction d'une dépression à long terme nécessite une élévation relativement faible des taux de calcium intracellulaires (Cummings et al., 1996), alors que l'induction de la potentialisation à long terme nécessite une très forte augmentation des taux de calcium post-synaptiques (Malenka and Nicoll, 1993).

Dans le cas de la potentialisation à long terme, l'élévation des taux de calcium entraîne l'activation de kinases, notamment de la CaMKII, ce qui a, entre autres, pour conséquence d'augmenter la conductance des récepteurs AMPA et de favoriser l'intégration de ces derniers au niveau de la densité post-synaptique, renforçant ainsi la transmission synaptique (Citri and Malenka, 2008) (**figure 21**). Dans un deuxième temps, des changements morphologiques peuvent intervenir, comme par exemple, une augmentation de la taille de l'épine dendritique (Yuste and Bonhoeffer, 2001; Abraham and Williams, 2003; Matsuzaki et al., 2004) et de la zone active pré-synaptique (Lisman and Harris, 1993). L'intervention de changements dans l'expression protéique est à l'origine du maintien de la potentialisation à long terme (Sutton and Schuman, 2006; Zhou et al., 2006).

A l'inverse, les mécanismes de la dépression à long terme passent majoritairement par l'activation des phosphatases intracellulaires qui ont pour effet de réduire la conductance des récepteurs AMPA et de rompre l'ancrage de ces derniers au niveau de la densité post-

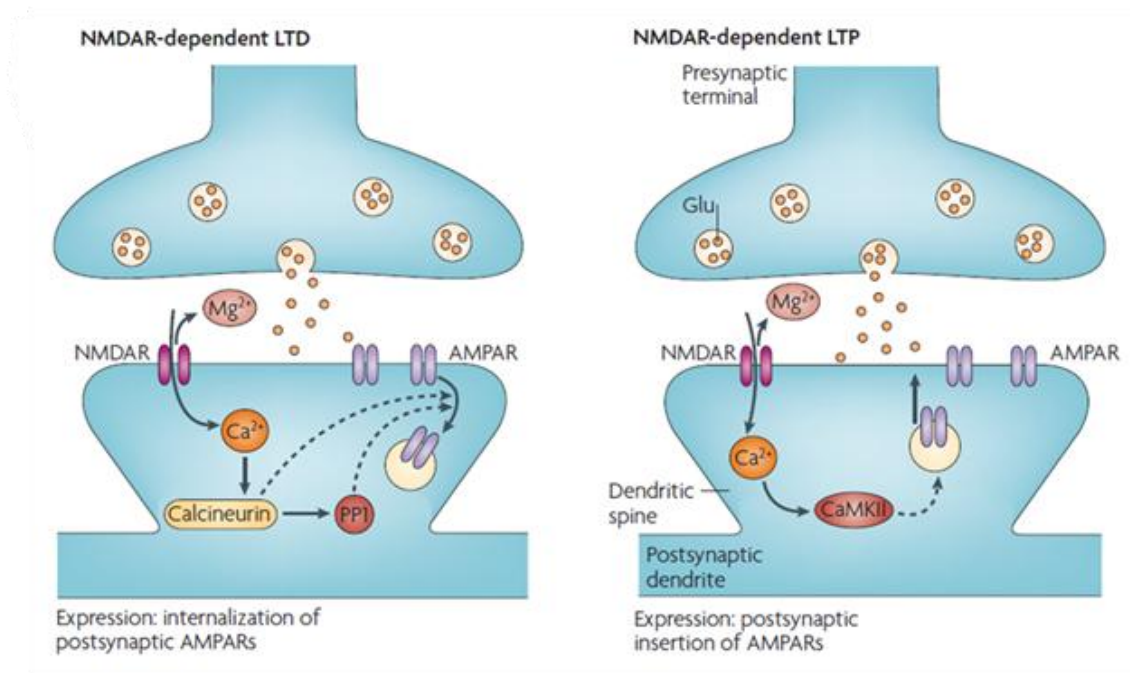


Figure 21 : Principaux mécanismes de la plasticité à long terme dépendante des récepteurs NMDA.

A gauche : schéma présentant les principaux mécanismes de la dépression à long terme dépendante des récepteurs NMDA. A droite : schéma présentant les principaux mécanismes de la potentialisation à long terme dépendante des récepteurs NMDA. LTD = dépression à long terme ; LTP = potentialisation à long terme. Voir le texte pour plus de détails. D'après Kauer and Malenka 2007 (Kauer and Malenka, 2007).

synaptique, ce qui mène à leur retrait de la synapse par endocytose (Citri and Malenka, 2008) (**figure 21**). Une réduction de la taille des épines dendritiques a également été rapportée, ce qui contribue à la diminution de la transmission synaptique (Nägerl et al., 2004; Zhou et al., 2004).

Les phénomènes de plasticité synaptique à long terme mettent en jeu des mécanismes plus complexes et variés que ceux décrits brièvement dans ce paragraphe. Cependant, la plasticité à long terme n'ayant pas été étudiée au cours de cette thèse, ce type de plasticité ne sera pas détaillé plus précisément. Une vision bien plus complète et descriptive de l'ensemble de ces mécanismes est disponible dans une revue de Citri et Malenka publiée en 2008 (Citri and Malenka, 2008).

3.1.3 La plasticité synaptique à court terme

Présentation de la plasticité à court terme

Il existe deux types majeurs de plasticité synaptique à court terme : la facilitation et la dépression à court terme (Fioravante and Regehr, 2011). La facilitation apparaît majoritairement au niveau des synapses à faible probabilité de libération initiale de neurotransmetteurs. La stimulation répétée à haute fréquence de ce type de synapse entraîne une augmentation progressive de la probabilité de libération du neurotransmetteur. Ainsi, à chaque stimulation reçue, le message transmis au neurone post-synaptique est augmenté et favorise l'émission d'un potentiel d'action par le neurone post-synaptique (**figure 22**). A l'inverse, la dépression à court terme apparaît majoritairement au niveau des synapses à forte probabilité de libération initiale. Lorsque ces synapses sont stimulées à haute fréquence, on observe une diminution de la force de la transmission synaptique (**figure 22**). Il existe également deux autres formes de plasticité à court terme : l'augmentation et la potentialisation post-tétanique (Fioravante and Regehr, 2011). Ces deux formes de renforcement de l'activité synaptique apparaissent à la suite d'une activation à haute fréquence de la synapse. On distingue ces deux phénomènes en fonction de leur durée, principalement. La potentialisation post-tétanique dure 10 secondes à quelques minutes et sa durée augmente en fonction de la fréquence et de la durée de la stimulation. L'augmentation, elle, nécessite une stimulation moins longue de la synapse et dure 5 à 10 secondes.

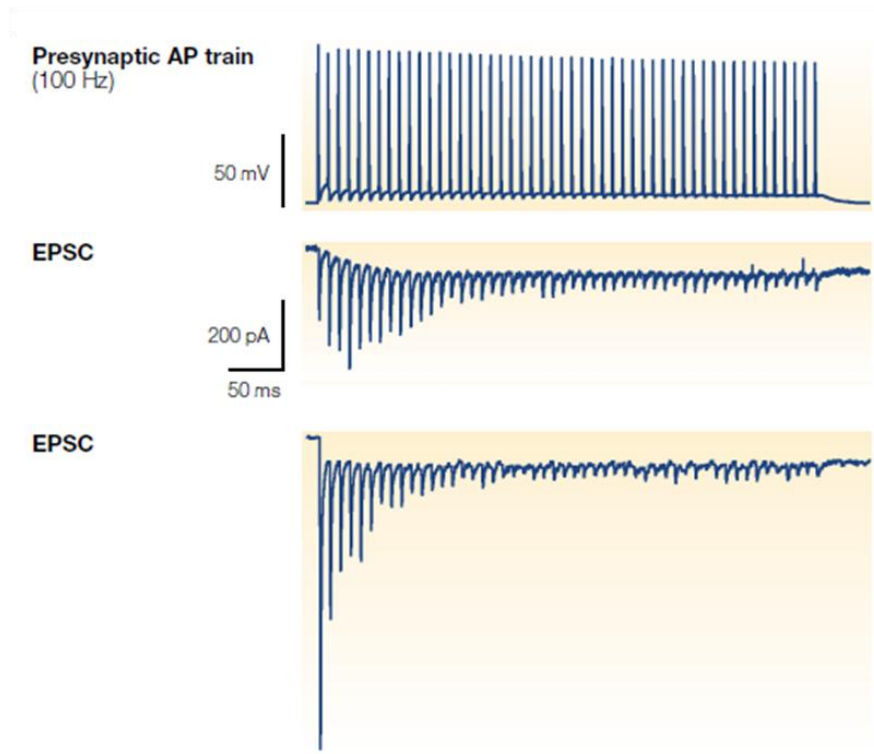


Figure 22 : Exemples de facilitation et de dépression à court terme.

Lorsqu'un neurone pré-synaptique décharge à une fréquence donnée (haut), on peut observer, selon le type de synapse, une augmentation progressive des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) au niveau du neurone post-synaptique, ce qui correspond à une facilitation à court terme (milieu) ou une diminution progressive des EPSC au niveau du neurone post-synaptique, ce qui correspond à une dépression à court terme (bas). D'après Von Gersdorff and Borst 2002 (von Gersdorff and Borst, 2002).

Intérêt fonctionnel de la plasticité à court terme

D'un point de vue fonctionnel, la plasticité synaptique à court terme serait majoritairement impliquée dans les phénomènes d'intégration et de traitement de l'information reçue par les neurones (Fioravante and Regehr, 2011). A ce titre, cette propriété a été reliée au traitement de l'information sensorielle et c'est dans ce contexte qu'elle est le plus souvent étudiée (Abbott and Regehr, 2004). Par exemple, il a été rapporté que la dépression à court terme serait impliquée dans la localisation des sons (Kuba et al., 2002; Cook et al., 2003).

Cependant, la plasticité à court terme concerne la majorité des synapses du système nerveux et cette propriété est très importante dans le fonctionnement des réseaux de neurones. En effet, la plasticité à court terme confère aux synapses des propriétés de filtre de l'information neuronale (Abbott and Regehr, 2004). Ainsi, plus une synapse ayant une forte probabilité de libération initiale sera stimulée à haute fréquence, moins le message sera transmis au travers de cette synapse. Ce type de synapse se comporte ainsi comme un filtre passe-bas puisque celle-ci déprime pour des fréquences élevées et ne laisse passer l'information correctement que pour les fréquences basses. A l'inverse, les synapses ayant une faible probabilité initiale de libération peuvent être assimilées à des filtres passe-haut puisqu'elles facilitent pour des informations reçues à haute fréquence, alors que les basses fréquences ne seront pas transmises avec la même efficacité. D'autres synapses ayant une probabilité de libération intermédiaire auront tendance à potentialiser pour les fréquences élevées, mais si la fréquence de stimulation est trop élevée, on observera une dépression. Ainsi, ces synapses sont considérées comme des filtres passe-bande, puisqu'elles favorisent le passage de l'information pour une gamme de fréquence spécifique (**figure 23**).

Dans certains cas, la plasticité synaptique à court terme permet aux neurones de répondre plus fortement à l'arrivée d'un nouveau stimulus (Abbott and Regehr, 2004). Par exemple, une synapse exprimant une dépression à court terme va préférentiellement entraîner une réponse dans le neurone post-synaptique lors de la première stimulation d'un train, comparé à la dernière stimulation de ce train. Ce phénomène est appelé « adaptation » et pourrait avoir un rôle dans les phénomènes d'adaptation au contraste (Chance et al., 1998) ou de suppression d'un stimulus « cible » par un stimulus « masque » (Carandini et al., 2002; Freeman et al., 2002) au niveau du cortex visuel primaire.

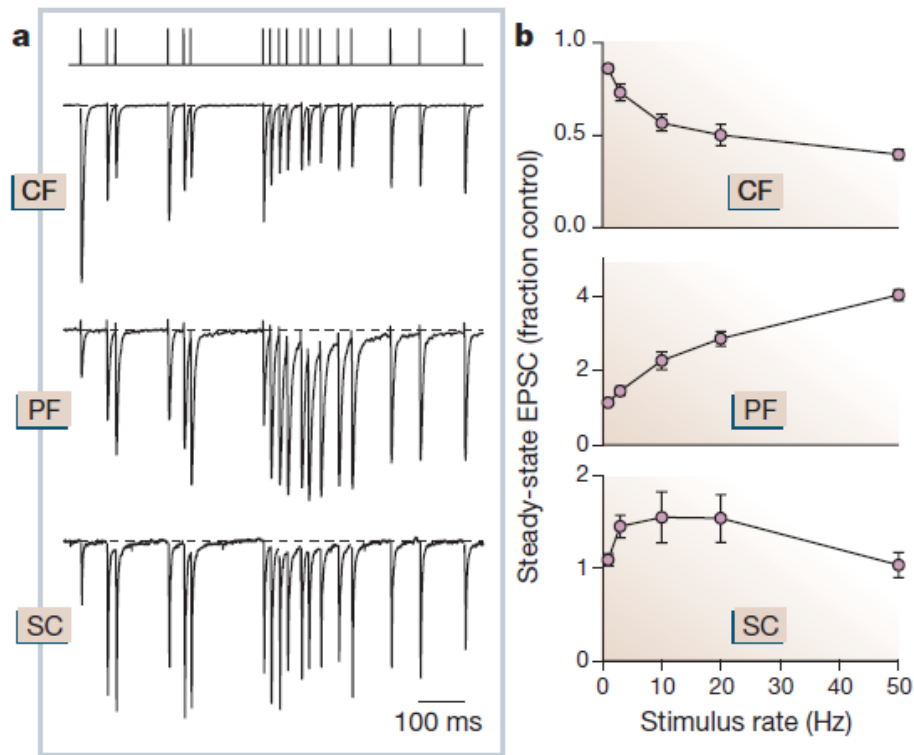


Figure 23 : La plasticité synaptique à court terme confère des propriétés de filtre de l'information neuronale aux synapses.

Exemples de trois synapses du système nerveux central ayant des profils de plasticité à court terme différents : la synapse entre les fibres grimpantes et les cellules de Purkinje du cervelet (CF) qui exprime des propriétés de filtre passe-bas, la synapse entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje du cervelet (PF) exprimant des propriétés de filtre passe-haut et la synapse entre les fibres de la collatérale de Schaeffer et les neurones de la région CA1 de l'hippocampe (SC) exprimant des propriétés de filtre passe-bande. **a** : Enregistrements électrophysiologiques des courants post-synaptiques induits dans le neurone post-synaptique, en réponse à une stimulation identique (trace du haut) appliquée aux trois synapses. **b** : Les trois profils de plasticité à court terme. Ces profils correspondent à l'amplitude normalisée du 8^{ème} ou 10^{ème} courant post-synaptique exciteur du train par rapport au premier, exprimée en fonction de la fréquence de stimulation. D'après Abbott and Regehr 2004 (Abbott and Regehr, 2004).

La plasticité à court terme peut également favoriser le passage de certains types de patron de décharge, comparé à d'autres (Abbott and Regehr, 2004). En effet, une synapse qui exprime une facilitation à court terme laisse passer plus facilement les messages rapides et donc facilitera le passage d'informations codées sous forme de bouffées de potentiels d'action. A l'inverse, une synapse exprimant une dépression à court terme filtrera les messages en bouffées et le neurone post-synaptique émettra un message plus régulier.

Ainsi, la plasticité à court terme a la capacité de transformer complètement l'information neuronale. C'est pourquoi il est absolument nécessaire de connaître les propriétés de plasticité à court terme des synapses d'un réseau neuronal pour pouvoir déchiffrer le fonctionnement de ce dernier. De plus, les caractéristiques de filtre des synapses étant ajustées en fonction de la probabilité de libération initiale de la synapse, tout neuromodulateur agissant au niveau pré-synaptique et modifiant la probabilité de libération pourrait changer les propriétés de filtre des synapses et ainsi, bouleverser le fonctionnement d'un réseau neuronal.

Bases biologiques de la plasticité à court terme

Au niveau des synapses chimiques, dont font partie les synapses glutamatergiques, un potentiel d'action généré au niveau du corps cellulaire se propage le long de l'axone jusqu'à atteindre la terminaison synaptique. La dépolarisation créée par ce dernier active alors des canaux calciques voltage-dépendants, ce qui entraîne une entrée massive de calcium. La forte augmentation de calcium dans la terminaison pré-synaptique stimule la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique, ce qui libère le neurotransmetteur dans la fente synaptique. Le neurotransmetteur peut alors activer les récepteurs post-synaptiques et transmettre le signal au niveau du neurone post-synaptique (**figure 24**). Lors des phénomènes de plasticité à court terme, ce sont majoritairement des mécanismes affectant la libération de neurotransmetteurs qui entrent en jeu (Zucker and Regehr, 2002).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les phénomènes de dépression à court terme. Par exemple, ce phénomène pourrait provenir d'un épuisement des stocks de vésicules disponibles après l'arrivée du premier potentiel d'action (Fioravante and Regehr, 2011). Ainsi, lors des stimulations suivantes, moins de vésicules sont mobilisables pour libérer le neurotransmetteur. Une quantité plus faible de neurotransmetteur sera libérée et donc la réponse synaptique sera réduite. Ainsi, plus la probabilité de libération initiale de la

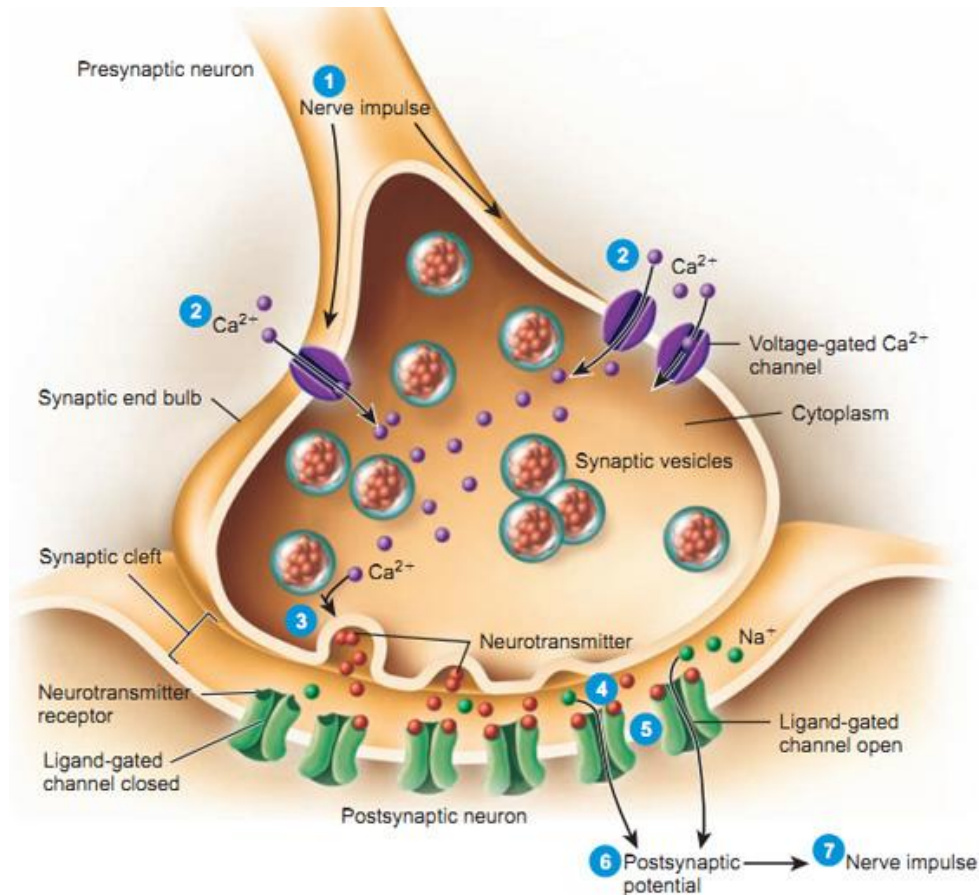


Figure 24 : Schéma simplifié expliquant les mécanismes de la transmission synaptique rapide.

Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison synaptique (1), la dépolarisation créée par ce dernier entraîne l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel membranaire, ce qui se traduit par une entrée massive de calcium dans la terminaison synaptique (2). En interagissant avec les protéines du complexe SNARE, notamment la synaptotagmine, le calcium stimule la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (3). Le neurotransmetteur jusqu'ici contenu dans les vésicules est libéré dans la fente synaptique, où il peut interagir avec ses récepteurs post-synaptiques (4). L'activation des récepteurs-canaux par le neurotransmetteur entraîne des échanges d'ions entre le neurone post-synaptique et le milieu extracellulaire (5). Cet échange d'ions correspond à un courant post-synaptique qui provoque une modification du potentiel de membrane du neurone post-synaptique, appelée potentiel post-synaptique (6), pouvant conduire à l'émission d'un ou plusieurs potentiels d'action post-synaptiques qui transmettront, à leur tour, l'information neuronale vers d'autres neurones (7). Les mécanismes de plasticité à court terme sont dus à une modification de ce système, que ce soit au niveau du stock de vésicules prêtes à être libérées, de l'homéostasie calcique de la terminaison pré-synaptique, ou encore de la saturation et de la diffusion membranaire des récepteurs post-synaptiques. Image obtenue à partir du site internet antranik.org : <http://antranik.org/synaptic-transmission-by-somatic-motorneurons/>.

synapse sera élevée, plus le stock de vésicules sera utilisé lors de la première stimulation et moins il restera de vésicules disponibles pour une prochaine stimulation. Une autre explication propose que la fusion d'une vésicule au niveau d'un site de libération entraînerait une inhibition de la fusion de vésicules au niveau de ce site, même si le stock de vésicule n'est pas affecté (von Gersdorff and Borst, 2002; Neher and Sakaba, 2008). Une réduction de l'activité des canaux calciques responsables de l'influx de calcium dans la terminaison synaptique pourrait également être responsable des phénomènes de dépression à court terme (Fioravante and Regehr, 2011). En effet, il a été montré que l'inactivation des canaux calciques par le calcium entré lors de la stimulation précédente entraînait une réponse post-synaptique de plus faible amplitude (Forsythe et al., 1998; Xu and Wu, 2005). Cette inactivation des canaux calciques passerait en partie par la calmoduline, une protéine activée par le calcium (Catterall and Few, 2008). En effet, il a été montré que la délétion du domaine de fixation à la calmoduline des canaux calciques de type P impliqués dans l'entrée de calcium dans la terminaison synaptique, permettait de réduire la dépression synaptique à court terme (Mochida et al., 2008).

Concernant la facilitation à court terme, il a été proposé que le calcium restant dans la terminaison synaptique à la suite de la première activation pouvait augmenter la probabilité de libération lors d'une seconde activation de la synapse (Zucker and Regehr, 2002). Cependant, une étude a montré que, dans certaines conditions, la quantité de calcium résiduel n'était pas suffisante pour augmenter la transmission synaptique (Felmy et al., 2003). Ainsi, il a été proposé que le calcium résiduel modifierait la probabilité de libération en activant d'autres protéines que la synaptotagmine, la principale protéine impliquée dans la libération vésiculaire dépendante du calcium (Fioravante and Regehr, 2011). Pour le moment, aucune protéine ayant la capacité d'intervenir dans ces éventuels effets du calcium n'a été mise en évidence (Fioravante and Regehr, 2011). Un rôle des tampons calciques intracellulaires dans la facilitation à court terme a également été proposé. En effet, ces protéines lient le calcium l'empêchant d'exercer ses effets sur la libération synaptique et donc réduisent la probabilité de libération initiale de la terminaison synaptique (Neher, 1998; Matveev et al., 2004). Après une première stimulation, ces tampons seraient en partie saturés par le calcium et lors de la stimulation suivante, plus de calcium serait alors disponible pour stimuler la libération de neurotransmetteur.

Des acteurs post-synaptiques peuvent également jouer un rôle dans les phénomènes de plasticité à court terme, même s'ils semblent avoir une part moins importante que les acteurs pré-synaptiques (Zucker and Regehr, 2002). En effet, la désensibilisation des récepteurs AMPA joue un rôle dans la transmission synaptique au niveau de nombreuses synapses (Zucker and Regehr, 2002). Il a été montré que l'inhibition de la désensibilisation des récepteurs AMPA réduisait partiellement la dépression à court terme lors de trains de stimulation au niveau du Calyx de Held chez le poulet (Brenowitz and Trussell, 2001). Cependant, l'implication de la désensibilisation des récepteurs dans les mécanismes de plasticité à court terme varie fortement en fonction de la synapse étudiée (Xu-Friedman and Regehr, 2004). Par exemple, ce phénomène n'est retrouvé ni pour les synapses cortico-striatales, ni pour les synapses thalamo-striatales chez la souris (Ding et al., 2008). La diffusion latérale des récepteurs au niveau de la membrane post-synaptique pourrait également être impliquée dans les phénomènes de plasticité à court terme (Choquet and Triller, 2013). Par exemple, il a été montré qu'une réduction de la diffusion latérale des récepteurs AMPA pouvait entraîner des modifications de la plasticité à court terme sur des cultures primaires de neurones hippocampiques (Frischknecht et al., 2009).

3.2. Plasticité à court-terme de la synapse cortico-sous-thalamique

Une seule étude s'est intéressée à proprement parler à la synapse cortico-NST *in vitro* (Bosch et al., 2012). En effet, en s'appuyant sur des techniques de traçage neuronal et de reconstruction 3D, les auteurs ont mis au point une tranche de cerveau permettant de conserver intacte une partie des fibres cortico-NST chez le rat. Dans cette étude, la plasticité à court terme de la voie cortico-NST a été étudiée en appliquant des protocoles de stimulation directement au niveau de la couche VI du cortex orofacial. Ces protocoles étaient composés de deux chocs électriques plus ou moins rapprochés dans le temps, ce qu'on appelle stimulations appariées ou paired-pulse en anglais. Les résultats obtenus montrent que la synapse cortico-NST n'exprime pas de plasticité à court terme lorsqu'on applique deux stimulations à des fréquences comprises entre 5 et 40 Hz (**figure 25**).

Les autres études se sont plutôt intéressées à l'ensemble des synapses glutamatergiques du NST en utilisant des stimulations électriques de la capsule interne (Farries et al., 2010) (Yamawaki et al., 2012) ou du NST directement (Shen et al., 2003). Parmi ces études, seulement deux apportent des éléments concernant la plasticité de la voie cortico-NST (Shen

et al., 2003; Yamawaki et al., 2012). Premièrement, ces deux études montrent que les synapses glutamatergiques du NST n'expriment pas de plasticité à court terme après deux chocs électriques à 20 Hz, même si on note une légère tendance à la facilitation dans un cas (Shen et al., 2003) et à la dépression à court terme dans l'autre (Yamawaki et al., 2012), ce qui est en accord avec les données obtenues par Bosch et coll. Deuxièmement, l'étude de Shen et coll. met en évidence trois types de plasticité exprimés à la suite d'une stimulation à haute fréquence des afférences glutamatergiques du NST : une potentialisation à court terme ainsi qu'une potentialisation et une dépression à long terme (Shen et al., 2003). La potentialisation à court terme observée dans cette étude s'apparente fortement au phénomène de potentialisation post-tétanique décrit au paragraphe 3.1.3, ce qui est appuyé par l'origine pré-synaptique du phénomène observé par Shen et coll. Cependant, ce type de plasticité ne concernerait qu'une faible proportion des neurones du NST. En effet, seulement 4 neurones sur 46 enregistrés exprimaient ce type de plasticité selon cette étude.

Ainsi, peu d'informations sont disponibles concernant la plasticité à court terme de la synapse cortico-NST. De plus, ces résultats ont été obtenus à partir de protocoles utilisant uniquement deux stimulations successives ou des stimulations à très haute fréquence (100 Hz), ce qui n'apporte que peu d'informations concernant la réaction de cette synapse en conditions physiologiques.

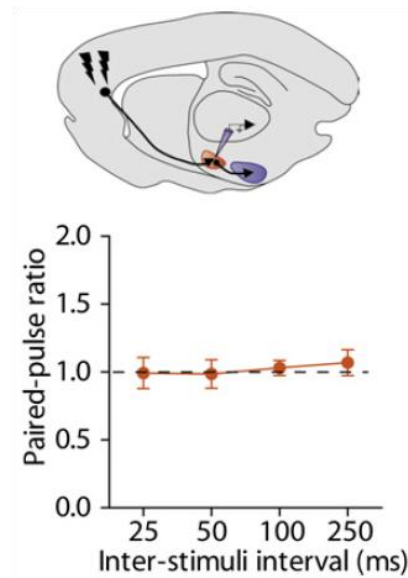


Figure 25 : Plasticité synaptique à court terme de la synapse cortico-sous-thalamique.

Haut : Schéma du protocole expérimental permettant d'obtenir le profil de plasticité à court terme de la synapse cortico-sous-thalamique en stimulant directement les neurones du cortex sur des tranches parasagittales de cerveau de rat et en enregistrant les neurones sous-thalamiques en patch-clamp, configuration cellule entière. Bas : Des stimulations appariées plus ou moins rapprochées dans le temps ont permis d'obtenir les valeurs de paired-pulse ratio (PPR), correspondant à l'amplitude du deuxième EPSC rapportée à celle du premier pour des écarts de stimulation allant de 25 à 250 ms. Le PPR est égal à 1 quel que soit l'écart entre les stimulations, ce qui implique que la synapse cortico-sous-thalamique n'exprime pas de plasticité à court terme aux fréquences étudiées. D'après Bosch 2012 (Bosch et al., 2012).

DEMARCHE SCIENTIFIQUE

Les **ganglions de la base** sont un ensemble de structures sous-corticales impliquées dans la motricité volontaire, mais aussi dans des aspects plus cognitifs et motivationnels du comportement moteur (Haber, 2003). La **dopamine** est un neuromodulateur essentiel au bon fonctionnement des ganglions de la base. En effet, des taux anormaux de dopamine au sein des ganglions de la base entraînent des dérégulations fonctionnelles de ce réseau, à l'origine de diverses pathologies motrices, comme par exemple la **maladie de Parkinson** (Meissner et al., 2011).

Comme son nom l'indique, la **synapse cortico-sous-thalamique** est une synapse **glutamatergique** (excitatrice) transmettant les informations corticales au **noyau sous-thalamique**, ce qui forme la première partie de la **voie hyperdirecte** des ganglions de la base. Le noyau sous-thalamique est un composant essentiel des ganglions de la base puisqu'il en est le seul noyau glutamatergique. Ainsi, la synapse cortico-sous-thalamique forme, avec la synapse cortico-striatale, une voie d'entrée des informations corticales dans le réseau des ganglions de la base (Mathai and Smith, 2011).

Malgré les résultats obtenus, notamment chez l'Homme, montrant l'implication de la voie cortico-sous-thalamique dans des **tâches de type « go-no-go »** (inhibition d'un acte moteur débuté) (Aron and Poldrack, 2006; Jahfari et al., 2011; Forstmann et al., 2012) et dans les effets bénéfiques de la **stimulation cérébrale profonde** du noyau sous-thalamique sur les symptômes de la maladie de Parkinson (Li et al., 2012; Degos et al., 2013), les propriétés des synapses cortico-sous-thalamiques ont très peu été étudiées jusqu'ici. En effet, l'anatomie particulière de la voie cortico-sous-thalamique rend difficile l'étude spécifique de cette synapse *in vitro* (Beurrier et al., 2006; Bosch et al., 2012). L'identification des axones corticaux pré-synaptiques est nécessaire, ces derniers projetant sur le noyau sous-thalamique via un faisceau d'axones, la capsule interne, qui regroupe de nombreuses autres fibres ascendantes et descendantes. De ce fait, les propriétés de **plasticité à court terme** de la synapse cortico-sous-thalamique sont très peu décrites, alors que ces dernières doivent influencer considérablement la façon dont deux structures cérébrales communiquent.

Il a également été démontré que des **récepteurs dopaminergiques D5 (RD5)** étaient exprimés sur les dendrites des neurones du noyau sous-thalamique, à proximité des synapses glutamatergiques, et qu'ils favorisaient le mode de décharge en bouffée de ces neurones (Baufreton et al., 2003; Baufreton et al., 2005b). Cependant, malgré leur proximité avec les

synapses glutamatergiques, aucune étude n'a rapporté d'effet des RD5 sur la transmission glutamatergique au niveau du NST. Pourtant, plusieurs études ont montré que les récepteurs de la famille D1 (D1 et D5) avaient la capacité de moduler la transmission glutamatergique en agissant, entre autres, sur l'état de phosphorylation des **récepteurs AMPA** (Greengard, 2001).

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier les propriétés de plasticité à court terme de la synapse cortico-sous-thalamique, ainsi qu'une éventuelle modulation de cette synapse par les RD5.

Nous avons émis l'hypothèse que les récepteurs D5 étaient capables de moduler la transmission glutamatergique au niveau de la synapse cortico-sous-thalamique en agissant sur les récepteurs AMPA, contrôlant ainsi la transmission excitatrice rapide au niveau de cette synapse.

Afin de pouvoir étudier la synapse cortico-sous-thalamique, nous avons choisi d'utiliser l'optogénétique *in vitro* qui nous a permis de contourner les problèmes anatomiques empêchant d'étudier spécifiquement la synapse cortico-sous-thalamique sur tranche de cerveau.

Pour étudier l'impact des récepteurs D5 sur la synapse cortico-sous-thalamique, nous avons utilisé plusieurs outils pharmacologiques associés à deux modèles de souris transgéniques : les souris D1 *-/-* et les souris D5 *-/-*. En effet, les outils pharmacologiques actuels ne permettent pas de discriminer entre récepteur D1 et récepteur D5.

Ces différentes approches ont été utilisées en combinaison avec la technique de patch-clamp en configuration cellule entière sur des tranches sagittales de cerveau de rongeur qui nous a permis d'enregistrer l'activité électrophysiologique des neurones corticaux et sous-thalamiques.

Au cours de cette thèse, nous avons donc cherché à répondre aux 4 questions :

- 1. Est-il possible de contrôler l'activité des neurones pyramidaux de la couche V du cortex en utilisant l'optogénétique *in vitro* ?
- 2. L'optogénétique *in vitro* est-elle une technique adaptée à l'étude de la transmission synaptique et des phénomènes de plasticité à court terme ?

- 3. L'activation du récepteur D5 a-t-elle un effet sur la transmission synaptique dépendante des récepteurs AMPA au niveau de la synapse cortico-sous-thalamique ? Si oui, par quels mécanismes intracellulaires le récepteur D5 exerce-t-il ses effets sur la synapse cortico-sous-thalamique ?
- 4. Quel est le profil de plasticité à court terme exprimé par la synapse cortico-sous-thalamique ?

MATERIEL ET METHODES

1. ANIMAUX

Les expériences décrites dans cette thèse ont été réalisées en accord avec la directive du 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) du Conseil de la Communauté Européenne concernant l'utilisation des animaux de laboratoire. Les protocoles expérimentaux ont été validés par le comité d'éthique en expérimentation animale de Bordeaux (C2E-A n°50) et ont reçu le n° d'agrément CE5012077-A.

Deux espèces animales ont été utilisées au cours de cette thèse : la souris (*Mus musculus*) en raison de la diversité des modèles transgéniques disponibles chez cette espèce et le rat (*Ratus norvegicus*) qui est actuellement l'un des meilleurs modèles d'étude de la maladie de Parkinson.

Quatre types de souris de fond génétique C57bl6/J ont été utilisés :

- ✓ sauvages
- ✓ D1 -/- (dont l'utilisation a été autorisée par J. Drago (Univ. Monash, Australie et provenant de la colonie établie par F. Gonon (Bordeaux)),
- ✓ D5 -/- (dont l'utilisation a été autorisée par J. Sibley NINDS, Bethesda, USA et la colonie formée à partir d'animaux donnés par D.Waddington, Royal College of Surgeons, Dublin, Ireland)
- ✓ Thy1::ChR2 (lignée 18 ; achetées au Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA).

Chez les souris D1 -/- et D5 -/-, le gène codant respectivement pour le récepteur D1 ou D5 est tronqué, ce qui entraîne une perte de fonction du récepteur D1 ou D5 chez ces animaux (Drago et al., 1994; Holmes et al., 2001). Ces souris nous ont permis de discriminer entre récepteur D1 et récepteur D5 lors des expériences de pharmacologie, ce qui est pour le moment impossible avec la pharmacologie classique (voir paragraphe 5.3.6).

La lignée Thy1::ChR2 est caractérisée par l'expression de la channelrhodopsine de type 2 (ChR2) au niveau de plusieurs structures cérébrales (Arenkiel et al., 2007; Wang et al., 2007). La lumière active les neurones exprimant cette protéine (détails au paragraphe 2 ci-dessous). La lignée 18 a été utilisée car il a été rapporté que seul le cortex (couche V uniquement) exprimait cette protéine parmi les structures projetant sur le noyau sous-thalamique (NST) (Gradinaru et al., 2009). Nous avons utilisé les animaux hétérozygotes (+/-)

de cette lignée pour étudier la voie cortico-sous-thalamique (cortico-NST) à l'aide de l'optogénétique à la suite d'un conseil du Dr Feng.

Les types d'animaux utilisés et les expériences réalisées au cours de la thèse sont détaillés dans la **figure 26**.

2. OPTOGENETIQUE

2.1. Généralités

L'optogénétique est une technique apparue très récemment (milieu des années 2000) et qui a rapidement suscité un très vif intérêt dans le domaine des Neurosciences. En effet, cette technique permet, en combinant optique et génétique, de contrôler de manière sélective l'activité électrique des neurones avec une excellente résolution temporelle et spatiale, ce qui était impossible auparavant avec les approches habituelles de lésion, de stimulation électrique ou de pharmacologie. C'est l'utilisation des divers outils génétiques préexistants dans le but de restreindre l'expression de protéines canaux sensibles à la lumière appelées opsines (d'où le terme « opto ») à une seule population de neurones qui a donné naissance à cette technique (Pastrana, 2010; Deisseroth, 2011; Fenno et al., 2011). Selon l'opsine choisie, il est possible de stimuler ou d'inhiber spécifiquement une population de neurones, voire de cibler une structure entière (**figure 27**). Il est donc possible de mesurer l'évolution de plusieurs variables (génétiques, électrophysiologiques, comportementales) à différents niveaux d'étude (cellule, synapse, réseau de neurones, comportement) en réponse à des modifications d'activité électrique imposées *via* la lumière, par l'expérimentateur.

2.2. Justification de l'approche utilisée

Nous avons utilisé l'optogénétique afin de cibler spécifiquement la voie cortico-NST. En effet, cette voie est le plus souvent coupée lors de la réalisation de tranches de cerveaux pour l'électrophysiologie *in vitro* (Beurrier et al., 2006; Bosch et al., 2012). Il est donc difficile, voire impossible, de stimuler directement les corps cellulaires des neurones pyramidaux du cortex projetant sur le NST et d'enregistrer les réponses synaptiques ainsi évoquées au niveau du NST. C'est pourquoi, jusqu'ici, la stimulation électrique de la capsule interne, lieu de passage des fibres cortico-NST, a été privilégiée (Farries et al., 2010; Yamawaki et al., 2012). Pourtant, la capsule interne est le lieu de passage d'autres fibres

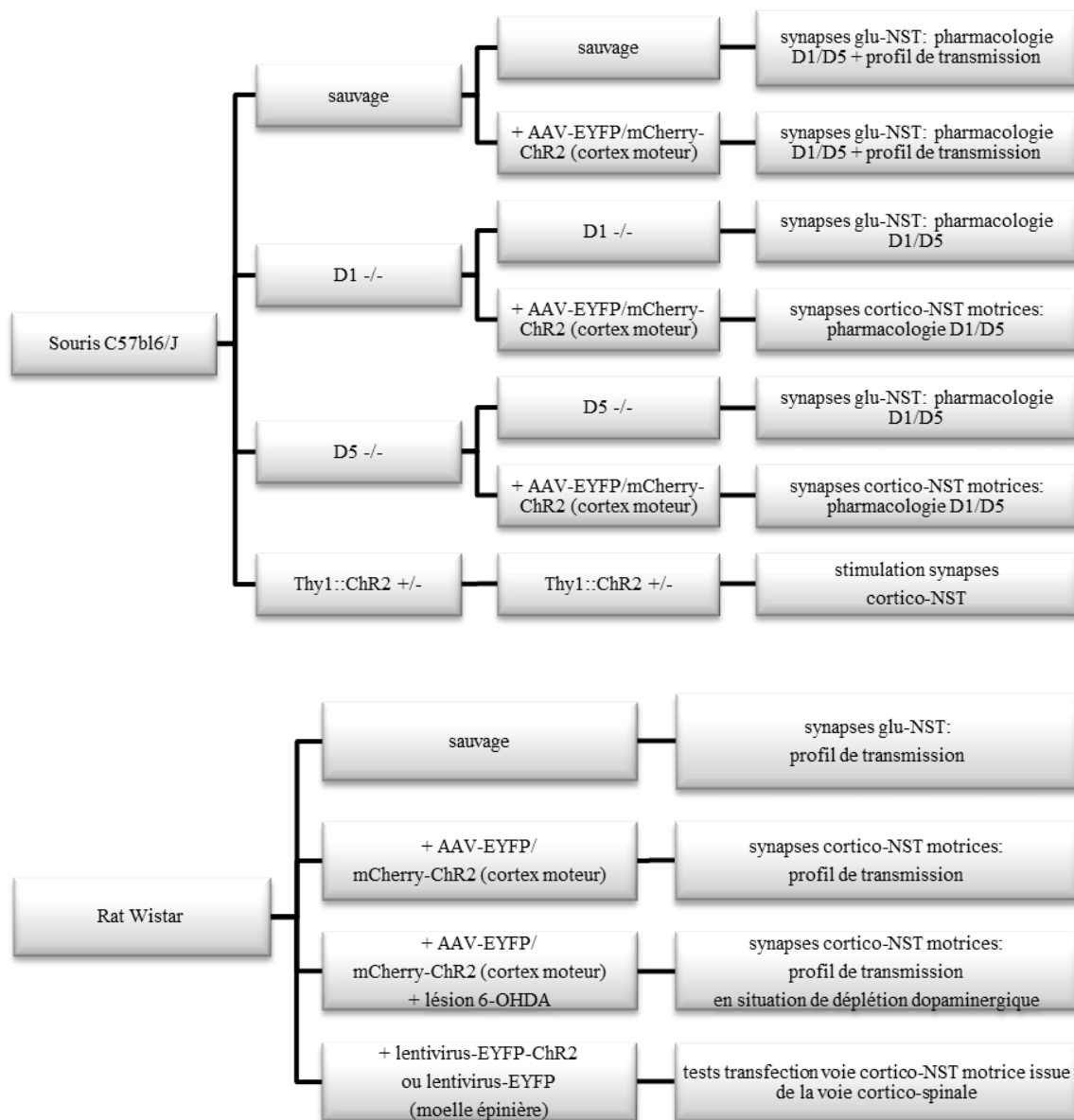


Figure 26 : Arbres récapitulatifs des types d'animaux utilisés et des expériences réalisées au cours de la thèse.

Synapses « glu-NST » désigne les synapses glutamatergiques du NST ; la transmission synaptique est évoquée par stimulation électrique de la capsule interne. Synapses « cortico-NST motrices » désigne les synapses glutamatergiques formées dans le NST par les axones des neurones du cortex moteur ; le cortex moteur exprime une protéine de fusion ChR2-protéine reportrice (EYFP ou ChR2-mCherry) ; la transmission synaptique est évoquée par stimulation optique des fibres ChR2-protéine reportrice positives de la capsule interne ou du NST lui-même. Synapses « cortico-NST » désigne les synapses glutamatergiques cortico-sous-thalamiques ; la couche V du cortex exprime la protéine de fusion ChR2-EYFP (Wang et al., 2007; Gradinaru et al., 2009) ; la transmission synaptique est évoquée par stimulation optique des fibres ChR2-YFP-positives de la capsule interne ou du NST.

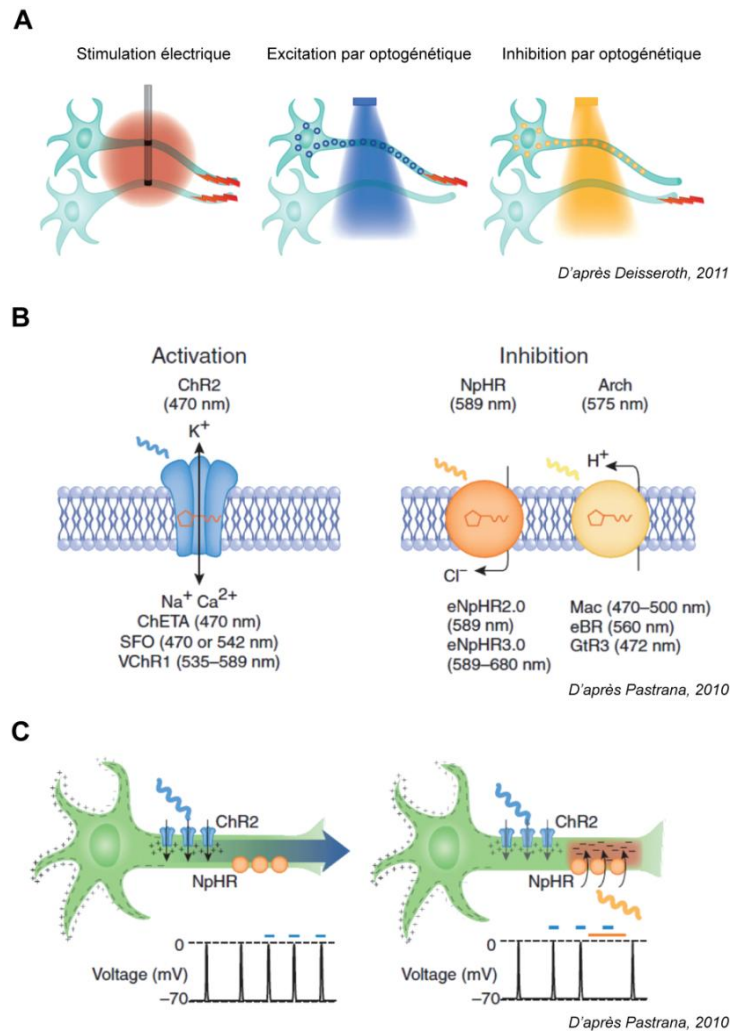


Figure 27 : Principe de la technique d'optogénétique et différents types d'opsines.

A. Contrairement à la stimulation électrique qui est aspécifique, l'optogénétique utilise des outils génétiques qui permettent de faire exprimer des protéines-canaux sensibles à la lumière (les opsines) au niveau de la membrane plasmique des neurones ciblés. Elle permet de contrôler, grâce à la lumière, l'activité électrique d'une seule population neuronale (ici, une lumière bleue pour l'activation et jaune pour l'inhibition). La présence d'un éclair signifie que le neurone est actif. D'après Deisseroth 2011 (Deisseroth, 2011). **B.** A gauche, les opsines excitatrices, dont ChR2 est le membre typique ; à droite, les opsines inhibitrices dont NpHR et Arch sont représentatives. Les opsines sont associées à une molécule de rétinol qui leur confère la sensibilité à la lumière pour une longueur d'onde spécifique (chiffres entre parenthèses). Selon leur perméabilité ionique (aux ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ pour ChR2) ou l'ion qu'elles transportent (Cl⁻ pour NpHR et H⁺ pour Arch), elles peuvent dépolariser (activer) ou hyperpolariser (inhiber) le neurone en réponse à la stimulation lumineuse. ChR2 = channelrhodopsin-2, NpHR = halorhodopsin, Arch = archaerhodopsin, BR = bacteriorhodopsin. D'après Pastrana, 2010 (Pastrana, 2010). **C.** A gauche : Représentation schématique d'une excitation due à la stimulation de ChR2 et tracé électrophysiologique présentant la dépolarisation correspondante (trait bleu). A droite : Représentation schématique d'une excitation (ChR2) combinée à une inhibition (NpHR) et tracé électrophysiologique présentant la dépolarisation correspondant à l'excitation seule (trait bleu) et l'absence de dépolarisation provenant de l'inhibition par NpHR, malgré la stimulation de ChR2 (trait bleu + trait orange). D'après Pastrana 2010 (Pastrana, 2010).

glutamatergiques (thalamiques et pédonculopontines) et GABAergiques (globus pallidus externe ou GPe) projetant sur le NST. La stimulation électrique de la capsule interne ne permet donc pas l'étude spécifique de la transmission synaptique cortico-NST.

De nombreux cortex projettent vraisemblablement sur le NST (Bosch et al., 2012; Haynes and Haber, 2013). Nous avons choisi d'étudier spécifiquement les projections du cortex moteur sur le NST en raison du rôle de ce noyau dans le mouvement volontaire.

2.3. Mise en place de la technique

Pour étudier la synapse cortico-NST, il était nécessaire d'obtenir une transmission synaptique et donc de pouvoir activer cette synapse. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser ChR2, qui entraîne une entrée massive de cations (Na^+ et K^+ principalement, avec $P_{\text{K}^+} / P_{\text{Na}^+} = 0.5$; une faible entrée de Ca^{2+} mais pas de Mg^{2+}) lorsqu'elle est illuminée avec de la lumière bleue (473 nm) (Nagel et al., 2003) (fig.X B-C). Cette entrée massive de cations en réponse à la stimulation lumineuse dépolarise les neurones ChR2-positifs et mène, ainsi, à leur activation. Afin d'obtenir une expression de la ChR2 au niveau des fibres cortico-NST, nous avons employé deux stratégies. Dans un premier temps, nous avons utilisé une lignée de souris transgéniques (Thy::ChR2, lignée 18) qui expriment de façon intrinsèque la ChR2 associée à la protéine fluorescente EYFP dans les neurones cortico-NST (Gradinaru et al., 2009). Cependant, nous avons découvert que ce modèle présente plusieurs inconvénients (dont l'expression ectopique de ChR2 dans les neurones sous-thalamiques, voir résultats et discussion), ce qui nous a conduits à utiliser des vecteurs d'expression viraux, conduisant à une transgénèse temporaire, que nous avons directement injectés dans le cortex moteur par stéréotaxie (**figure 26**). Nous avons alors utilisé la ChR2 (H134R) que nous avons choisie pour ses meilleurs taux d'expression et d'efficacité que ceux de la ChR2 sauvage (Berndt et al., 2011; Fenno et al., 2011). Les virus utilisés (**tableau 1**) sont des virus antérogrades (adéno-associated virus de sérotype 2/1 ou AAV2/1) qui permettent de faire exprimer une protéine issue de la fusion de ChR2 et d'une protéine reportrice fluorescente (EYFP ou mCherry selon le virus) au niveau de la membrane des neurones infectés. L'expression est placée sous le contrôle du promoteur du gène de la synapsine humaine « hsynapsin » (hSyn), spécifique des neurones (Bogen et al., 2009; Diester et al., 2011).

Les fibres cortico-NST étant en majeure partie des collatérales de la voie cortico-spinale (Kita and Kita, 2012), nous avons aussi essayé d'injecter un lentivirus de type rétrograde dans

la moelle épinière afin de cibler plus précisément les neurones cortico-NST impliqués dans le contrôle direct des actes moteurs (Kato et al., 2007; Kato et al., 2011). Les lentivirus rétrogrades testés au cours de ces expériences préliminaires sont présentés dans le **tableau 1**

3. INJECTIONS STEREOTAXIQUES

La stéréotaxie est une technique chirurgicale utilisée pour repérer et cibler précisément une structure cérébrale ou médullaire. Cette technique a ici été utilisée dans deux buts distincts : injecter une solution virale dans le cerveau ou dans la moelle épinière, et injecter une neurotoxine (la 6-hydroxydopamine ou 6-OHDA) dans le cerveau.

3.1. Injection intracérébrale de virus et/ou de neurotoxine (6-OHDA)

Les injections intracérébrales ont été réalisées sur des rats âgés de 17 à 24 jours (30-55 g) et des souris âgées de 21 à 28 jours (7-12 g).

3.1.1 Protocole chirurgical

Les animaux ont été anesthésiés avec de l'isoflurane (induction à 3 % et maintien à 1,5 %) ou par injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (75 mg.kg⁻¹/10 mg.kg⁻¹). Les étapes du protocole chirurgical utilisé sont les mêmes pour l'injection de virus et de neurotoxine. Après avoir placé les animaux sur un cadre stéréotaxique numérique (Kopf) et appliqué un gel ophtalmique (Ocryl-gel) sur les yeux de l'animal, la tête de l'animal a été rasée et de la bétadine dermique 10% appliquée sur la peau du crâne. Le crâne a été mis à nu puis séché afin de distinguer deux repères anatomiques : bregma et lambda. La position du crâne a été ajustée afin d'aligner le bregma et le lambda sur l'axe horizontal puis l'appareil stéréotaxique a été étalonné à partir des coordonnées du bregma. Une craniotomie a alors été réalisée au niveau des coordonnées stéréotaxiques correspondant aux structures choisies. Ensuite, les différentes solutions ont été injectées par pression dans les structures ciblées au moyen d'une canule reliée à un pousse-seringue (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) ou d'un picosprizer (Parker, France). Après chaque point, la canule a été maintenue sur le site d'injection pendant 5 min avant d'être retirée afin que la substance injectée puisse diffuser dans le tissu. Une fois les injections terminées, la peau du crâne a été suturée et désinfectée avec de la bétadine dermique 10%. Après récupération de l'anesthésie, les animaux ont été

Vecteur	Type	Fournisseur	Titre	Spécificité d'expression
rAAV2/1-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-hGH	virus adéno-associé (antérograde)	University of Pennsylvania Vector Core facility	$9,22.10^{12}$ (copies.mL ⁻¹)	neuronale
rAAV2-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-hGH	virus adéno-associé (antérograde)	University of North Carolina - Virus vector core facility	2.10^{12} (copies.mL ⁻¹)	neuronale
rAAV2-hSyn-hChR2(H134R)-mCherryWPRE-hGH	virus adéno-associé (antérograde)	University of North Carolina - Virus vector core facility	3.10^{12} (copies.mL ⁻¹)	neuronale
FuG-B -MND-EGFP-WPRE	lentivirus (rétrograde)	Plateforme génomique fonctionnelle (Université de Bordeaux)	$7,43.10^8$ (PI.mL ⁻¹)	constitutive
FuG-B-CamKII α -hChR2-EYFP-WPRE	lentivirus (rétrograde)	Plateforme génomique fonctionnelle (Université de Bordeaux)	$7,43.10^8$ (PI.mL ⁻¹)	neurones glutamatergiques
rRABV-mCherry	lentivirus (rétrograde)	Dr. A.Frick, Inserm U862, Bordeaux	-	neuronale

Tableau 1 : Vecteurs viraux utilisés pour les expériences d'optogénétique.

Les autorisations d'utiliser ces virus ont été obtenues du Dr. K. Deisseroth, du Dr. K. Kobayashi et du Dr. A. Frick.

surveillés pendant 2 heures après l'opération, puis chaque jour pendant les 3 premiers jours post-opératoires.

3.1.2 Injection de solution virale

Lors des injections de solution de virus antérograde au niveau du cortex moteur (M1), 6 points d'injection ont été réalisées chez le rat et 3 chez la souris (0,5 μL par point à 0,5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Les coordonnées utilisées sont détaillées dans les **tableaux 2 et 3**.

3.1.3 Injection de neurotoxine (6-OHDA)

Mode d'action de la 6-OHDA

Afin d'étudier la synapse cortico-NST en condition normale et en condition de déplétion dopaminergique, nous avons utilisé un modèle animal d'étude de la maladie de Parkinson : le rat lésé à la 6-OHDA (Blandini et al., 2008). La 6-OHDA est une neurotoxine spécifique des neurones catécholaminergiques ayant la capacité de pénétrer dans ces derniers par les transporteurs des catécholamines. Une fois dans les neurones, la 6-OHDA entraîne une forte augmentation des taux de radicaux libres dans le cytoplasme en s'oxydant et inhibe le métabolisme cellulaire en bloquant la chaîne de transport des électrons, ce qui conduit rapidement à la mort des neurones catécholaminergiques (Schober, 2004). Ainsi, l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale, lieu de passage des fibres dopaminergiques de la voie nigro-striatale, entraîne la destruction rétrograde des corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc), ce qui mime la dégénérescence caractéristique de la maladie de Parkinson.

Injections de 6-OHDA

Pour réaliser ces lésions, 2 injections unilatérales (1 μL par point, 0,5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) de 6-OHDA (4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ dans du NaCl 0,9 % contenant 0,02% d'ascorbate) ont été réalisées au niveau du faisceau médian du télencéphale chez le rat (AP : -2,4 mm ; L : -1,2 mm ; P : -7,9 et -7,4 mm). De plus, une solution de désipramine 0,4 % (5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) a été injectée par voie intrapéritonéale 20 min avant l'injection de 6-OHDA afin de protéger les neurones noradrénergiques lors de la lésion.

Axe	Points 1 et 2	Points 3 et 4	Points 5 et 6
Antéro-postérieur	+2,0 mm	+2,0 mm	+1,5 mm
Latéral	-2,4 mm	-3,0 mm	-2,4 mm
Profondeur	-2,0 / -1,5 mm	-2,0 / -1,8 mm	-1,9 / -1,6 mm

Tableau 2 : Coordonnées stéréotaxiques du cortex moteur (M1) chez le rat âgé de 17 à 24 jours.

Axe	Point 1	Point 2	Point 3
Antéro-postérieur	+1,4 mm	+1,15 mm	+1,4 mm
Latéral	-1,125 mm	-1,125 mm	-1,375 mm
Profondeur	-1,275 mm	-1,275 mm	-1,475 mm

Tableau 3 : Coordonnées stéréotaxiques du cortex moteur (M1) chez la souris âgée de 21 à 28 jours.

Evaluation pré-enregistrement du niveau de lésion

10 à 14 jours après la chirurgie, nous avons évalué le niveau de lésion des rats lésés à la 6-OHDA à l'aide du test du cylindre. Chaque rat a été placé dans un cylindre en verre de 20 cm de diamètre et laissés libres de leurs mouvements. Pendant 5 minutes, les nombres d'appuis réalisés sur la paroi du cylindre avec les pattes avant ipsilatérales et contralatérales à la lésion ont été relevés et exprimés en pourcentage du nombre total d'appuis.

Même si le test du cylindre n'apporte qu'une information qualitative sur le niveau de lésion, il existe une forte corrélation entre le score comportemental (asymétrie motrice) et le degré de déplétion dopaminergique (Miguel et al., 2012). Ce test nous a permis de sélectionner uniquement les animaux ayant une déplétion sévère en dopamine pour nos expériences d'électrophysiologie. L'efficacité des lésions a été confirmée par immunohistochimie après les enregistrements électrophysiologiques (voir paragraphe 4.3).

3.2. Injection de solution de virus rétrograde dans la moelle épinière

Les injections intra médullaires ont été réalisées sur des rats âgés de 17 à 24 jours (30-55g). Deux niveaux de la moelle épinière ont été ciblés : C2 et L4. Ces niveaux ont été choisis afin d'augmenter nos chances de transfecter un grand nombre de neurones cortico-spinaux. Il a en effet été rapporté que les neurones cortico-spinaux projetaient massivement au niveau de ces deux zones (Kamiyama et al., 2006; Groutsi et al., 2008; Kiritani et al., 2012).

Les animaux ont été anesthésiés avec de l'isoflurane (induction à 3 % et maintien à 1,5 %) et un gel ophtalmique a été appliqué sur leurs yeux. Après avoir incisé la peau et écarté les muscles pour visualiser la colonne vertébrale, les vertèbres C2 ou L1 (le niveau L4 de la moelle épinière se situe sous L1 à cet âge chez le rat) ont été identifiées à l'aide d'une loupe binoculaire à partir de repères anatomiques tels que l'apparence des vertèbres et des processus épineux. Une laminectomie a alors été pratiquée de façon à mettre à jour la moelle épinière au niveau de la zone ciblée. L'animal a ensuite été placé délicatement sur un cadre stéréotaxique et la solution virale a été injectée à 0,4 mm de la ligne médiane et 0,7 mm de profondeur à l'aide d'une canule reliée à un pousse-seringue (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) (0,6 à 1 μL par point, 0,1 à 0,3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min sur site avant retrait). Les muscles et le tissu conjonctif ont été suturés à l'aide de fils résorbables et la peau à l'aide de fils non-résorbables. Après récupération de l'anesthésie, les animaux ont été surveillés pendant 2 heures après l'opération, puis chaque jour pendant les 6 premiers jours post-opératoires.

Ce type de chirurgie entraînant des lésions musculaires et des cicatrices plus importantes que les injections intracérébrales, les animaux ont reçu une injection d'antidouleur 15 min avant la chirurgie (meloxicam, s.c, 1 mg.kg⁻¹) et d'antibiotique à large spectre à la fin de la chirurgie (baytril, s.c, 5 mg.kg⁻¹). Les injections d'antidouleur et d'antibiotique ont été poursuivies respectivement pendant deux et cinq jours post-opératoires.

4. IMMUNOHISTOCHEMIE

4.1. Prélèvement et préparation des tissus (cerveau et moelle épinière)

Les expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur deux types de tissus : des coupes fines de 50 µM d'épaisseur (sagittales et coronales de cerveau et coronales de moelle épinière) ou des tranches sagittales de cerveau de 350 µM d'épaisseur après enregistrement électrophysiologique (pour la préparation des tranches de 350 µM voir paragraphe 5.1). Les coupes de 50 µM ont été préparées par fixation d'animaux de 35 à 50 jours par perfusion intracardiaque de tampon phosphate (phosphate buffer saline, PBS 0,1M) puis de paraformaldéhyde (PFA) à 4%, post-fixation des tissus dans du PFA 4% à 4°C pendant la nuit, cryoprotection dans du PBS 0,1M additionné de sucrose à 20%, congélation des tissus par immersion dans de l'isopentane à -45°C, conservation à -80°C, et enfin réalisation des coupes à l'aide d'un cryostat à -19°C. Les tranches de 350 µM ont été fixées avec du PFA 4% à la fin des enregistrements électrophysiologiques. Tous les tissus ont été conservés à 4°C dans du PBS (0,1M) additionné d'azide de sodium à 0,2% en attendant d'être traités.

4.2. Immunofluorescence

Toutes les étapes ont été réalisées sous agitation et à température ambiante. Les coupes ont été rincées dans du PBS 0,1M (2x5min) puis incubées 60 min dans du PBS 0,1M contenant 1% d'albumine bovine (BSA, Bovine Serum Albumin) et 0,3 % de Triton afin de saturer les sites aspécifiques et de perméabiliser les membranes. Ensuite, les coupes ont été incubées 1 nuit avec l'anticorps primaire en PBS -BSA 1%-Triton 0,3%. Après rinçage dans du PBS 0,1M (6x5min), une incubation de 2h avec l'anticorps secondaire porteur d'un fluorochrome a été réalisée. Après une dernière étape de rinçage dans du PBS 0,1M, les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage préservant la fluorescence (Vectashield™ H-1000, Vector laboratories, USA) ou (Vectashield™ H-1200 qui

contient du DAPI pour marquer les noyaux, Vector laboratories, USA). Tous les anticorps primaires et secondaires utilisés pour les révélations par immunofluorescence sont présentés dans le **tableau 4**.

4.3. Révélation de la tyrosine hydroxylase par réaction enzymatique

La révélation de la tyrosine hydroxylase (TH) nous a permis de nous assurer que la déplétion dopaminergique unilatérale que nous effectuons pour obtenir un modèle expérimental de la maladie de Parkinson était suffisante. Le protocole de lésion et l'évaluation pré-enregistrement du déficit moteur sont décrits au parag. 3.1. Les animaux du groupe « lésé » doivent avoir moins de 25 % de fibres TH positives dans le striatum du côté lésé par rapport au côté témoin (Miguel et al., 2012). Le protocole a donc été appliqué sur les tranches de cerveaux de rats lésés à la 6-OHDA préparées en même temps que celles utilisées pour l'électrophysiologie (de 350 µm d'épaisseur et contenant le striatum). Toutes les étapes ont été faites sous agitation et à température ambiante.

Après rinçage dans du PBS 0,1M (6x5min), les tranches ont été incubées 30 min dans du PBS 0,1M contenant de l'H₂O₂ à 3% afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Elles ont alors été rincées dans du PBS 0,1M (2x5min), puis incubées 30 min dans du PBS-BSA 1%-Triton 3%. Ensuite, les tranches ont été mises en présence d'un anticorps primaire monoclonal anti-TH Clone LNC1, produit chez la souris, au 1/10 000^e (Millipore, USA) en PBS-BSA 1%-Triton 0,3% pendant une nuit. Après un rinçage dans du PBS 0,1M (6x5min), les tranches ont été incubées 1h30 avec un anticorps secondaire anti-souris biotinylé, au 1/1000^e (VectastainTM ABC kit elite PK6200, Vector Laboratories, USA). Un rinçage dans du PBS 0,1M (6x5min) a été réalisé avant d'incuber les tranches dans un complexe avidine - peroxydase biotinylée au 1/500^e (VectastainTM ABC kit elite PK6200, Vector Laboratories, USA). Ce complexe a la capacité de se fixer à la biotine de l'anticorps secondaire via l'avidine. Ainsi, lors de l'addition d'un substrat chromogène, l'oxydation de ce dernier par la peroxydase forme un précipité rouge qui permet de détecter la TH. Après avoir rincé les tranches au PBS 0,1M (6x5min), la TH a donc été révélée grâce à l'incubation des tranches avec une solution contenant un substrat chromogène (ImmPACTTM AMEC red SK-4285, Vector laboratories, USA). Une dernière étape de rinçage dans du PBS 0,1M (6x5min), puis dans de l'eau distillée (5min) a été réalisée avant montage des tranches entre lame et lamelle (VectaMountTM AQ H-5501, Vector Laboratories, USA).

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Espèce	Fournisseur
anti-GFP	-	1/1000 ^e	lapin	Invitrogen (A11122)
anti-NeuN	-	1/1000 ^e	souris	Millipore (MAB377)
anti-souris	alexa 647	1/500 ^e	chèvre	Invitrogen (A21236)
streptavidine 568	alexa 568	1/500 ^e	-	Invitrogen (S11226)
anti-lapin	alexa 488	1/500 ^e	âne	Invitrogen (A21206)

Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.

La densité optique du marquage TH dans le striatum a été quantifiée à l'aide du logiciel Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France). Après soustraction du bruit de fond, la densité optique a été mesurée sur les tranches des hémisphères ipsi- et controlatéral contenant le striatum. Le marquage TH du côté lésé a été exprimé en pourcentage de la densité optique obtenue pour le côté intact.

4.4. Acquisition des images en microscopie optique

Deux types de microscope ont été utilisés pour les acquisitions d'images. Les images de microscopie confocale ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal SPE (DM2500 TCS SPE, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) et du logiciel Leica Application Suite AF Lite (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Nous avons également utilisé un microscope à épifluorescence AxioImager M2 (Zeiss, Göttingen, Germany) piloté par le logiciel Morphostrider (Explora Nova, La Rochelle, France). Les images ont ensuite été retravaillées avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

5. ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES

5.1. Préparation des tranches de cerveau

Des tranches sagittales de cerveau de 350 μm d'épaisseur ont été réalisées chez des animaux âgés de 35 à 50 jours. Dans le cas des animaux ayant subi une transfection virale, les tranches étaient donc faites 14 à 21 jours après les injections de virus antérograde dans le cortex moteur, de manière à permettre au virus de faire exprimer la ChR2 au niveau de la membrane des neurones, notamment dans les fibres cortico-sous-thalamiques. De la même manière, les tranches ont été réalisées 14 à 21 jours après l'opération pour les rats ayant subi une lésion à la 6-OHDA.

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (75 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) et xylazine (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Une thoracotomie a alors été effectuée afin de réaliser une perfusion intracardiaque de 20 mL de milieu de prélèvement (composition détaillée au paragraphe 5.2.1) maintenu entre 0 et 4°C et oxygéné par un mélange de 95% d'O₂ et 5% de CO₂. Du fait de sa forte osmolarité et de ses faibles concentrations en sodium et calcium, ce milieu permet de réduire le choc osmotique subit par les neurones, mais aussi

de réduire l'excitabilité et le métabolisme de ces derniers, contribuant ainsi à la survie neuronale. Les animaux ont ensuite été décapités et le cerveau rapidement prélevé avant d'être placé dans le milieu de prélèvement. Les hémisphères ont été séparés au niveau de la ligne médiane à l'aide d'un scalpel puis collés côte à côte sur la plateforme d'un vibratome VT1200S (Leica Microsystems, Nanterre, France). Des tranches de cerveau de 350 μm ont alors été réalisées (vitesse de coupe : 16 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, amplitude des vibrations : 2,75 mm). Les tranches du côté non transfecté ou non lésé ont été conservées et utilisées comme contrôles dans certaines expériences d'immunohistochimie. Les tranches ont alors été placées en suspension sur une membrane de nylon dans un bécher contenant un milieu salin de type Artificial Cerebro Spinal Fluid (ACSF, composition détaillée au paragraphe 5.2.1) saturé avec de l' O_2 95% et du CO_2 5% pendant 1h à 34°C. Parmi les tranches recueillies, seulement 2 à 3 tranches par hémisphère contiennent du noyau sous-thalamique, selon le niveau de coupe et l'espèce utilisée.

5.2. Solutions utilisées

Les solutions utilisées en électrophysiologie sur tranches sont formulées de manière à mimer au maximum les concentrations en ions et l'osmolarité des milieux intracellulaire et extracellulaire des neurones en conditions physiologiques. Ces milieux fournissent également l'énergie (glucose, ATP, GTP) et les conditions optimales nécessaires à la survie des neurones (pH, oxygénation). Il est ainsi possible de maintenir en vie les tranches pendant 8 à 10h dans ces conditions. Dans certains cas, ces milieux sont adaptés en fonction de la question scientifique à laquelle l'expérimentateur souhaite répondre. Par exemple, il est possible d'amplifier ou d'atténuer certains phénomènes électrophysiologiques en jouant sur les concentrations internes ou externes de différents ions ou encore d'y ajouter des substances pharmacologiques.

5.2.1 Solutions de prélèvement et de maintien

Deux milieux ont été utilisés : une solution de prélèvement lors de la coupe (en mM : sucrose 250 ; NaH_2PO_4 1,15 ; KCl 2 ; CaCl_2 0,5 ; NaHCO_3 26 ; MgCl_2 7 ; glucose 11 ; pH 7,4 ; saturé avec de l' O_2 95% et du CO_2 5%) et une solution de type ACSF lors de la phase de « récupération » des tranches à 34°C et pendant les enregistrements (en mM : NaCl 124 ; KCl 3,6 ; CaCl_2 2,4 ; NaHCO_3 26 ; MgCl_2 1,3 ; HEPES 1,25 ; glucose 10 ; pH 7,4 ; équilibré avec

de l'O₂ 95% et du CO₂ 5%). Pour l'étape de repos des tranches après la coupe, ce milieu a été additionné de L-glutathion réduit (5μM) et de pyruvate de sodium (1mM) afin d'alimenter le cycle de Krebs et empêcher la mort cellulaire.

5.2.2 Solutions intracellulaires

Une solution à base de potassium-gluconate (en mM : K-Gluconate 120 ; KCl 10 ; NaCl 10 ; CaCl₂ 1 ; EGTA 11 ; HEPES 10 ; GTP-Na₂ 0,4 ; ATP-Mg 2 ; pH 7,3) et une solution à base de CsCl (en mM : CsCl 130 ; NaCl 10 ; CaCl₂ 1 ; EGTA 11 ; HEPES 10 ; GTP-Na₂ 0,4 ; ATP-Mg 2 ; pH 7,3) ont été utilisées. La première a été utilisée lors des expériences en courant imposé car elle est proche du milieu interne des neurones et respecte le gradient électrochimique des différents ions (sauf celui du Cl⁻). Elle permet donc d'enregistrer leur activité électrique (potentiels d'action, potentiels de plateau, rebonds post-inhibiteurs par exemple) dans des conditions proches des conditions physiologiques. La seconde, quant à elle, a été utilisée lors des expériences en potentiel imposé. En effet, le remplacement du K⁺ par du Cs⁺ inhibe les canaux potassiques responsables des courants de fuite qui participent à l'établissement du potentiel de repos. Cela permet ainsi un meilleur maintien du potentiel de membrane au potentiel imposé par l'expérimentateur, même si ce dernier est différent du potentiel de repos du neurone étudié.

Le potentiel de jonction dû à ces milieux intracellulaires est de - 5mV. Toutes les valeurs de potentiels données ici ont été corrigées « off line ».

5.3. Enregistrements électrophysiologiques : patch-clamp, configuration « cellule entière »

5.3.1 Principe de la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière »

La technique de patch-clamp en configuration cellule entière consiste à établir une continuité électrique entre le cytoplasme d'un neurone et une micropipette en verre remplie d'une solution conductrice. La pipette est elle-même reliée à un amplificateur, puis à des systèmes d'enregistrement et de visualisation des signaux électriques. Il est ainsi possible d'enregistrer et de manipuler l'activité électrique d'un neurone. Deux modes d'acquisition peuvent être utilisés : le mode « courant imposé » et le mode « potentiel imposé ». En « courant imposé », il est possible de manipuler artificiellement l'activité électrique du

neurone par injection de courants via l'électrode, tout en enregistrant son potentiel de membrane. En « potentiel imposé », c'est le courant global passant au travers des canaux ioniques présents sur la membrane du neurone qui est enregistré et le potentiel de membrane qu'il est possible de manipuler.

5.3.2 Installation des tranches dans la chambre d'enregistrement

Les tranches ont été installées dans la chambre d'enregistrement et continuellement perfusées à un débit de 2 à 3 mL.min⁻¹ avec le milieu de type ACSF oxygéné et maintenu à une température comprise entre 32 et 34°C par un régulateur automatique de température (TC-324B, Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Les tranches ont été observées au moyen d'un microscope droit à infrarouge AxioExaminer Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany) et d'une caméra AxioCam MRm (Zeiss, Göttingen, Germany). Deux objectifs ont été utilisés : un objectif 5x permettant de repérer les structures à stimuler et enregistrer, et un objectif 60x permettant d'observer les neurones, de choisir ceux que nous allons enregistrer à partir de leur morphologie et de mettre en place la pipette d'enregistrement.

5.3.3 Enregistrements de patch-clamp en configuration « cellule entière »

Des pipettes d'enregistrement en borosilicate (capillaires de type GC150F-10 ; Harvard Apparatus, Les Ulis, France) d'une résistance de 3 à 5 MΩ pour les enregistrements en potentiel imposé (10 à 12 MΩ dans certains cas nécessitant d'éviter une trop forte dialyse du cytoplasme) et de 5 à 7 MΩ pour les enregistrements en courant imposé ont été préparées avec une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instrument, USA). Elles ont été remplies avec une solution intracellulaire avant d'être approchées à l'aide d'un micromanipulateur (Patchstar, Scientifica, UK) des neurones d'intérêt. Après contact de l'électrode avec le neurone, la membrane de ce dernier a été aspirée dans l'électrode (étape de scellement). Une fois la résistance du scellement supérieure à 1GΩ, le fragment de membrane situé sous la pointe de la pipette a été rompu par application d'une brève dépression dans l'électrode.

5.3.4 Stimulations électriques et optiques

Stimulations électriques de l'ensemble des afférences du NST

Les stimulations électriques ont été réalisées au moyen d'une électrode de stimulation bipolaire « en fourche » reliée à un stimulateur Iso-Flex (A.M.P.I, Jérusalem, Israël) piloté par le logiciel PClamp 9.2 (Molecular devices, Sunnyvale, USA) via une interface digital/analogue (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA). Elles ont été réalisées en courant constant monophasique avec des chocs de 0,1 μ s à une intensité comprise entre 50 et 600 μ A, ajustée de manière à obtenir des réponses synaptiques satisfaisantes sans atteindre la réponse maximum. L'amplitude idéale recherchée était généralement comprise entre 50 et 100 pA.

Stimulations optiques des neurones pyramidaux et des fibres cortico-NST

Les stimulations optiques ont été réalisées à l'aide d'une fibre optique de 800 μ m de diamètre montée sur un micromanipulateur et dirigée directement sur la couche V du cortex, le NST ou la capsule interne. La fibre optique est reliée à un laser VD-III A (Optotronics, Mead, USA) de type DPSS (Diode Pumped Solid State) délivrant une lumière bleue d'une longueur d'onde de 473 nm. Le laser est piloté par le logiciel PClamp 9.2 (Molecular devices, Sunnyvale, USA) via une interface digital/analogue (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA). Des stimulations de durées (0,2 à 5 ms, et parfois 500 ms) et d'intensités variables (0,5 à 1,15 mW.mm⁻² mesurés en sortie de fibre) ont été appliquées.

5.3.5 Acquisition des données et protocoles utilisés

Les signaux électrophysiologiques ont été recueillis grâce à un amplificateur de patch-clamp (Axopatch-1D, Axon Instruments, USA) relié à une interface analogue / digital (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA) convertissant les signaux analogiques en signaux numériques, sous le contrôle du logiciel d'acquisition et d'analyse de données électrophysiologiques PClamp 9.2 (Molecular devices, Sunnyvale, USA). Les acquisitions ont été réalisées en utilisant une fréquence d'échantillonnage de 20 kHz, un filtre à 5 Hz.

Enregistrements en courant imposé

Nous avons principalement utilisé le mode « courant imposé » sur les neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur, au potentiel de repos des neurones

(généralement -80 mV pour les neurones pyramidaux). Nous nous sommes intéressés aux variations de potentiel de membrane des neurones enregistrés, plus particulièrement, à l'évolution de la fréquence de décharge et à la variation du potentiel de membrane des neurones en fonction de l'intensité de courant ou de lumière reçue par les neurones enregistrés. Afin d'obtenir ces informations, nous avons injecté des créneaux de 500 ms de courants négatifs et positifs (de -700 pA à +600 pA par sauts de 50 pA) au travers de la pipette d'enregistrement. Nous avons aussi appliqué des flashes de lumière de $\lambda = 473$ nm d'intensité et de durée variables (flashes uniques et trains de flashes).

Enregistrements en potentiel imposé

Nous avons principalement travaillé en mode « potentiel imposé » dans le NST. Nous nous sommes focalisés sur les courants synaptiques AMPA évoqués par la stimulation électrique ou optique des fibres afférentes au NST. Lors de ces enregistrements, les neurones ont été maintenus à un potentiel de -80 mV de manière à bloquer les récepteurs NMDA et augmenter la force motrice (driving force) des ions Na^+ responsables des courants AMPA.

Trois types de stimulation ont été appliqués : simple, double ou multiple (train de stimulation). Plusieurs fréquences de trains de stimulations ont été utilisées afin d'étudier la plasticité à court terme de la synapse cortico-NST : 0,1 / 1 / 5 / 10 / 15 / 20 et 40 Hz. Quel que soit le type de stimulation, les essais ont été séparés de 20 s, de manière à éviter toute induction de plasticité à long terme lors de l'application de ces protocoles. De même, après avoir appliqué un protocole de train de 40 Hz, une nouvelle tranche a systématiquement été utilisée.

L'application d'une variation de potentiel de -5 mV (pendant 12 ms, répétée 5 fois, échantillonnage à 100 kHz) en début d'expérience nous a permis de mesurer les propriétés membranaires de base de chaque neurone enregistré et de calculer résistance et capacité membranaires, ainsi que la résistance d'accès. Nous avons suivi en continu l'évolution de la résistance d'accès au cours de nos expériences via l'inclusion, au début de chaque essai, de cette même variation de potentiel pendant 50 ms.

5.3.6 Pharmacologie

Les détails concernant les substances pharmacologiques utilisées sont récapitulés dans le **tableau 5**. Après avoir appliqué une substance pharmacologique modifiant durablement les

Substance	Nom complet	Effet	Utilisation	Concentration finale	En solution dans	Fournisseur
CGP 55845	[(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino]-2-hydroxypropyl]phenylmethyl]phosphinic acid hydrochloride	antagoniste des récepteurs GABA _B	bain	1 µM	diméthylsulfoxyde 0,0001 % final	Abcam
Picrotoxine	mélange équimolaire de picrotoximine et picrotine	antagoniste des récepteurs GABA _A	bain	50 µM	diméthylsulfoxyde 0,0005 % final	Abcam
D-AP5	D-(+)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid	antagoniste des récepteurs AMPA	bain	50 µM	eau distillée	Abcam
DNQX	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt	antagoniste des récepteurs NMDA	bain	20 µM	eau distillée	Abcam
TTX	Octahydro-12-(hydroxyméthyl)-2-imino-5,9,7,10a-diméthano-10aH-[1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol citrate	bloqueur des canaux sodiques potentiel-dépendants	bain	0,5 – 1 µM	eau distillée	Abcam
QX-314	N-Ethylidocaïne bromide	bloqueur des canaux sodiques potentiel-dépendants	pipette	2 mM	milieu intrapipette CsCl	Abcam
SKF 81297	(±)-6-Chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-1H-3-benzazépine hydrobromide	agoniste des récepteurs dopaminergiques D1 et D5	bain	2,5 – 5 µM	eau distillée	Toeris
SKF 38393	(±)-1-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-(1H)-3-benzazépine-7,8-diol hydrochloride	agoniste des récepteurs dopaminergiques D1 et D5	bain	2,5 – 5 µM	eau distillée	Abcam
Chloro-APB	(±)-6-Chloro-7,8-dihydroxy-3-allyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazépine hydrobromide	agoniste des récepteurs dopaminergiques D1 et D5	bain	2,5 – 5 µM	eau distillée	Sigma
SCH 23390	(R)-(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazépine hydrochloride	antagoniste des récepteurs dopaminergiques D1 et D5	bain	10 µM	eau distillée	Toeris
PKI	PKA inhibitor fragment (6-22) amide	inhibiteur de la protéine kinase A (PKA)	pipette	20 µM	milieu intrapipette CsCl	Toeris
Forskolin	(3R,4aR,5S,6S,10S,10aR,10bS)-Dodecalhydro-6,10,10b-trihydroxy-3,4a,7,7,10a-pentaméthyl-1-oxo-3-vinyl-1H-benzof[chromen-5-yl]acetate	activateur de l'adénylate cyclase	bain	10 µM	diméthylsulfoxyde 0,001 % final	Abcam

Tableau 5 : Substances pharmacologiques utilisées pendant la thèse.

propriétés des événements étudiés, comme les agonistes dopaminergiques, une tranche « naïve » a systématiquement été utilisée pour l'expérience suivante.

5.3.7 Analyse des données

Les enregistrements ont été analysés à l'aide du logiciel PClamp 9.2 (Molecular devices, Sunnyvale, USA) et les analyses graphiques et statistiques ont été réalisées avec les logiciels Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA), Origin 7 (OriginLab, Northampton, USA) et R (R foundation for statistical computing, Vienna, Austria).

Propriétés membranaires intrinsèques

La résistance d'entrée, la capacité et la résistance d'accès des neurones enregistrés ont systématiquement été mesurées à partir de la réponse à la variation de -5 mV en potentiel imposé. La mesure de ces paramètres est expliquée **figure 28**.

La résistance d'entrée (R_{in} , en $M\Omega$) étant assimilée à la résistance de membrane du neurone lorsque la résistance d'accès est négligeable, celle-ci traduit le nombre de canaux ouverts dans la membrane du neurone. Le nombre de canaux fermés est inversement proportionnel à la résistance d'entrée. Les neurones en mauvais état auront une R_{in} faible, et une détérioration de l'état du neurone se traduira par une chute de sa R_{in} au cours du temps.

La capacité de membrane (C_m , en pF), quant à elle, correspond à la quantité de charges nécessaire pour charger électriquement la membrane du neurone. Elle est donc directement proportionnelle à la surface de membrane et caractérise ainsi la morphologie du soma des cellules.

Enfin, la résistance d'accès (R_a , en $M\Omega$) est utilisée pour évaluer la qualité du contact électrique entre l'électrode d'enregistrement et l'intérieur de la cellule. Plus la résistance d'accès est faible, plus les paramètres enregistrés sont proches de la réalité. Une variation de ce paramètre peut également entraîner une modification de l'amplitude et de la cinétique des événements enregistrés. C'est pourquoi ce paramètre a particulièrement été surveillé au cours de nos enregistrements : tout enregistrement présentant une valeur de R_a supérieure à 35 $M\Omega$ a été écarté.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les propriétés membranaires des neurones du cortex exprimant ou non ChR2 dans les différents modèles utilisés.

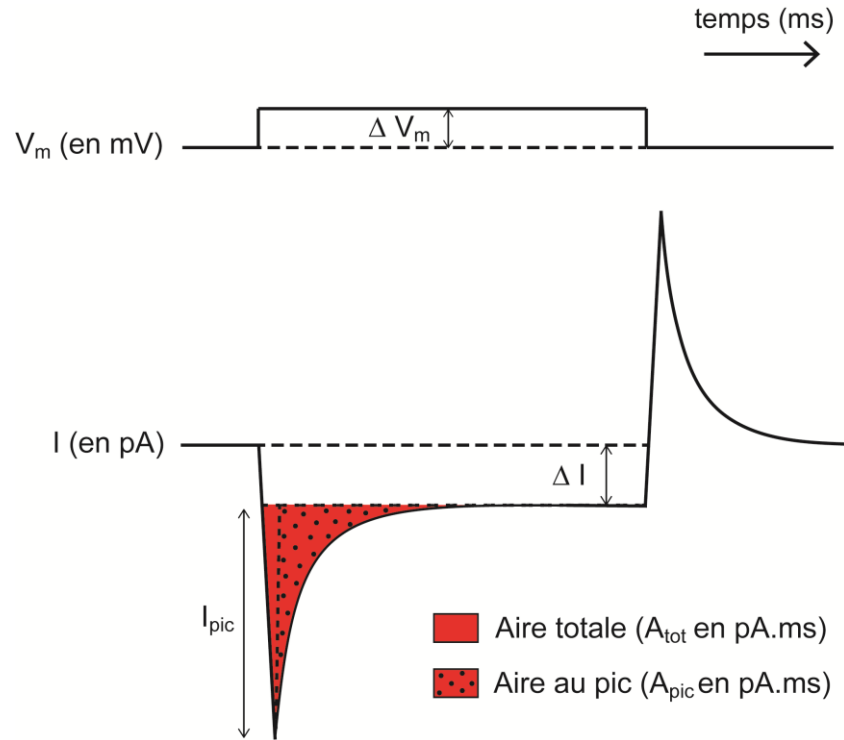


Figure 28 : Représentation schématique des paramètres utilisés pour le calcul de R_{in} , R_a et C_m .

L'application d'un saut de potentiel de -5 mV (ΔV_m) en mode potentiel imposé nous a permis de calculer trois paramètres de base : la résistance d'entrée (R_{in}), la résistance d'accès (R_a), et la capacité membranaire (C_m) :

$$R_{in} = \Delta V_m / \Delta I$$

$$C_m = A_{tot} / \Delta V_m$$

$$R_a = [(A_{pic} \times \Delta V_m) / (I_{pic} \times A_{tot})] \times 1000$$

Avec R_{in} et R_a en $M\Omega$; C_m en pF ; ΔI et I_{pic} en pA ; ΔV_m en mV ; A_{pic} et A_{tot} en pA.ms.

Le calcul de R_a utilise $\tau = A_{pic} / I_{pic}$ (Perrais and Ropert, 1999).

I = intensité ; V_m = potentiel de membrane ; I_{pic} = amplitude du courant ; ΔI = variation d'intensité ; ΔV_m = variation du potentiel de membrane.

Profils électrophysiologiques des neurones corticaux

La fréquence de décharge moyenne des neurones du cortex a été mesurée automatiquement (nombre de potentiels d'action / temps entre le premier et le dernier potentiel d'action du saut de courant) pour chaque saut de courant positif au-delà du seuil de déclenchement des potentiels d'action. A partir de ces données, une courbe de la fréquence de décharge en fonction du courant injecté a été construite.

Le potentiel de repos des neurones a été relevé au cours des expériences de courant imposé et les courbes I/V ont été construites à partir de la variation du potentiel de membrane, mesurée à l'état stable, en fonction de l'intensité de courant sous-liminaire injectée.

La rectification correspond à la différence de potentiel entre le pic et l'état stable du potentiel de membrane en réponse à un créneau de courant négatif entraînant un saut de potentiel de -110 mV.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les propriétés électrophysiologiques des neurones du cortex exprimant ou non ChR2 dans les différents modèles utilisés et une analyse de variance non paramétrique associée à une régression marginale ont été utilisées pour comparer les courbes de fréquence et les courbes I/V entre neurones exprimant ou non ChR2.

Fidélité de la réponse des neurones corticaux à la stimulation optique

Les expériences de contrôle de l'activité des neurones corticaux par des trains de flashes lumineux nous ont permis de construire une courbe de fidélité de la réponse de neurones corticaux à la stimulation lumineuse. La fidélité, exprimée en pourcentage, correspond à la probabilité d'obtenir un seul potentiel d'action par flash lumineux lors des protocoles de trains de flashes. L'absence de potentiel d'action ou la présence de plusieurs potentiels d'action étant considérées comme des échecs, une fidélité de 100% pour une fréquence de stimulation donnée signifie que chaque stimulation lumineuse a déclenché un seul potentiel d'action. Les valeurs de fidélité ont été obtenues à partir de la moyenne de 3 répétitions pour chaque fréquence. La différence de fidélité par rapport à 100% a été testée à l'aide du test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test).

Caractérisation des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC)

Toutes les données concernant les EPSC ont été obtenues à partir de traces moyennes (6 à 20 traces par cellule et par condition). Plusieurs paramètres ont été mesurés à partir des EPSC obtenus lors des expériences de stimulation simple : le délai entre le début de la stimulation et le début de l'EPSC (en ms), l'amplitude au pic (en pA), la charge (en pA.ms), et le temps de décroissance de 80 à 20% du pic (en ms). La **figure 29** illustre comment ces quatre paramètres ont été mesurés. Les paramètres des courants synaptiques avant et après application d'agents pharmacologiques ont été comparés par un test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

Pour les stimulations doubles, le rapport de l'amplitude du deuxième événement par rapport au premier a été calculé afin d'obtenir le paired-pulse ratio (PPR). Pour les stimulations multiples, le ratio de l'amplitude du courant n par rapport au premier courant a été calculé afin de construire le profil de plasticité à court terme de la synapse cortico-NST. Lorsque le ratio est différent de 1 (Wilcoxon signed rank test), il y a une facilitation (rapport > 1) ou une dépression (rapport < 1) à court terme de la synapse.

Tout au long des expériences en « potentiel imposé », les paramètres suivants ont été surveillés afin de s'assurer de la stabilité de nos enregistrements : l'amplitude et la charge du premier courant de chaque trace, la résistance d'accès et la ligne de base. Au sein d'une même cellule, les moyennes et les comparaisons de données appariées ont été réalisées entre traces ne présentant pas de variation de la résistance d'accès de plus de 20%.

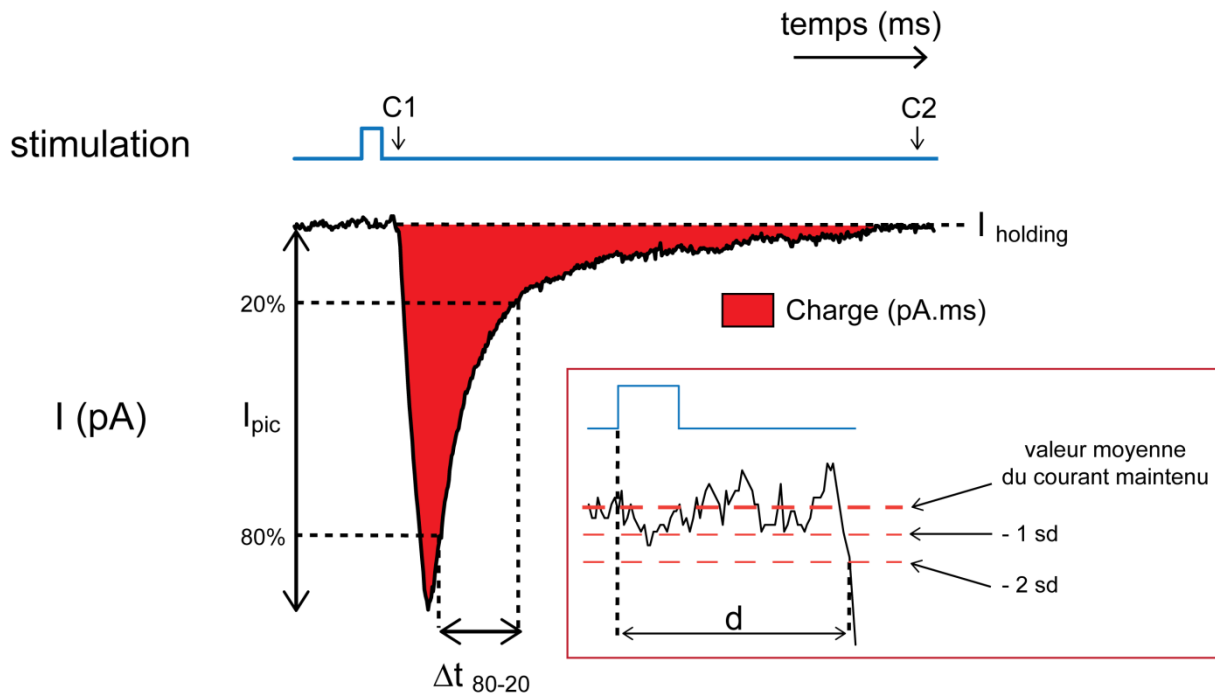


Figure 29 : Représentation schématique des paramètres utilisés pour caractériser les courants post-synaptiques excitateurs (EPSC).

Les paramètres sont mesurés off line à l'aide d'une routine automatique de PClamp 9.2 pour tous les neurones présentant une R_a inférieure à $35 \text{ M}\Omega$.

Après avoir défini la zone de mesure du courant maintenu (I_{holding}), deux curseurs, C1 et C2, sont placés à 50 ms l'un de l'autre. Le premier est placé au début du courant synaptique. Le logiciel détecte le pic de l'EPSC. Il mesure le pic de l'EPSC (I_{pic} , en pA), ainsi que sa charge, à savoir l'aire définie par la courbe entre les 2 curseurs (en pA.ms) et son temps de décroissance entre 80 et 20 % (Δt_{80-20} , en ms). Le délai (d , en ms) entre la stimulation et l'EPSC est mesuré comme illustré dans l'insert.

I = intensité ; I_{holding} = courant maintenu ; I_{pic} = amplitude du courant ; C1 = curseur 1 ; C2 = curseur 2 ; Δt_{80-20} = temps de décroissance entre 80 et 20% de l'EPSC ; sd = déviation standard de la valeur moyenne du courant maintenu.

6. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées par nos collaborateurs de l'équipe d'Alicia Rivera (Malaga, Espagne) sur les 2 hémisphères de 2 rats contrôles et 2 rats 6-OHDA.

6.1. Prélèvement, immunohistochimie et préparation des tissus

Les méthodes utilisées pour le prélèvement des tissus, l'immunohistochimie contre le récepteur D5 et la préparation des tissus pour la microscopie électronique sont décrites dans l'article « Dopamine receptors in the subthalamic nucleus: identification and localisation of D5 receptors » du livre « Dopamine receptor technology » de la série Neuromethods (Froux et al. 2014, chapitre de livre en annexe 2).

L'anticorps primaire dirigé contre le récepteur D5 est un anticorps polyclonal fait chez le lapin (#BP124S, Acris, Herford, Germany) qui a été utilisé au 1/2500^e. L'anticorps secondaire anti-lapin biotinylé fait chez la chèvre (Vector Laboratories, USA) a été dilué au 1/500^e.

6.2. Quantification

Pour la quantification, les images de microscopie électronique obtenues pour chaque hémisphère et couvrant une surface de 9522 μm^2 de NST ont été utilisées. Le récepteur D5 a été identifiée par la présence d'un précipité dense aux électrons dans les structures observées. Les structures positives pour le récepteur D5 ont été classées en plusieurs catégories : soma, arbre dendritique, épine dendritique, terminaison axonale, axones non myélinisés, axones myélinisés ou « non défini ». Les 3 conditions (contrôle, côté non lésé et côté lésé à la 6-OHDA) ont été comparées à l'aide du test statistique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn.

RESULTATS

L'article en préparation présenté ici regroupe les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse.

Nous examinons l'impact de l'activation des récepteurs de la dopamine de type D5 sur la transmission des récepteurs glutamatergiques AMPA de la synapse cortico-sous-thalamique, ainsi que les propriétés de plasticité à court terme de cette synapse.

Pour cela, nous utilisons une approche d'optogénétique *in vitro* associée à la technique de patch-clamp sur des tranches sagittales de cerveau de rongeur. Nous utilisons trois modèles expérimentaux: des souris transgéniques Thy :: ChR2 qui expriment la channelrhodopsine ChR2 dans un certain nombre de populations neuronales, dont les neurones pyramidaux de la couche V du cortex; des souris et des rats dont les neurones du cortex frontal expriment transitoirement ChR2. Ces animaux ont reçu une injection de vecteurs d'expression viraux antérogrades qui codent pour le variant H134R de la ChR2 fusionné à une protéine reporter (EYFP ou mCherry) par stéréotaxie dans le cortex frontal. En l'absence d'outils pharmacologiques spécifiques des récepteurs D5, qui sont des récepteurs peu connus, nous utilisons des souris transgéniques au récepteur D5 invalidé.

Nos résultats montrent que: 1) nous contrôlons le rythme de décharge des neurones pyramidaux de la couche V du cortex avec la lumière ; 2) nous induisons des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) de type AMPA dans les neurones sous-thalamiques en réponse à la stimulation optique de la capsule interne ou du noyau sous-thalamique ; 3) l'activation des récepteurs D5 réduit l'amplitude et la charge des EPSC ; 4) la plasticité à court terme de la synapse cortico-sous-thalamique engendre des propriétés de filtre passe-bas.

Nos résultats contribuent à la connaissance des propriétés spécifiques de la synapse cortico-sous-thalamique. Ils apportent de nouveaux éléments permettant une meilleure compréhension de la fonction de la voie cortico-sous-thalamique dans les ganglions de la base. Ils montrent également que l'optogénétique est un bon moyen d'étudier spécifiquement une synapse dans des tranches de cerveau de rongeur.

**Cortico-subthalamic synapses with low-pass filter properties are
negatively controlled by post-synaptic D5 receptors**

Lionel Froux, Morgane LeBon-Jego, Diana-Boomgaard-Suarez, Alicia Rivera, Christina Miguez, Elisabeth Normand, Stephanie Morin, Jerome Baufreton and Anne Taupignon

En préparation

Introduction

The basal ganglia are an interconnected collection of subcortical nuclei that process cortical information to promote contextually appropriate action selection. The prevailing view of basal ganglia is that of an ‘opposite’ scheme, based on two networks referred to as the direct and indirect pathways. Direct pathway activation promotes, while indirect pathway suppresses, action. Decrease in dopamine level such as that occurring in Parkinson’s disease is thought to result in opposite changes in the two pathways activation, and thus underlie the symptoms (Galvan and Wichmann, 2008; Nelson and Kreitzer, 2014).

In this scheme, the major input of basal ganglia is striatum. Excitatory inputs from cortex target two distinct populations of neurons in the striatum which give rise to the divergent direct and indirect pathways. Yet, the subthalamic nucleus (STN), a component nucleus, and sole glutamatergic nucleus of basal ganglia, is also targeted by cortical afferents in Rodents as well as in Primates (Kitai and Deniau, 1981; Rouzair-Dubois and Scarnati, 1987; Fujimoto and Kita, 1993; Nambu et al., 2000; Paz et al., 2005; Brunenberg et al., 2012; Haynes and Haber, 2013). The cortico-subthalamic connection is also called ‘hyperdirect pathway’ because the signal from cortex reaches the basal ganglia output nuclei before signals through the two other pathways.

The hyperdirect pathway contributes to suppress basal ganglia output in Humans, thereby blocking Go response execution (Aron and Poldrack, 2006; Hershey et al., 2010; Jahfari et al., 2011; Forstmann et al., 2012). Circuit properties allows for a similar function in Rodents (Eagle et al., 2008), and it has been recently shown that excitations from cortex are processed by STN, the relative timing of these excitations and of inhibition signals from striatum underlying the interruption of planned actions (Schmidt et al., 2013). This result, and the observation that planning not to move is associated with short latency burst of beta oscillations (Leventhal et al., 2012), fit well with the hypothesis that the cortico-subthalamic pathway is instrumental to beta oscillations in health and disease, with cortex leading the STN (Levy et al., 2002; Mallet et al., 2008; Litvak et al., 2011).

Most cortical inputs to STN are severed from somatas in brain slices, and electrical stimuli activate axons of other pathways (Shen and Johnson, 2000; Beurrier et al., 2006; Farries et al., 2010; Bosch et al., 2012; Yamawaki et al., 2012). Thus, understanding how STN neurons receive the cortical input is still lacking. Here, building on the recent demonstrations that, in Rodents, a cortico-subthalamic input is formed by corticofugal axons

from pyramidal tract neurons (Gradinaru et al., 2009; Kita and Kita, 2012), we investigated the properties of the cortico-subthalamic synapses in rat brain slices using an optogenetic approach to isolate cortical afferents.

We show that illumination of corticofugal axons produce action potential-dependent AMPA/kainate transmission with low pass filter properties. We demonstrate that the excitatory post-synaptic currents are negatively controlled by post-synaptic dopamine D5 receptors signaling *via* protein kinase A.

Methods

Animals. Procedures were designed in agreement with the directive 86/609/EEC of the European Community Council and have been approved by the Comité d’Ethique en Experimentation Animale n°50 (agreement number : CE5012077-A). C57Bl6, Thy::ChR2 (line 18) (Arenkiel et al., 2007), D5 +/- mice (Holmes et al., 2001) were used. Adenoviruses carrying fusion genes for ChR2 and fluorescent proteins were injected into the cortex between post-natal day 21 to 28 (P21-28). The fluorescent protein was most often EYFP, and in some cases mCherry. Frontal cortex was targeted using coordinates derived from (Smith and Alloway, 2010) and adjusted for smaller animals. Typical coordinates from Bregma of the three injections made in mice were: lateral, -1.125 / -1.125/ -1.375 mm ; posterior, +1.4 / +1.15 / +1.4 mm ; and depth, -1.275/-1.275/-1.475 mm. Wistar rats were used in a subset of experiments. In rats, injections were made at P17-24, and six injections were made at coordinates: lateral, -2.4 / -3.0/ -2.4 mm; posterior, +2.0 / +2.0 / +1.5 mm; depth, -2,0 and -1.5/-2.0 and -1.8/-1.6 and 1.9 mm. Viral solutions (titer $\approx 10^{12}$ IU/mL) were purchased by the Vector Cores of the Universities of Pennsylvania or North Carolina. Viral DNA (courtesy of Dr Karl Deisseroth, Stanford University) were: rAAV2/1-hSynapsin-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-hGH and rAAV2/1-hSynapsin-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-hGH. Injection volumes were 0.5 μ l.

Slice preparation. After allowing 2-3 weeks for ChR2 expression, or at P35 to 50 for control non-injected animals, acute parasagittal slices were made for *in vitro* recording and stimulation. Animals were first anesthetized with isoflurane to minimize stress, and then an ip cocktail of ketamine and xylazine (75 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) was used to obtain a deep anesthesia for intracardiac perfusion. A saturated (95% O₂/ 5% CO₂), ice-cold solution containing (in mM): 250 sucrose, 26 NaHCO₃, 7 MgCl₂, 2 KCl, 1.15 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, and 11 glucose (pH 7.35) was perfused intracardially before the brain was quickly removed and cut into 350 μ m-thick slices using a VT-200S vibratome (Leica). The slices were transferred in a storage chamber for 40 min at 32 °C. The storage solution was an artificial cerebral spinal solution (composed of 124 NaCl, 26 NaHCO₃, 3.6 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 1.25 HEPES, and 10 glucose at pH 7.35, and saturated by bubbling 95% O₂/ 5% CO₂) supplemented with 5 μ M glutathion and 1 mM sodium pyruvate. Slices were then maintained at room temperature in the same solution until used for recording.

Recordings. One (from mice brain) or two slices (from rat brain) displayed ChR2-EYFP fluorescence within the STN boundaries and in frontal cortex. Three to four additional slices displayed fluorescence due ChR2-EYFP in frontal cortex only. These slices were lateral to the STN-containing slices. Whole cell patch clamp experiments were made at 32°C in a submersion recording chamber under an Examiner Z1 (Zeiss, Germany) upright microscope. Slices were bathed in the artificial cerebral spinal solution described above at a rate of 3 mL/min. Whole-cell recording pipettes contained (in mM) 140 K-gluconate, 11 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 2 ATP-Mg, and 0.4 Na-GTP, for the current clamp experiments in cortex. They contained an otherwise similar solution to the exception of K-gluconate, replaced by CsCl, for the voltage clamp experiments performed in STN. In both cases, the osmolarity of intra-pipette solutions was between 280 and 300 mOsm and pH was adjusted to 7.25. Cells were visualized under IR-DIC and fluorescence microscopy. Initial pyramidal cell targeting in the cortex was initially based on anatomical position, soma shape and size, and the presence of EYFP in slices obtained from Thy::ChR2mice. Experiments were conducted with Axon Instruments hardware and software (Axopatch-1D, Digidata 1322A, and PClamp V9.2; Molecular Devices, USA), with the amplifier filter set at 5 kHz, and the digitization rate at 20 kHz. Voltages were corrected off line for a -5 mV liquid junction potential.

Stimulation and recording protocols. First, neurons were held in the voltage clamp mode at -60 mV, and -5 mV steps were applied for off line determination of intrinsic cell parameters. Then, in the subset of experiments on pyramidal neurons of cortex designed to record light-evoked discharge, the recording mode was switched to current clamp and the spontaneous activity recorded. In the subset of experiments in the STN designed to activate corticofugal axons, the recording mode was kept in voltage clamp mode. Membrane voltage of subthalamic neurons was set at -80 mV. A -5 mV voltage step was included at the beginning of all sweeps to allow off line control of access resistance and cell parameters, and single optic stimulations were applied. Their duration and luminance were adjusted to produce a smooth light-evoked current with half maximal amplitude whenever this was possible. Unless otherwise stated, flash durations were below 1ms. We found that, in the STN, light-evoked currents usually first increased amplitude and then either run down or maintained amplitude. The neurons showing such a rundown were discarded on line. The phases of stabilization and / or adjustment lasted approximately 10 min. Optical stimulations were performed using a 473 nm diode pumped solid state laser (Optotronics, USA) connected

to a 800 μm optical fiber (Errol, Paris, France) usually positioned at the surface of the slice next to the recording site. In the experiments on subthalamic neurons, we also assessed positions of fiber away from the recording, in a more frontal area, with light directed to the internal capsule. We found no major change in the response to light to the exception of their size (which was much smaller) and the frequency of their occurrence (which was considerably reduced). In addition, we tested moving the fiber from the STN area to the internal capsule at more frontal locations while recording the light-evoked response from a subthalamic neuron. Again, we did not find major changes except their size which progressively diminished until responses most often disappeared. The maximum output power at the end of the fiber was controlled regularly and was $1.15 \text{ mW} / \text{mm}^2$. Unless otherwise stated, the activation of corticofugal axons was performed in the continued presence of GABA A and B receptor antagonists (50 μM picrotoxin and 1 μM CGP 55845) to avoid the occurrence of huge spontaneous inhibitory events. Single flashes or trains (with a maximal duration of 500 ms) were applied at 20 sec intervals, and repeated between 6 and 12 times. Slices were discarded after trains at 40Hz, to prevent the possible interference of induction of plasticity.

Data analysis. Data were analyzed off line using pClamp V9.2 (Molecular Devices, USA), Origin V7 (OriginLab, USA), Prism5 (GraphPad Software, USA) and R (R Foundation for Statistical Computing, Austria). First, access resistance and cell parameters were calculated. Second, peak and charge of photo-evoked current, peak of capacitive transient and holding current were detected and plotted against time. Neurons with an initial value of access resistance greater than 35 $\text{M}\Omega$ or showing a change of access resistance of 20 % were then discarded. Photo-evoked currents were detected as peaks negative to mean holding value in a 25 ms window using the Clampfit subroutine of pClamp. Their kinetics (amplitude, charge, 80-20 % decay time) were measured on individual, single sweep, responses. Onset latency of current was measured at current value equal to mean holding current minus 2 SD. A ten minute control period was always recorded before perfusion of a drug. Unless otherwise stated, drugs were diluted in bathing solution and perfused in the same way as control bath solution. 'Before' refers to the average 6 values preceding the agonist perfusion, 'after' refers to the average 6 values measured after 10 min of perfusion. Paired pulse ratios were calculated by dividing the amplitude of the second current with the amplitude of the first current. Trains were analyzed by taking the amplitude of each current and dividing this by the amplitude of the first current. Six to 12 successive values were averaged to be included in any

group data. The term ‘D1/D5 agonists’ refers to SKF 82958, SKF 81297 and SKF 38393. We found no qualitative difference in the action of the three drugs. Possible quantitative differences between the three drugs were not investigated.

Statistics. In the text, all values are given as means \pm S.E.M., when mean and median are close. If this is not the case, both median and mean are given. Box plots are used for graphic presentation of electrophysiological data, due to the small sample size. The box plot presents the distribution with the median as a central line. The hinges and edges of the box display the 25th and 75th percentiles, whereas the "whiskers" display the minimal and maximal values. Statistical comparisons were made using non-parametric tests. The Mann and Whitney test, as well as the Wilcoxon test, were used for data obtained from independent and matched paired samples, respectively. Differences in input-output relationship between EYFP-positive and YFP-negative neurons in layer 5 of cortex were tested using non parametric variance analysis and marginal regression. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Histological analysis. Immunohistochemistry was performed on 50 μm -thick brain slices obtained from perfusion-fixed animals or on 350 μm -thick slices previously used for electrophysiology. Animals were transcardially perfused with 0.1 M phosphate buffer (PB) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB. Brains were cryoprotected by immersion in PB plus 20% sucrose overnight, frozen in isopentane and then stored at -80°C until use. Following recording, the slices were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB, and then kept until used in PB supplemented with 0.2 % sodium azide at 4°C . All slices were incubated one night with 1/1000 rabbit anti-GFP (Invitrogen) in PB supplemented by 1 % BSA and 0.3 % Triton. This was followed by 2 hour incubation in 1/500 donkey-anti-rabbit-Alexa 488 fluorophore (Invitrogen) secondary antibody. Finally, all slices were mounted in Vectashield (H-1000 or H-1200, Vector Laboratories, USA). Confocal or epifluorescence microscopy was used for imaging.

Drugs and chemicals. All drugs were obtained from Tocris Bioscience (UK) or Abcam (France), except SKF-82958, which was purchased from Sigma (France).

Results

Channelrhodopsin-2 (ChR2) is a light sensitive cation channel (Nagel et al 2003) that can be expressed in mammalian neurons, enabling the neurons to be excited by blue light with high temporal precision (Boyden et al., 2005; Adamantidis et al., 2007; Schneider et al., 2008).

It is now well established that ChR2 can be expressed in cortical neurons and that enough ChR2 is expressed in the axons and terminals of corticofugal neurons that the axons or terminal arbors themselves can be directly excited by light, triggering transmitter release without the need for illuminating of parent somata (Petreanu et al., 2007; Kiritani et al., 2012; Kress et al., 2013).

Transgenically-expressed ChR2 produces rapid light-evoked responses in STN neurons in brain slices

We used mice of the Thy::ChR2 line. It has been demonstrated that, in this transgenic mice line, the fusion protein ChR2-EYFP is expressed in excitatory projection neurons including glutamatergic layer V pyramidal neurons, and that projections from layer V pyramidal neurons convey a light-induced message to the STN (Gradinaru et al 2009, Wang et al 2007), suggesting that cortico-subthalamic synapses might be activated by light.

We found an overall expression of ChR2-EYFP in the mice brain similar to that described by Gradinaru et al. (2009). Specifically, EYFP fluorescence was located in pyramidal neurons, and EYFP-positive fibers in the internal capsule and the STN (Figure 1A).

We first examined a number of technical issues. We tested the properties of layer V pyramidal neurons in brain slices from Thy::ChR2 mice and wild C57BL6 mice (Table 1). Neither intrinsic membrane properties nor discharge characteristics were significantly different. We looked for light parameters that produced a single action potential in ChR2-EYFP-positive pyramidal neurons of frontal cortex layer V (Figure 1 B). To this end, we recorded frontal cortex pyramidal neurons in the current clamp mode of the whole cell configuration while reducing network possible interference using a cocktail of GABA and glutamate antagonists (20 μ M DNQX, 50 μ M D-AP5, 50 μ M picrotoxin and 1 μ M CGP 55845) to inhibit fast synaptic transmission, and applied brief, 473 nm laser illuminations of varying luminance or durations. Increasing the luminance of a flash led to the discharge of

one and then several action potentials. Conversely, increasing the duration of a flash without changing its intensity produced more than one action potential. Group data of Figure 1B indicate that the optimal light parameters for inducing a single action potential in layer V pyramidal neurons in brain slices from Thy::ChR2 mice were close to 0.5 ms at luminance between 0.6 to 1.15 mW/mm².

We then used these light parameters to generate illuminations directed to the internal capsule or the STN, to test out if light exciting the pre-synaptic ChR2-EYFP-expressing fibers resulted in light-evoked excitatory post-synaptic currents (EPCSs) in STN neurons (Figure 1C). As expected, brief illumination at 473 nm generated large, inward currents exhibiting reproducible kinetics, with a sizable current peak of -178 ± 25 pA (n=14). The latency to onset value was always brief, with a mean value of 0.65 ± 0.04 ms (n=14). Furthermore, we noticed that the current sometimes displayed 2 phases of onset, with a small component with fast onset followed by a much larger component. Such short values of onset latency being at odds with synaptic transmission, we applied inhibitors of synaptic transmission and the sodium channel blocker, TTX (Figure 1D). We expected the current to be insensitive to inhibitors of GABA receptors and to be fully blocked by antagonists of glutamatergic receptors or TTX. As illustrated by the recordings in Figure 1D showing successive applications of inhibitors of ionotropic GABA (50 μ M picrotoxin and 1 μ M CGP 55845), of glutamatergic receptors (20 μ M DNQX, 50 μ M D-AP5), and of TTX (1 μ M), this was not the case; all drugs reduced the light-evoked current. Inhibitors of ionotropic GABA were active, and there remained a TTX-insensitive component. Group data in figure 1D show that sensitivity to inhibitors of fast GABAergic transmission and to TTX was a general phenomenon. On average, the average TTX-insensitive component accounted for -33 ± 9 pA (n= 6), and for 11 ± 2 % (n= 5) of the control light-induced current.

The results suggested that release of both GABA and glutamate was initiated upon illumination, but that light also induced a small action-potential independent current. We therefore turned to conditions allowing more restricted channelrhodopsin expression, i.e. a viral expression system, in all other experiments.

ChR2-EYFP-labelled fibers from frontal cortex project onto the STN in virally-transfected mice

Two to three weeks after injections of adeno-associated viruses carrying ChR2-EYFP fusion genes in frontal cortex, there was a strong expression of ChR2-EYFP in frontal cortex cells and in their projections. ChR2-EYFP fluorescence was observed in the striatum, thalamus, internal capsule, *zona incerta*, STN and posterior brain areas of midbrain and pons (Figure 2A). STN only displayed a small bundle-like of ChR2-EYFP fluorescence in its dorso-lateral part, the motor part of STN in rodents (Afsharpour, 1985; Canteras et al., 1988, 1990; Kolomiets et al., 2001). Higher magnification images revealed that ChR2-EYFP was expressed on membranes and in soma of pyramidal neurons in frontal cortex and that it labelled numerous fibers (Figure 2B). By contrast, it was only expressed in fibers within the striatum (figure 2C) and the internal capsule (Figure 2D). The area of ChR2-EYFP fluorescence in the STN appeared as a dense network of ChR2-EYFP-positive fibers, and there was no apparent immunofluorescence in soma (Figure 2E), indicating that ChR2-EYFP was only expressed in corticofugal fibers within the STN.

The pattern of ChR2-EYFP expression was consistent with ChR2-EYFP-expressing pyramidal neurons projecting to various parts of the brain. Specifically, ChR2-EYFP revealed motor corticosubthalamic projections in the STN, presumably the motor part of the so called hyperdirect pathway (Haynes & Haber 2013, Kita & Kita 2012). This latter result paved the way to exploring the properties of corticosubthalamic synapses.

However, properties of ChR2-EYFP-expressing presynaptic pyramidal neurons had to be examined i) to ascertain that ChR2-EYFP expression did not change the electrical properties of motor pyramidal neurons and ii) to define the optimal parameters of photostimulation.

Blue light induce firing in ChR2-expressing frontal cortex pyramidal neurons

Thus, first, we tested whether ChR2-EYFP expression changed the basic electrical properties of pyramidal neurons in layer V of frontal cortex. Whole cell patch-clamp recordings performed on brain slices obtained from naïve and virally-transfected mice did not bring out any significant differences in the intrinsic membrane or the firing properties of ChR2-positive and ChR2-negative neurons (Table 1). Input-output curves of discharge frequency *versus* injected current were not significantly different either (n= 28, 14 neurons

from transfected and 14 from wild type mice, $p > 0.05$; data not shown). In addition, ChR2-positive pyramidal neurons had an apparent normal morphology.

Then, the action of light on ChR2-positive pyramidal neurons in layer V was examined. Laser blue light (wavelength 473 nm) was shone directly on frontal cortex using an optic fiber located close to the ChR2-EYFP-positive cortex area (Figure 3A and B). Sustained (500 ms) laser stimuli evoked repetitive action potentials in pyramidal neurons held in the current clamp mode of whole cell patch clamp (Figure 3C). Indeed, voltage clamp revealed that the photostimulus produced a large inward current with an initial peak followed by smaller desensitized component persisting throughout the stimulus. The photocurrents had a latency of less than 1 ms. Repetitive firing and photocurrent persisted when glutamate and GABA receptors were blocked by 20 μM DNQX, 50 μM D-AP5, 50 μM picrotoxin and 1 μM CGP 55845. These two results suggest that the depolarizing current was due to direct ChR2-mediated activation.

We finally sought to determine the optimal parameters of photostimulation which elicited only one action potential per flash. To this end, we adjusted the duration or the luminance of the optical stimulation. As shown in Figure 3D, a single action potential was evoked by a 0.4 ms flash of 0.99 mW/mm^{-2} luminance, whereas 3 or 2 action potentials were evoked by a 1 ms flash of the same luminance or by a 1.15 mW/mm^{-2} flash of the same duration, respectively. Data from 13 neurons indicate that optical stimuli of durations between 0.4 and 1 ms and luminances ranging from 0.55 to 1.15 mW/mm^{-2} were optimal, since they produced on average 1 action potential (Figure 3E). Stimuli of shorter durations were not able to always induce an action potential, whereas longer stimuli always induce more than one action potential. Thus, flashes between 0.4 to 1 ms and with luminances ranging of 0.55 to 1.15 mW/mm^{-2} were used in all the following experiments.

Frontal cortex pyramidal neurons do not fire single action potentials. They fire action potentials in a wide range of frequency *in vitro* (Connors and Gutnick, 1990). Cortical neurons projecting on subthalamic neurons discharge regularly, at a frequency below 5 Hz, in anesthetized animals (Paz et al., 2005; Degos et al., 2013). The discharge frequency of identified corticosubthalamic neurons in awake animals at rest was found to be in the order of 3Hz (Li et al., 2012). The frequency range of discharge in a behaving rodent is unknown. However, 50 Hz imposed on single neurons in layer V was shown to drive the movement of a

whisker (Brecht et al., 2004), suggesting that frequencies of several tens of Hz may be associated with movement.

To be able to reproduce the possible range of motor cortical firing, we examined if repetitive optical stimulations reliably produced repetitive action potentials. Using the parameters of a single flash that produced a single action potential (0.4 to 1 ms and 0.55 to 1.15 mW/mm⁻²), we tested trains of photostimulations at frequencies ranging from 1 Hz to 120 Hz. Figure 4A shows that at flash frequencies up to 40 Hz, each flash induced an action potential. At higher frequency however, photo stimulation was less efficient, and some flashes failed to elicit action potentials. Fidelity of photo stimulations over a 500 ms period is given by the group data in Figure 4B. 100% fidelity was obtained when each flash in a train produced one single action potential. Figure 4B shows that only photo-stimulus trains of frequency below 40 Hz reliably induced action potential firing with a similar temporal precision over 500 ms. The probability of evoking an action potential was reduced to 50 % at 80Hz. The apparent frequency response of (H134R)ChR2 thus differed from that of wild type CHR2 which has a cut off frequency of 35 Hz (Wang et al., 2007). At least, part of the dynamics of photo-evoked action potentials stems from neuron firing properties, since action potentials could be reliably photo-evoked at frequencies up to 120 Hz in some neurons. Besides, similarly variable maximal firing frequency was observed when pyramidal neurons were challenged with standard intracellular current depolarizations.

All together, the results indicate that ChR2-expressing pyramidal neurons in layer V of frontal cortex fire single action potentials when stimulated by blue light illuminations of 0.4 to 1 ms. Pyramidal neurons reliably fire trains of actions potentials when trains of flashes at a frequency below 40 Hz are used.

Optical activation of corticofugal fibers in the STN results in action potential-dependent glutamatergic synaptic transmission

We explored whether synaptic responses could be evoked in the STN by recording subthalamic neurons in the voltage clamp mode while illuminating the ChR2-EYFP-positive area in the STN (Figure 5A). Considering that corticofugal terminals are glutamatergic, we expected light-induced excitatory synaptic currents. Indeed, local stimulations of brief laser flashes (0.4 to 1 ms, 0.55 to 1.15 mW/mm²) directly over the STN or over the internal capsule produced inward, excitatory currents in the subthalamic neurons that lied in the dense network

of fluorescent fibers whereas no response was ever recorded in neurons outside the fluorescent area. Responses always progressively decreased to undetectable level as the light source was moved away from the recording site. This observation, together with the finding that increasing luminance increased the amplitude of the current indicated that responses were compound EPSCs due to the photostimulation of several pre-synaptic axons and/or terminals. Typical peak intensity and decay are exemplified by the single sweep currents displayed in Figure 5B (left) and the average current is shown Figure 5B (right). In a sample of 24 neurons, light-evoked currents ranged from -14 to -293 pA, with a mean peak intensity of 107 ± 13 pA, and mean charge close to -500 pA.ms (-506 ± 66 pA.ms). Mean decay was 4.5 ± 0.4 ms. Interestingly, the latencies between flashes and currents were always greater than 1 ms with a mean value of 1.90 ± 0.08 pA (Figure 5B, n=24) consistent with values of synaptic delay (Cruikshank et al., 2010). To further characterize the responses of subthalamic neurons, we applied the AMPA/kainate receptor antagonist DNQX (20 μ M, Figure 5C left). This fully blocked laser-evoked currents in all 5 cells tested, demonstrating that glutamate was released upon illumination and that ionotropic glutamate AMPA/kainate receptors were involved. We then assessed whether glutamate release was initiated by action potential-dependent processes. To address this issue, we recorded from subthalamic neurons with robust laser-evoked cortico-subthalamic responses, then applied 1 μ M TTX to block voltage-dependent sodium channels (Figure 5C right). TTX completely abolished the responses in 5 of 5 neurons, indicating action potential-dependent release. It should be noted that although synaptic responses evoked by brief laser stimulation of corticofugal axons clearly required action potentials, responses could be evoked in TTX with longer stimulations (data not shown).

Thus, when subthalamic neurons were recorded in areas targeted by ChR2-expressing corticofugal fibers, synaptic responses were evoked by short illuminations. They were excitatory post-synaptic currents (EPSCs) due to light-induced pre-synaptic action potentials that were AMPA/kainate receptor mediated.

Finally, we assessed whether short illuminations could repetitively evoke EPSCs in subthalamic neurons. Figure 5 D shows that was the case. On the left are illustrated two parameters of all the single sweep EPSCs, peak and charge, together with the normalized capacity transient values, in a 20 minute record. The values of the peak and the charge of the

photo-induced-EPSCs did not exhibit significant changes over time, with both peak and charge of EPSCs appearing as consistently robust parameters.

Dopamine D1/D5 receptor activation negatively controls cortico-subthalamic transmission

Corticofugal fibers in the STN could be repetitively activated by flashes as illustrated in Figure 5D. The values of peak and charge of the photo-induced-EPSCs did not exhibit significant changes over time. We therefore measured both peak and charge in the following experiments designed to investigate the action of D1/D5 receptors.

We tested 3 dopaminergic agonists (SKF 82958, SKF 81297 or SKF 38393, 2-5 μ M) to neutralize any possible difference in the affinity or potency of the drugs toward D5 or D1 receptors, as seen with recombinant D1 and D5 receptors when expressed in heterologous systems of expression (Tiberi and Caron, 1994; Demchyshyn et al., 2000; D'Aoust and Tiberi, 2010). Whatever the agonist, the effect of D1/D5 activation was a reduction in cortico-subthalamic transmission. This was truly a D1/D5-mediated action since it was occluded when a D1/D5 agonist was co-applied together with the D1/D5 antagonist SCH23390 (10 μ M) as illustrated by Figure 6B and C. D1 agonists significantly reduced the peak and charge of EPSCs from -126 ± 27 pA to 75 ± 16 pA and 643 ± 145 pA.ms to 407 ± 89 pA.ms, respectively, and the mean reductions in peak and charge were close to -40 %, -38 ± 5 % for peak and -35 ± 7 % for charge (Figure 6D and E). In the continued presence of SCH23390, D1/D5 agonists had no more a significant action (control values: 94 ± 18 pA and 297 ± 43 pA.ms; test values: 84 ± 17 pA and 264 ± 47 pA.ms, for peak and charge, respectively).

Agonists of receptors in the D1/D5 family do not discriminate between D1 and D5 receptors at the concentrations required to act on neurons in brain slices, although they show some specificity on recombinant receptors expressed in heterolog systems (Tiberi and Caron, 1994; Demchyshyn et al., 2000; D'Aoust and Tiberi, 2010) and on cell preparations (Undieh, 2010). Our results can therefore be due to activation of either D1 or D5 receptor. However, there is no experimental evidence supporting D1 receptor expression in the STN, whereas D5 receptors have been found (Khan et al., 2000; Baufreton et al., 2003; Wilson and Bevan, 2011). We speculated that the inhibitory action of the agonists in the D1 family might involve D5 receptors. To directly test for the possibility that inhibition of AMPA/kainate EPSCs was mediated by D5 receptors, we used D5 knockout mice.

Post-synaptic D5 receptors use a PKA-dependent pathway to inhibit cortico-subthalamic transmission

To test the assumption that the inhibitory action of the agonists in the D1 family was mediated by D5 receptors, we infected mice bearing a null mutation of the D5 receptor, D5 $-/-$ mice (Holmes et al., 2001), with the same adeno-viral expression vector as wild type C57Bl6 mice. The expression profile of the fusion protein ChR2-fluorescent reporter was similar to that of wild type mice. We then evoked EPCSs using the light parameters that produced a single action potential in layer V pyramidal neurons (0.4 to 1 ms, 0.55 to 1.15 mW/mm²) in the same way as we did on wild type C57Bl6 mice in Figures 4 and 5. Light-induced EPCSs had qualitatively similar characteristics as those photo-evoked in slices from wild type mice (Table 1). We then applied (2.5 to 5 μ M) D1 agonists (Figure 7A). They produced no significant change in the peak amplitude or charge of the EPCSs (n=8, p= 0.25 and p=0.31 for peak and charge, respectively). Thus, D5 receptors appeared to be necessary for the inhibitory action of D1/D5 agonists on TTX-dependent, AMPA/kainate EPCSs.

Activation of recombinant D5 receptor is known to consistently produce elevation of cAMP when expressed in heterologous models such as HEK-293 (Tiberi and Caron, 1994; Demchyshyn et al., 2000; D'Aoust and Tiberi, 2010). Accordingly, we have shown that the action of D5 receptor on burst firing in the STN was mediated by a PKA/cAMP pathway (Baufreton et al., 2003). We therefore first tested the typical exogenous agonist of PKA, forskolin. Forskolin was indeed able to increase the peak and charge of light-induced EPCS (Figure 7B). But this action was accompanied by the clear emergence of numerous spontaneous synaptic events (see the inset in Figure 7B) indicating that it had both a pre- and a post-synaptic site of action. We turn to a more specific compound, the protein kinase A peptide inhibitor, referred to as PKI, used it in the pipette solution to produce indisputably a post-synaptic block of the PKA/cAMP transduction pathway and tested then the action of D1/D5 receptor agonists. With 20 μ M PKI complementing the pipette solution, D1/D5 agonists were inactive, inducing no significant changes in the peak or charges of the light-induced EPCSs (Figure 7C). This finding is illustrated by the values of the group data (mean control values : - 129 \pm 11 pA and - 575 \pm 71 pA.ms vs mean test values : - 117 \pm 17 pA and - 553 \pm 98 pA.ms, for peak and charge respectively; not significantly different, p= 0.31).

Short term synaptic plasticity of motor cortico-subthalamic synapses revealed by optogenetic stimulations of corticofugal axons

40 Hz is the cutting frequency for trains of flashes, since layer V pyramidal neurons in frontal cortex fired with fidelity of less than 100 % when they were photoactivated by trains of flashes at frequency of 40Hz and above (Figure 3). We therefore investigated the short term plasticity profile of cortico-subthalamic synapses using trains of illuminations in the 0.1 to 40Hz range.

Figure 7 and 8 display the results of such an experiment made on mice and rats, respectively. In both cases, frontal cortex was infected by a solution of recombinant adeno-associated virus coding for a fusion protein ChR2 and a fluorescent reporter (EYFP or mCherry). ChR2-EYFP-positive pyramidal cells in rats had the same properties as those from non-transfected rats (Table 1) The expression profile of ChR2-fluorescent reporter was similar in mice and rats; only a small area in the dorso-lateral STN exhibited a dense network of fluorescent fibers. And we only found light-evoked EPSCs in the neurons that were lying among the dense network of fluorescent fibers. The currents recorded in rats had properties similar to those recorded in mice and described in Figure 5, i.e. they were TTX- dependent, AMPA/kainate receptor currents. Figure 8 A and B show an example of EPSCs induced by repetitive trains of flashes in a slice of mouse and of rat, respectively. The group data illustrated Figure 9 are those obtained in slices from rats. The peak amplitudes of AMPA/kainate EPSCs photo-evoked at a frequency of 0.1 Hz were constant. By contrast, whilst the first two EPSCs photo-evoked at 1Hz had constant peak amplitudes, the peak amplitudes of the later AMPA/kainate EPSCs were depressing. EPSCs evoked at 10 Hz displayed contrasting properties: the five first EPSCs showed no significant change whereas the 3 remaining EPSCs evoked by the subsequent flashes were diminished. Flashes at 20 and 40 Hz always induced depression. Depression at 20 Hz was progressively increasing whereas that at 40 Hz was quasi maximal as soon as the second EPSC was photo-evoked. The graph of figure 8D presents the global filter properties of the synapse. The ratio of peak amplitudes of EPSC2/EPSC1 corresponds to the paired pulse ratio. It shows that the cortico-subthalamic synapse behaves as a low-pass filter for the first two stimuli at all frequency up to 10 Hz. The ratio of peak amplitudes of the last EPSC in the train over that of EPSC1 indicates depression at all frequency but 0.1 Hz. It should be remember though that the filter properties of the

synapse for pre-synaptic stimulation at 10 Hz differ from those of the synapse at all other frequencies tested. Its low-pass range is much longer since it stands for 5 EPCSs or 400 msec.

Discussion

Our results built on the efficacy of the ChR2 optical technique to selectively stimulating pre-synaptic axons of cortico-subthalamic synapses. In axon terminals within STN, light evoked action potential-dependent glutamate release. We demonstrate that activating dopamine D5 receptor leads to reduction of AMPA-mediated current. We show that trains of optical stimulation produced short term depression.

Cortical projections to STN

Our injections of virus driving the expression of the fusion protein ChR2-EYFP were directed to frontal cortex. Only injections of anterograde and /or retrograde tracers in the agranular cortex, which includes prefrontal, motor and somatosensory areas, resulted in labelling in the STN. Terminals were in the dorsolateral district of the ipsilateral STN and cell bodies in layer 5B of cortex (Afsharpour, 1985; Canteras et al., 1990; Kita and Kita, 2012). Our imaging of the fluorescence of YFP suggests that ChR2-YFP expression was localized in lateral agranular cortex. Thus, it is probable that the cortical ChR2-YFP-positive area included motor cortex, although it cannot be excluded that part of the somatosensitive cortex might has been transfected too (Canteras et al., 1988). Experiments of photomicrostimulations in animals could clarify what parts of the cortex were transfected.

Whether the properties of the cortico-subthalamic synapse we report here are shared by other projections from e.g. prefrontal cortex to STN remains to be investigated. In primates, many areas constitutive of prefrontal cortex project onto the STN, in addition to motor cortexes (Nambu et al., 1996; Haynes and Haber, 2013). Another question is: do the cortico-subthalamic synapses have the same properties as the cortico-striatal synapses, both with the same pre-synaptic pyramidal neurons? A major finding of (Kita and Kita, 2012) is that corticofugal neurons that project to STN also project to many other brain structures such as striatum and thalamic in addition to brainstem areas and spinal cord. Our results provide the first experimental data on cortico-subthalamic synapses. There is no data, however, on the properties of the cortico-striatal synapses made by collaterals of axons also targeting STN. Retrograde transfection of STN neurons will allow their identification. It will be interesting to compare their properties to those of interhemispheric neurons studied by retrograde transfection of striatum (Kiritani et al., 2012).

Axonal and synaptic activation of cortico-subthalamic transmission with ChR2

Cortical stimulation by light in brain slices from Thy::ChR2 transgenic mice activated microcircuits, indicating that light activated interneurons in cortex, in addition to projection pyramidal neurons (Wang et al., 2007). Within the STN, ChR2-YFP expression was found in fibers and not cell bodies, in agreement with our labelling, and inhibitory markers were not detected in ChR2-YFP positive fibers (Gradinaru et al., 2009). Nevertheless, in our conditions, currents evoked by light in subthalamic neurons in Thy::ChR2 slices were partially sensitive to antagonists of GABA receptors, suggesting that at least some GABAergic neurons projecting to STN expressed ChR2. STN neurons receive massive projections from *globus pallidus* (Smith et al., 1998). A possible explanation is thus that neurons in *globus pallidus* express ChR2-YFP at low level. Besides, a significant TTX-resistant component of current was evoked by light. This later experiment result suggests some ectopic expression of ChR2-YFP in subthalamic neurons of Thy::ChR2 mice. Thy::ChR2 mice should therefore only be used when light can be directed to areas away from the recording sites.

By contrast, in virally-transfected mice, ChR2 activation directed to the STN itself or the internal capsule did not elicit action potential-independent synaptic transmission when short-lived illuminations were used. Accordingly, ChR2 has been expressed in cortical neurons and the axons or terminal arbors themselves were directly excited by light, triggering transmitter release without the need for illuminating of parent somata (Petreanu et al., 2007; Kiritani et al., 2012; Kress et al., 2013). TTX or APV, an AMPA/kainate receptor inhibitor, fully blocked light-evoked responses in subthalamic neurons. Thus, the following steps might be involved: light activated ChR2 which in turn elicited action potentials in ChR2-expressing pre-synaptic cortical fibers/terminals, induced glutamate release and ultimately produced AMPA/kainate EPSCs in STN neurons.

Negative control of cortico-subthalamic transmission by post-synaptic dopamine D5 receptors

The STN response to cortical stimulation has been studied *in vivo* (Kitai and Deniau, 1981; Nambu et al., 2000; Farries et al., 2010; Degos et al., 2013). It is complex, involving several components, but only the earliest excitatory component is due to direct monosynaptic cortical activation. This excitation has powerful effect on output nuclei firing. In brain slices,

however, studies have assumed so far that electrically stimulating the internal capsule reproduced cortical excitation, although this likely includes both cortical and thalamic excitation, with possible brainstem and midbrain involvement (Bevan and Bolam, 1995). Whether these synaptic inputs have common properties has not been studied yet.

The average size and decay of the photo-evoked EPSCs are in the same order of magnitude as those produced by internal capsule stimulation which were able to change the firing frequency of STN neurons biphasically (Farries et al., 2010). But in the presence of dopamine, EPSCs are likely to be smaller because of the action of post-synaptic D5 (present study) and of pre-synaptic D2 receptors (Shen and Johnson, 2000). The negative action of D5 receptor we report here is unusual for receptors in the D1 family. Whereas PKA signaling is usually activated by D5 receptor, this often leads to increase of glutamatergic transmission (Tiberi and Caron, 1994; Centonze et al., 2001; Valjent et al., 2009; Cahill et al., 2014). PKA signaling might be different at subthalamic neurons, either mediated by difference in the concentration or regulatory isoforms of PKA, or in the manner PKA couples to the receptor. The only study on the action of DA on glutamatergic synaptic transmission showed that dopamine acting at receptors in the D2 family on axon terminals of STN afferents reduced the initial probability of glutamate release (Shen and Johnson, 2000). Again, we do not know whether the D2 receptors were on corticofugal afferents and / or on afferents from other structures. The common feature of the actions of D2 receptor and that of D5 receptor is however that both concur to reducing synaptic input. In Parkinson's disease or experimental models of the disease then, a first hypothesis is that cortical input to STN might be strengthened. The assumption fits well with the data *in vivo* showing an increased coherence between cortex and STN in experimental model of Parkinson's disease as well as in patients (Levy et al., 2002; Sharott et al., 2005; Mallet et al., 2008; Litvak et al., 2011).

Dynamics of laser-evoked cortico-subthalamic responses

We assumed that the properties of ChR2 kinetics we established using illuminations of neuron cell bodies were similar to that of axons and terminals within the STN. Whether this is truly the case requires direct experimental confirmation. Our data using standard electrical stimulations of internal capsule (not shown) support that there were no major discrepancies. The ChR2 channel is not only permeable to monovalent ions (mainly Na⁺, K⁺) but also to Ca²⁺ (Boyden et al., 2005). Therefore, Ca²⁺ entry must accompany the depolarization of pre-

synaptic fibers. This is below threshold of synaptic activation since, in the absence of action potentials, when TTX was used, no synaptic transmission occurred but it cannot be excluded that the Ca^{2+} entry accompanying the action potential changed the properties of glutamate release (Schoenenberger et al., 2011).

Synapses exhibit diverse forms of short-term plasticity that reflect the interplay of numerous pre- but also post-synaptic mechanisms (Beierlein et al., 2007). Consequently, synapses filter spikes in distinctive ways. As a rule, a single photo-stimulus generally decreased glutamate release by a subsequent photo-stimulus at cortico-subthalamic synapses. This led to depressed post-synaptic currents with repetitive photo-stimulations i.e. short-term depression with presumably high initial release probability. But this was not the case for the first paired stimulations in photo-stimulus trains between 0.1 Hz and 15 Hz. Surprisingly, this was not the case either at 10 Hz for the 5 first flashes. Instead, paired stimulations between 0.1 and 15 Hz as well as photostimuli at 10 Hz for 500 ms produced similar EPSCs size. Our results therefore suggest that the cortico-subthalamic synapse has also low pass filtering properties. To assess the implications of this finding for cortico-subthalamic synapse computations, complementary issues must be explored. First, the firing properties of corticofugal neurons projecting to the STN must be determined in conjunction with the firing frequencies and patterns relevant to their function. Second, both capacity of rate coding and temporal discrimination has been ascribed to glutamatergic synapses in the STN (Farries et al., 2010) How does that translate in responses to stimulus trains (if these are physiologically relevant) will need to be examined too. Finally, if rather than transmitting an efferent copy of the motor command, the cortico-subthalamic input is involved in associative control of movement (Kita and Kita, 2012; Haynes and Haber, 2013) are the filtering properties changed in Parkinson's disease or in dopamine-depleted states?

References

- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420-424.
- Afsharpoor S (1985) Topographical projections of the cerebral cortex to the subthalamic nucleus. *The Journal of comparative neurology* 236:14-28.
- Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54:205-218.
- Aron AR, Poldrack RA (2006) Cortical and subcortical contributions to Stop signal response inhibition: role of the subthalamic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2424-2433.
- Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A (2003) D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:816-825.
- Beierlein M, Fioravante D, Regehr WG (2007) Differential expression of posttetanic potentiation and retrograde signaling mediate target-dependent short-term synaptic plasticity. *Neuron* 54:949-959.
- Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C (2006) Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140:77-86.
- Bevan MD, Bolam JP (1995) Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:7105-7120.
- Bosch C, Mailly P, Degos B, Deniau JM, Venance L (2012) Preservation of the hyperdirect pathway of basal ganglia in a rodent brain slice. *Neuroscience* 215:31-41.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience* 8:1263-1268.
- Brecht M, Schneider M, Sakmann B, Margrie TW (2004) Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature* 427:704-710.
- Brunenberg EJ, Moeskops P, Backes WH, Pollo C, Cammoun L, Vilanova A, Janssen ML, Visser-Vandewalle VE, ter Haar Romeny BM, Thiran JP, Platel B (2012) Structural and resting state functional connectivity of the subthalamic nucleus: identification of motor STN parts and the hyperdirect pathway. *PloS one* 7:e39061.
- Cahill E, Salery M, Vanhoutte P, Caboche J (2014) Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Frontiers in pharmacology* 4:172.
- Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA (1988) Somatosensory inputs to the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain research* 458:53-64.
- Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain research* 513:43-59.

- Centonze D, Picconi B, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2001) Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *The European journal of neuroscience* 13:1071-1077.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends in neurosciences* 13:99-104.
- Cruikshank SJ, Urabe H, Nurmikko AV, Connors BW (2010) Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron* 65:230-245.
- D'Aouast JP, Tiberi M (2010) Role of the extracellular amino terminus and first membrane-spanning helix of dopamine D1 and D5 receptors in shaping ligand selectivity and efficacy. *Cellular signalling* 22:106-116.
- Degos B, Deniau JM, Chavez M, Maurice N (2013) Subthalamic nucleus high-frequency stimulation restores altered electrophysiological properties of cortical neurons in parkinsonian rat. *PLoS one* 8:e83608.
- Demchyshyn LL, McConkey F, Niznik HB (2000) Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *The Journal of biological chemistry* 275:23446-23455.
- Eagle DM, Baunez C, Hutcheson DM, Lehmann O, Shah AP, Robbins TW (2008) Stop-signal reaction-time task performance: role of prefrontal cortex and subthalamic nucleus. *Cereb Cortex* 18:178-188.
- Farries MA, Kita H, Wilson CJ (2010) Dynamic spike threshold and zero membrane slope conductance shape the response of subthalamic neurons to cortical input. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:13180-13191.
- Forstmann BU, Keuken MC, Jahfari S, Bazin PL, Neumann J, Schafer A, Anwander A, Turner R (2012) Cortico-subthalamic white matter tract strength predicts interindividual efficacy in stopping a motor response. *NeuroImage* 60:370-375.
- Fujimoto K, Kita H (1993) Response characteristics of subthalamic neurons to the stimulation of the sensorimotor cortex in the rat. *Brain research* 609:185-192.
- Galvan A, Wichmann T (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 119:1459-1474.
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324:354-359.
- Haynes WI, Haber SN (2013) The organization of prefrontal-subthalamic inputs in primates provides an anatomical substrate for both functional specificity and integration: implications for Basal Ganglia models and deep brain stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:4804-4814.
- Hershey T, Campbell MC, Videen TO, Lugar HM, Weaver PM, Hartlein J, Karimi M, Tabbal SD, Perlmutter JS (2010) Mapping Go-No-Go performance within the subthalamic nucleus region. *Brain : a journal of neurology* 133:3625-3634.
- Holmes A, Hollon TR, Gleason TC, Liu Z, Dreiling J, Sibley DR, Crawley JN (2001) Behavioral characterization of dopamine D5 receptor null mutant mice. *Behavioral neuroscience* 115:1129-1144.

- Jahfari S, Waldorp L, van den Wildenberg WP, Scholte HS, Ridderinkhof KR, Forstmann BU (2011) Effective connectivity reveals important roles for both the hyperdirect (fronto-subthalamic) and the indirect (fronto-striatal-pallidal) fronto-basal ganglia pathways during response inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:6891-6899.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100:689-699.
- Kiritani T, Wickersham IR, Seung HS, Shepherd GM (2012) Hierarchical connectivity and connection-specific dynamics in the corticospinal-corticostriatal microcircuit in mouse motor cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:4992-5001.
- Kita T, Kita H (2012) The subthalamic nucleus is one of multiple innervation sites for long-range corticofugal axons: a single-axon tracing study in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:5990-5999.
- Kitai ST, Deniau JM (1981) Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain research* 214:411-415.
- Kolomiets BP, Deniau JM, Maily P, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM (2001) Segregation and convergence of information flow through the cortico-subthalamic pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:5764-5772.
- Kress GJ, Yamawaki N, Wokosin DL, Wickersham IR, Shepherd GM, Surmeier DJ (2013) Convergent cortical innervation of striatal projection neurons. *Nature neuroscience* 16:665-667.
- Leventhal DK, Gage GJ, Schmidt R, Pettibone JR, Case AC, Berke JD (2012) Basal ganglia beta oscillations accompany cue utilization. *Neuron* 73:523-536.
- Levy R, Ashby P, Hutchison WD, Lang AE, Lozano AM, Dostrovsky JO (2002) Dependence of subthalamic nucleus oscillations on movement and dopamine in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 125:1196-1209.
- Li Q, Ke Y, Chan DC, Qian ZM, Yung KK, Ko H, Arbuthnott GW, Yung WH (2012) Therapeutic deep brain stimulation in Parkinsonian rats directly influences motor cortex. *Neuron* 76:1030-1041.
- Litvak V, Jha A, Eusebio A, Oostenveld R, Foltynie T, Limousin P, Zrinzo L, Hariz MI, Friston K, Brown P (2011) Resting oscillatory cortico-subthalamic connectivity in patients with Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 134:359-374.
- Mallet N, Pogosyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:4795-4806.
- Nambu A, Takada M, Inase M, Tokuno H (1996) Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2671-2683.

- Nambu A, Tokuno H, Hamada I, Kita H, Imanishi M, Akazawa T, Ikeuchi Y, Hasegawa N (2000) Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *Journal of neurophysiology* 84:289-300.
- Nelson AB, Kreitzer AC (2014) Reassessing models of Basal Ganglia function and dysfunction. *Annual review of neuroscience* 37:117-135.
- Paz JT, Deniau JM, Charpier S (2005) Rhythmic bursting in the cortico-subthalamo-pallidal network during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:2092-2101.
- Petreaanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K (2007) Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nature neuroscience* 10:663-668.
- Rouzaire-Dubois B, Scarnati E (1987) Pharmacological study of the cortical-induced excitation of subthalamic nucleus neurons in the rat: evidence for amino acids as putative neurotransmitters. *Neuroscience* 21:429-440.
- Schmidt R, Leventhal DK, Mallet N, Chen F, Berke JD (2013) Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nature neuroscience*.
- Schneider MB, Gradinaru V, Zhang F, Deisseroth K (2008) Controlling neuronal activity. *The American journal of psychiatry* 165:562.
- Schoenenberger P, Scharer YP, Oertner TG (2011) Channelrhodopsin as a tool to investigate synaptic transmission and plasticity. *Experimental physiology* 96:34-39.
- Sharott A, Magill PJ, Harnack D, Kupsch A, Meissner W, Brown P (2005) Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *The European journal of neuroscience* 21:1413-1422.
- Shen KZ, Johnson SW (2000) Presynaptic dopamine D2 and muscarine M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *The Journal of physiology* 525 Pt 2:331-341.
- Smith JB, Alloway KD (2010) Functional specificity of claustrum connections in the rat: interhemispheric communication between specific parts of motor cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:16832-16844.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Tiberi M, Caron MG (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *The Journal of biological chemistry* 269:27925-27931.
- Undieh AS (2010) Pharmacology of signaling induced by dopamine D(1)-like receptor activation. *Pharmacology & therapeutics* 128:37-60.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Fisone G, Girault JA (2009) Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in neurosciences* 32:538-547.
- Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, Wang D, Zhang F, Boyden E, Deisseroth K, Kasai H, Hall WC, Feng G, Augustine GJ (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:8143-8148.

Wilson CJ, Bevan MD (2011) Intrinsic dynamics and synaptic inputs control the activity patterns of subthalamic nucleus neurons in health and in Parkinson's disease. *Neuroscience* 198:54-68.

Yamawaki N, Magill PJ, Woodhall GL, Hall SD, Stanford IM (2012) Frequency selectivity and dopamine-dependence of plasticity at glutamatergic synapses in the subthalamic nucleus. *Neuroscience* 203:1-11.

Acknowledgments

We wish to thank the Regional Council of Aquitaine and Fondation de France who partly supported this work by grants 12006005 (FCAN scheme), and 2005013850 and 00016810, respectively. Financial support was also provided by CNRS, University of Bordeaux and Labex Brain (ANR-10-LABX-0043). D. Sibley (NINDS, Bethesda) and J. Drago (Monash University) allowed us to use the D5R and D1R mutant mice they engineered. J. Waddington (Royal College of Surgeons, Dublin) donated the D5R mutant mice we used to generate a colony. Confocal microscopy was done in the Imaging Center of the University of Bordeaux (BIC). We thank Q. Barraud and G. Courtine (EPFL, Lausanne) for their help in the preliminary phase of the study. We acknowledge the help of Gilles le Pape (AnaStats, Les Vigneaux, France, www.anastats.fr) for the statistical analysis of intrinsic parameters of neurons. L.F received a PhD fellowship from MRT.

Figure legends

Figure 1: Fast, light-evoked responses in subthalamic neurons in brain slices from Thy::ChR2 transgenic mice

- A. Confocal images illustrating the expression of ChR2-EYFP. Whole brain (left). In the striatum and the internal capsule (middle), ChR2-EYFP fluorescence was located in fibers. The subthalamic nucleus (STN, right) displayed a dense network of ChR2-EYFP fibers around spaces devoid of fluorescence, presumably neuron somata. 50 μm parasagittal sections from a 5-week transgenic Thy::ChR2 mouse brain after tissue fixation and immunolabelling of EYFP. Scale bars, 10 μm .
- B. Left, illustration of experiment configuration, including positions of recording electrode and laser stimulus (blue beam), ChR2-EYFP expression shown in green. Middle panel, responses of ChR2-EYFP expressing pyramidal neurons to successive applications of a 500 ms laser stimulation at 473 nm (blue bar) and of a 500 ms intracellular current step (drawn below the voltage traces) in 3 pyramidal neurons. The bars to the left of the voltage traces indicate 0 mV. Right panel, illustration of responses to laser flashes of varying durations and luminances in a single pyramidal neuron. Group data show that, on average, flash duration below 1 ms elicited one action potential. The range of light intensity tested was 0.66 to 1.15 mW/mm^2 .
- C. Left, illustration of experiment configuration. A 1 ms illumination at 473 nm elicited stable inward currents (middle trace). The grey traces show six single sweep currents, the thick dark trace showing the average of the single sweep currents. Box plots of peak, charge, time taken to decay from 20 to 80 % of peak, as well as onset to latency in a sample of 14 subthalamic neurons are presented (right).
- D. Sequential applications of antagonists of ionotropic GABA receptors (picrotoxin, 50 μM and CGP 55845, 1 μM), of antagonists of fast glutamatergic transmission (DNQX, 20 μM and D-APV, 50 μM), and of TTX (1 μM). All reduced the light-induced current in STN neurons. Group data show the peak currents in control and in the 3 conditions, and the fraction of control current still present in the presence of D-APV and DNQX, and of APV and DNQX plus TTX.

Figure 2: Adenovirus injections into cortex produce ChR2-EYFP expression, including axonal projections within the subthalamic nucleus

A1 and A2 display the same image of EYFP epifluorescence in a 50 μm parasagittal section from a 42-day-old (D42) mouse brain. The outlines of striatum, thalamus, subthalamic nucleus (STN) and *substantia nigra* (SN) were drawn in A2 using the over-exposed fluorescence view. Stars indicate the locations of the high magnification images of cortex (B), striatum (C), internal capsule (D) and STN (E).

Cortex was injected with 1.5 μl of adenovirus *in vivo* on D28. Tissue was fixed 2 weeks later.

Figure 3: ChR2-expressing pyramidal cortical neurons responded directly to light stimuli.

- A. Schematic of the experimental configuration. Viruses carrying genes for a ChR2-EYFP fusion protein construct had been injected in frontal cortex of mice *in vivo*.
- B. Prolonged blue (473 nm) illumination (middle trace) directed at the cortex generated spikes throughout the stimulus (top trace) or a biphasic photocurrent with an initial peak followed by a sustained component (bottom trace). Traces come from different neurons. The inset illustrates short onset latency of the photocurrent (thick trace, photocurrent and thin blue trace, flash).
- C. Example of coordinated changes in flash luminance and duration applied to a EYFP-ChR2 positive pyramidal neuron. Increasing the flash duration from 0.4 to 1 ms at a luminance of 0.99 mW/mm^2 induced the discharge of 3 actions potentials. Conversely, increasing the flash luminance from 0.99 mW/mm^2 to 1.15 mW/mm^2 produced 2 actions potentials.
- D. Summary graph of the number of action potentials elicited by increasing flash durations. The luminance range was 0.66 to 1.15 mW/mm^2 .

Figure 4: Repetitive optical stimulations up to 40 Hz reliably induce repetitive action potential firing.

- A. Example of discharges due to trains of 0.5 ms flashes (blue bars) at frequencies between 1 and 120 Hz in a ChR2-EYFP-positive pyramidal neuron. Spikes were evoked by each flash in trains between 1 and 40Hz. Trains of flashes of frequencies higher than 40 Hz were less efficient and the number of spikes was less than that the number of flashes.

- B. Summary data of experiments similar to that illustrated in A. Fidelity is the ratio of spike to flash counts, expressed in %. 1 was registered for one action potential for one flash and zero for no action potentials as well as two or more action potentials. Fidelity at flash rate of 40 Hz and above is significantly different from 100 %, indicating that on average the ability of ChR2 to evoke action potentials decreased with light pulse frequency. * indicates difference from 100 % at $p < 0.05$.

Figure 5: Optical activation of corticofugal fibers in the STN results in action potential-dependent glutamatergic synaptic transmission

- A. Schematic illustration of the experiment configuration. Light (blue beam) was directed to the STN itself and subthalamic neurons lying in the EYFP-ChR2 positive area within the STN boundaries were recorded in the whole cell patch clamp configuration.
- B. Left, single sweep examples of the inward current evoked by 6 successive 0.5 ms flashes. The flashes are indicated by the blue bar. The current differed both in peak amplitude and kinetics from one trial to the other.
 Right, top, average current evoked by the 6 successive flashes shown in B.
 Right, bottom, descriptive parameters of the inward currents obtained in a sample of 24 subthalamic neurons. Peak, charge of currents, time required for decaying from 20 to 80 % of peak value, and onset latency distributions are reported in box plots. Note that the average current peak was 100 pA and that the average onset latency was close to 2 ms.
- C. The inward currents are fully blocked by the specific AMPA/kainate receptor antagonist, DNQX (20 μ M), or by the sodium channel inhibitor, TTX (1 μ M). Thus, they are AMPA/kainate receptor mediated, excitatory post-synaptic currents (EPSCs) due to light-induced pre-synaptic action potentials. The black and grey traces illustrate currents photo-evoked in control and in the continued presence of the antagonists. The graphs to the right of each recording display the summary data of peak values before and after application of the drug.
- D. Excitatory post-synaptic currents (EPSCs) can reliably be elicited over time. Left, example of plot of peak, charge of photo-evoked EPSCs as well as cell capacity measured from a subthalamic neuron for 20 min. a and b illustrate the average current at times indicated by the shaded areas on the graph. Right, summary box plots of average peak and

charge values taken at 2 and 18 min in 20 min recordings of 9 subthalamic neurons. ns, no significant difference.

Figure 6: Activation of receptors in the D1/D5 family reduces light-evoked, cortico-subthalamic AMPA/kainate EPSCs

- A. Perfusion of SKF 82958 (5 μ M) reduces the peak and charge of light-evoked, cortico-subthalamic AMPA/kainate EPSCs. The thick black bar above the plots indicates perfusion of SKF 82958. Traces a and b on top of plots, are average traces of the points included in the shaded areas.
- B. No action of SKF 82958 (5 μ M) on peak amplitude and charge of light-evoked, cortico-subthalamic AMPA/kainate EPSCs in the continued presence of SCH 23390 (10 μ M).
- C. Box plot summaries of the action of D1/D5 agonists alone and in the continued presence of 10 μ M SCH 23390. D1/D5 agonists were SKF 82958, SKF 81297 or SKF 38393, 2-5 μ M. ‘Before’ refers to the 6 average values preceding the agonist perfusion, ‘after’ refers to the 6 average values measured after 10 min of perfusion.
- D. Summary of changes in peak and charge of EPSCs.
 ** indicates significant changes at $p < 0.01$; ns, non-significant.

Figure 7: Post-synaptic D5 receptors use a PKA-dependent pathway to inhibit cortico-subthalamic transmission

- A. Perfusion of D1/D5 agonists has no action in transgenic mice bearing a mutated D5 receptor (D5 $-/-$ mice). Top traces exemplify the average current before and after perfusion of 5 μ M SKF 82958 obtained in a subthalamic neuron from a D5 $-/-$ mouse. Box plots show group data of values of peak and charge in the two conditions.
- B. Perfusing the typical PKA activator forskolin (10 μ M) dramatically increased the light-evoked, cortico-subthalamic AMPA/kainate EPSCs. The inset shows that this was accompanied by an emergence of spontaneous synaptic events (indicated by *). The traces are average of 6 single sweep EPSCs. The inset is a single sweep trace.
- C. D1/D5 agonists were no more active in the sample cells tested with a peptide inhibitor (PKI, 20 μ M in pipette solution), to intracellularly inhibit protein kinase A, as illustrated by the average traces and shown by the data groups in box plots.
 ns, non-significant.

Figure 8: Repetitive EPSCs can be induced by repetitive trains of flashes in subthalamic neurons from mice and rats.

Representative examples of EPSCs obtained at light frequencies between 0.1 and 40 Hz in a subthalamic neuron in a brain slice from a mouse (A) and a rat (B).

Figure 9: Short term plasticity profiles obtained at light frequencies between 0.1 and 40 Hz show low pass filter properties of the cortico-subthalamic synapse

- A. Group data of the plasticity profiles obtained at light frequencies of 0.1, 1, 10, 20 and 40 Hz.
- B. Summary graph of the filter properties of the cortico-subthalamic synapses determined using photostimuli. The black line and symbols display the ratios of paired pulse values, i.e. peak values of the second to the first EPSC in a train. The grey plot shows the ratio of the eighth to the first EPSC in a train, except for the tests at 0.1 Hz. At 0.1 Hz, trains comprised only four photo-stimuli. Thus, the black symbol refers to the paired pulse value whereas the grey one reports the ratio of the fourth to the first EPSC in the 0.1 Hz trains. * denote values significantly different from 1.

Pyramidal neurons from	resting potential, mV	input resistance, M Ω	membrane capacitance, pF	firing frequency Hz
wild type C57Bl6 mice	-63.3 \pm 1.9 n=18	110 \pm 12 n=17	55.1 \pm 4.4 n=17	36.4 \pm 3.5 n=14
Thy::ChR2 mice (ChR2-EYFP-positive neurons)	-68.1 \pm 2.8 n=10	117 \pm 19 n=10	83.1 \pm 17.0 n=10	39.4 \pm 5.4 n=7
C57Bl6 mice (ChR2-EYFP-positive neurons)	-63.5 \pm 2.2 n=14	113 \pm 13 n=14	65.6 \pm 6,4 n=14	43.0 \pm 3.7 n=12
rat	-67.4 \pm 2.4 n=14	95.0 \pm 12.3 n=14	83.9 \pm 7.4 n=14	40.3 \pm 3.9 n=14
rat (ChR2-EYFP-positive neurons)	-66.1 \pm 3.0 n=9	98.2 \pm 15.6 n=9	100.3 \pm 11.4 n=9	31.5 \pm 3.6 n=9

Table 1. Electrical properties of ChR2-expressing pyramidal neurons do not differ from those of ChR2-devoided pyramidal neurons

Values are given as mean \pm se

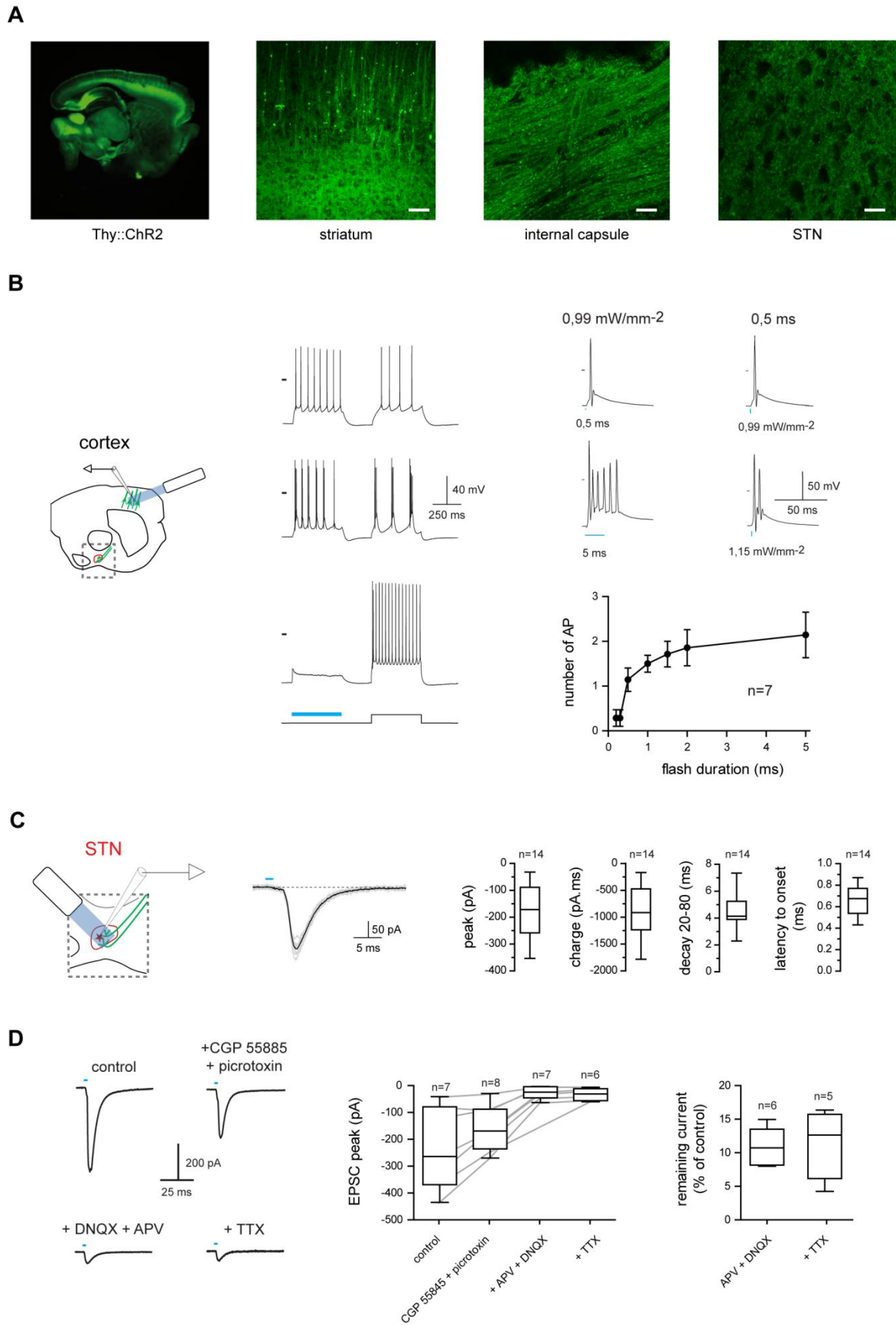


Figure 1

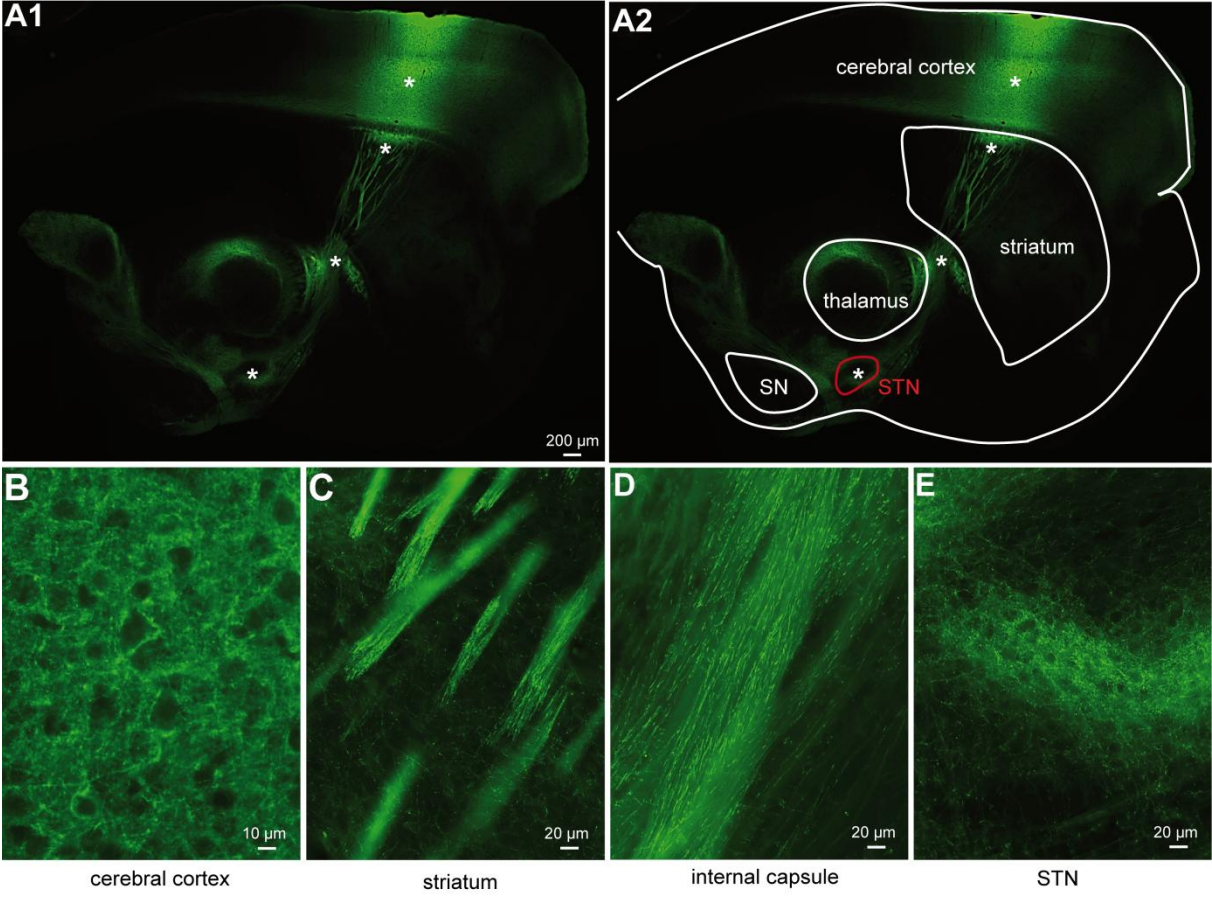


Figure 2

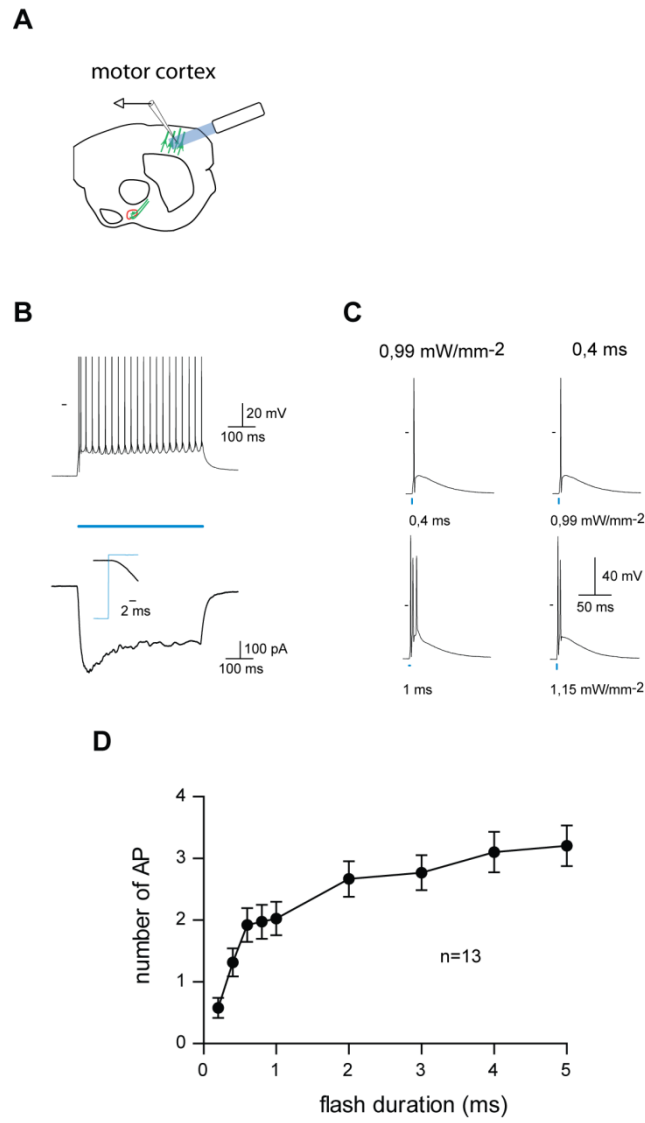


Figure 3

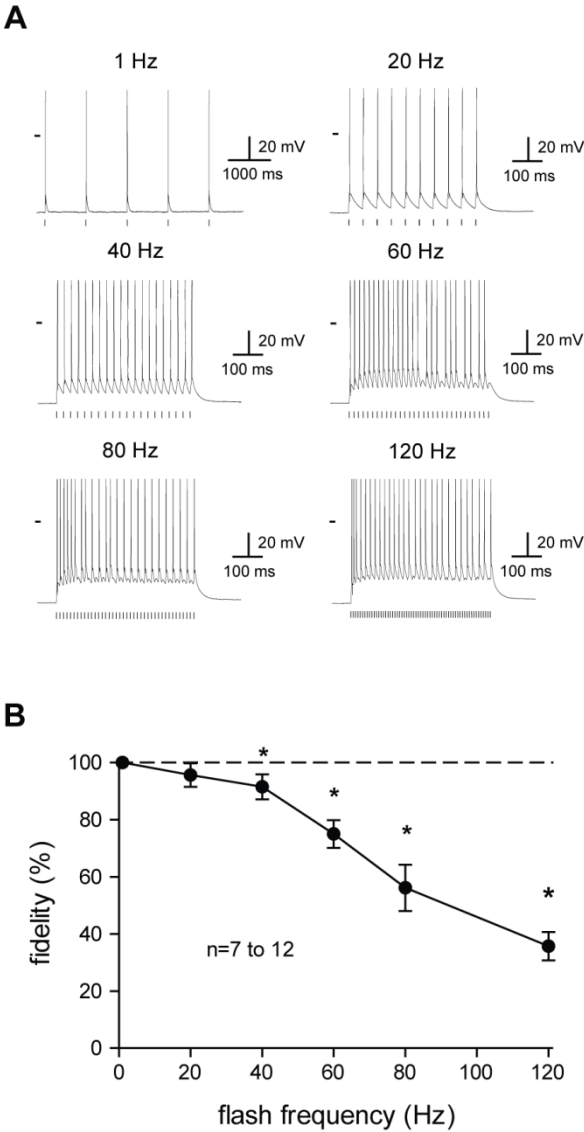


Figure 4

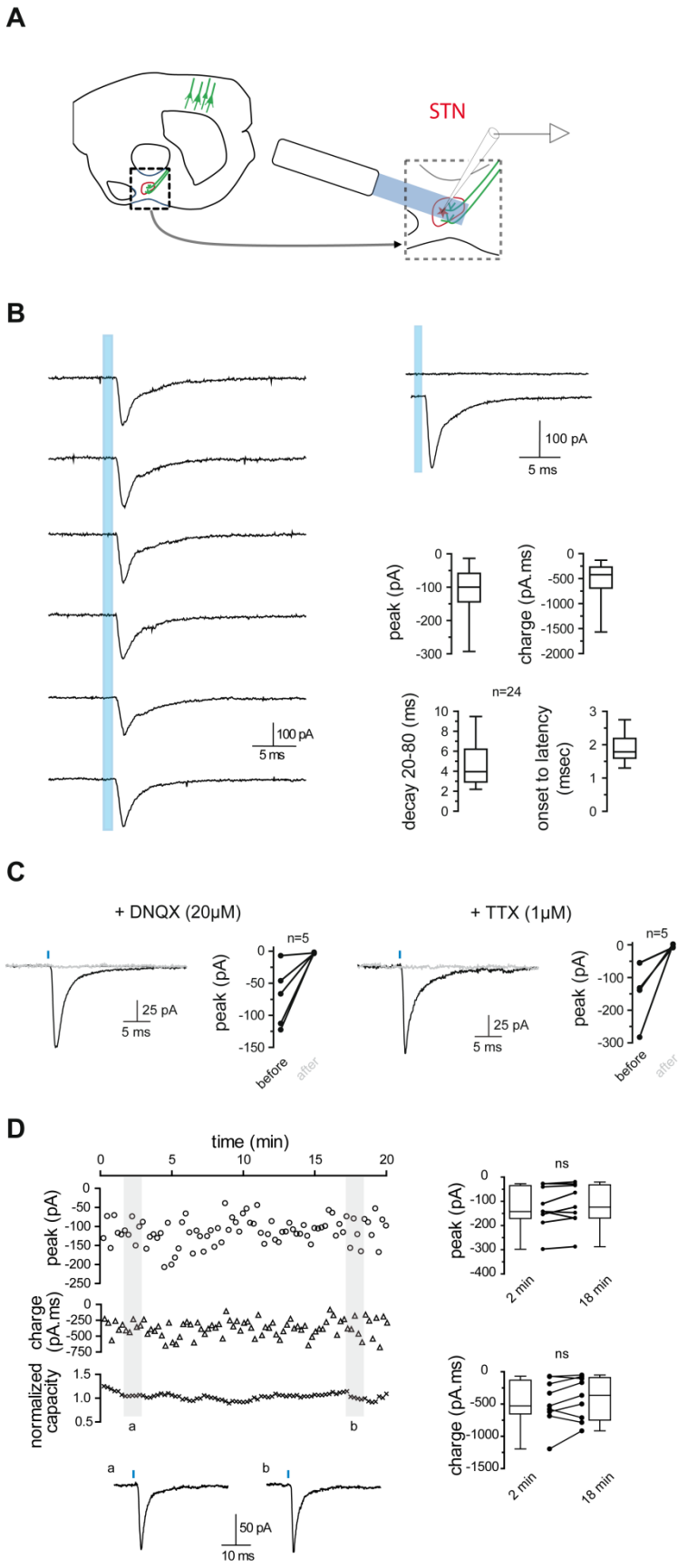


Figure 5

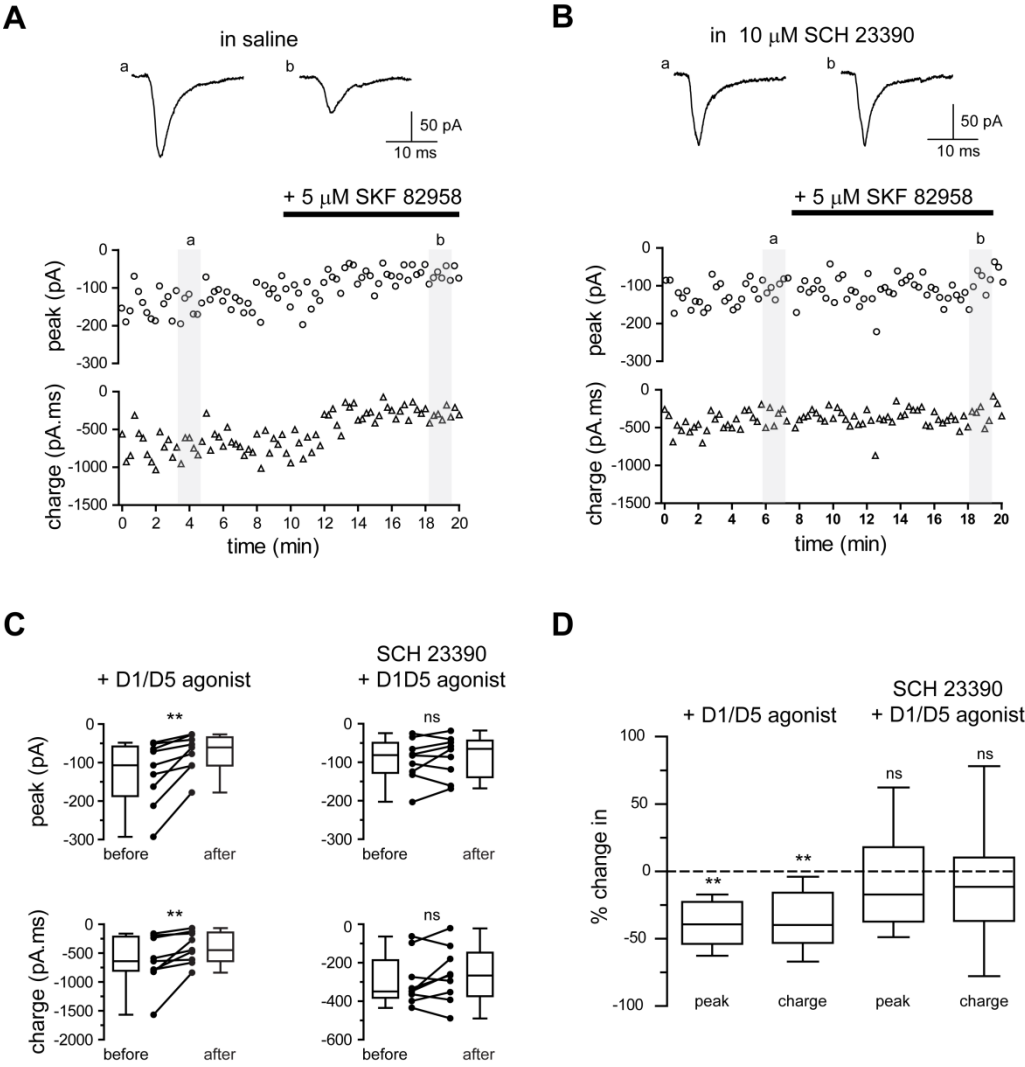


Figure 6

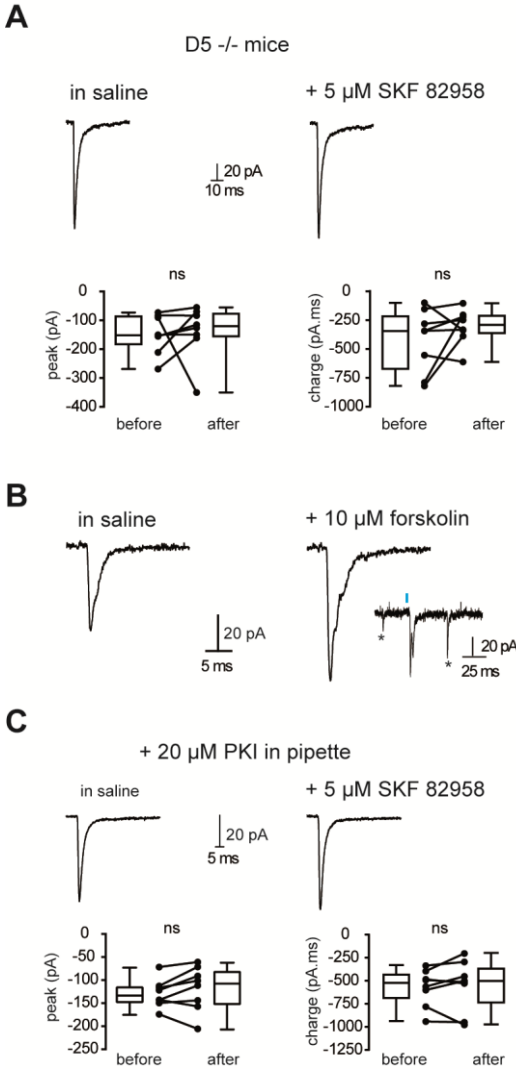


Figure 7

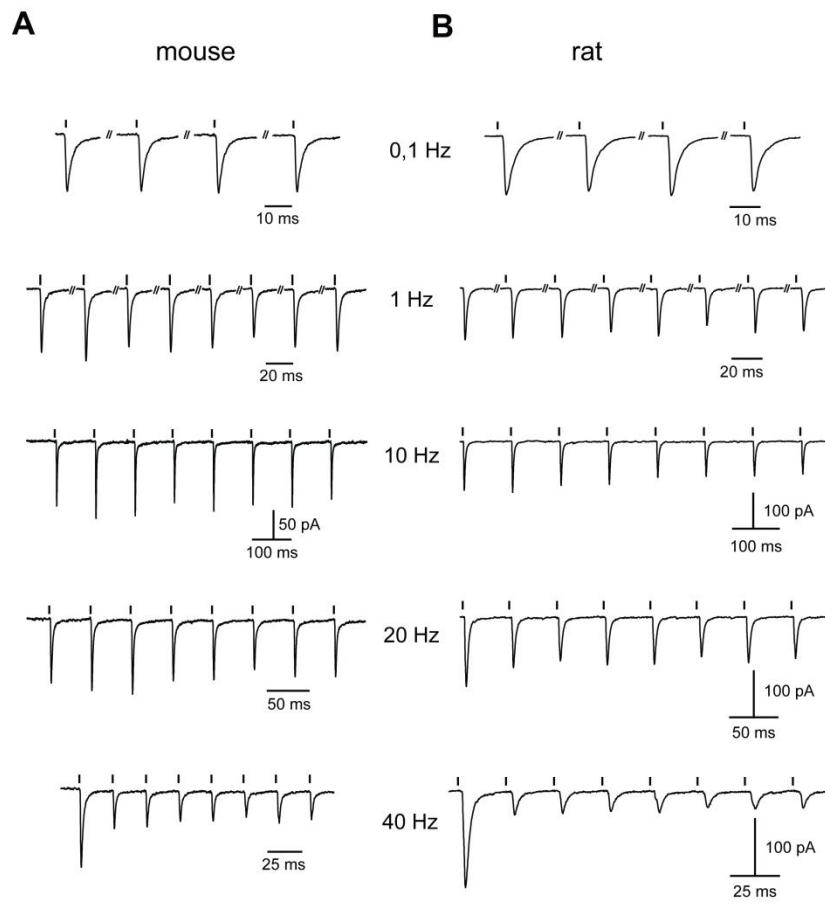


Figure 8

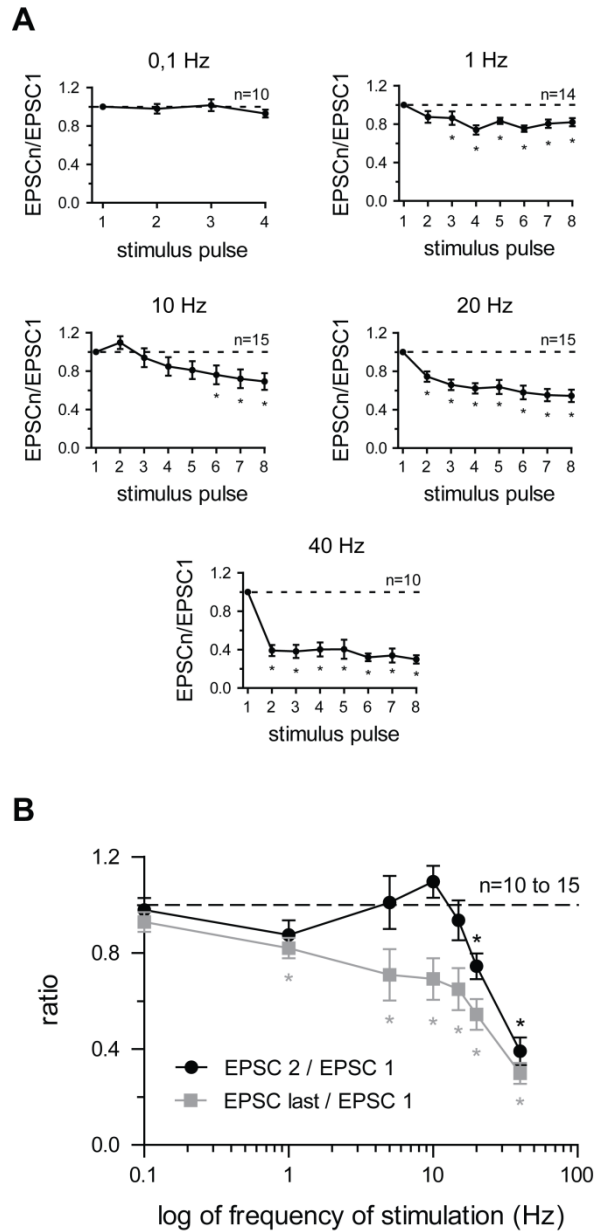


Figure 9

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ma thèse était d'étudier les propriétés de plasticité à court terme de la synapse cortico-sous-thalamique, ainsi qu'une éventuelle modulation de cette synapse par les RD5.

Pour pouvoir étudier la synapse cortico-sous-thalamique, nous avons dû, dans un premier temps, nous assurer qu'il était possible de stimuler les neurones pyramidaux de la couche V du cortex en utilisant cette technique sur des tranches de cerveau de Rongeur. Cette condition obligatoire a été remplie, aussi bien en utilisant le modèle de souris Thy :: ChR2 que l'approche d'injection de virus antérograde directement dans le cortex moteur chez la souris et le rat, puisque nous avons réussi à contrôler le rythme de décharge des neurones pyramidaux avec la lumière.

Dans un deuxième temps, nous devons nous assurer que l'optogénétique permettait d'étudier la transmission synaptique au niveau de la synapse cortico-NST. Et ce, dans des conditions comparables à la stimulation électrique, qui est depuis longtemps utilisée et reconnue pour étudier la transmission synaptique en neurosciences. Nous avons montré qu'il est possible d'induire des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) dépendants des récepteurs AMPA dans les neurones sous-thalamiques, en réponse à la stimulation optique de la capsule interne chez les souris Thy :: ChR2 et chez les animaux injectés avec un virus antérograde dans le cortex moteur. Cependant, nous avons également mis en évidence une expression de ChR2 dans les neurones sous-thalamiques chez les souris Thy :: ChR2, ce qui nous a conduits à abandonner l'utilisation de ce modèle pour la suite de notre étude.

Dans un troisième temps, nous avons mis en évidence que l'activation pharmacologique des récepteurs D5 entraîne une réduction de l'amplitude et de l'aire des courants AMPA au niveau de la synapse cortico-NST en utilisant une approche mêlant pharmacologie classique et souris transgéniques D1-/-¹ et D5-/. Nous avons également montré que l'inhibition des courants AMPA est post-synaptique et passe par l'activation de la protéine kinase A (PKA).

Enfin, l'étude des propriétés de plasticité à court terme de la synapse cortico-sous-thalamique a révélé que cette synapse se comportait comme un filtre passe-bas. Ainsi, la synapse cortico-NST favoriserait le transfert des informations corticales à basse fréquence et réduit l'influence des messages corticaux à haute fréquence sur le NST.

¹ Nous avons principalement utilisé les souris D1-/- pour nos expériences préliminaires de stimulation électrique car ces animaux sont fragiles et supportent mal la chirurgie stéréotaxique.

L'ensemble de ces résultats contribue à améliorer la connaissance de la synapse cortico-NST. Ils apportent aussi des informations importantes concernant l'utilisation de l'optogénétique dans le cadre de l'étude de la transmission synaptique et des phénomènes de plasticité à court terme. Ils montrent enfin que l'optogénétique est un bon moyen d'étudier spécifiquement une synapse dans des tranches de cerveau de rongeur.

1. CONTROLE DE L'ACTIVITE DES NEURONES PYRAMIDAUX DE LA COUCHE V DU CORTEX PAR LA LUMIERE

La première étape pour valider la technique d'optogénétique *in vitro* était de nous assurer que nous pouvions contrôler l'activité électrique des neurones à l'origine de la voie cortico-sous-thalamique, à savoir les neurones pyramidaux de la couche V du cortex. Souhaitant principalement étudier la synapse cortico-NST motrice, nous avons réalisé nos enregistrements dans le cortex frontal, incluant probablement le cortex moteur M1.

Les résultats présentés dans l'article en préparation montrent qu'il est possible de stimuler optiquement les neurones pyramidaux de la couche V du cortex dans nos conditions expérimentales. Nous avons également montré qu'il était possible d'obtenir un seul potentiel d'action par flash en adaptant les paramètres de la stimulation optique. Il était crucial de remplir cette dernière condition pour pouvoir contrôler efficacement l'activité électrique des neurones cortico-NST. Nous avons ensuite utilisé des trains de stimulations optiques afin de déterminer la fréquence de stimulation à partir de laquelle les neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur ne suivent plus parfaitement le rythme qui leur est imposé. Nous avons déterminé que pour des trains de 500 ms, la fréquence maximale que nous pouvions utiliser était proche de 40 Hz.

Deux paramètres pourraient être responsables de cette limite : les propriétés intrinsèques des neurones de la couche V du cortex moteur et les propriétés cinétiques de la ChR2 utilisée. Dans notre cas, la limitation viendrait principalement des propriétés intrinsèques des neurones corticaux. En effet, la fréquence maximale moyenne que nous avons relevée lors d'injections de créneaux de courants positifs par la pipette de patch était d'environ 40 Hz, ce qui montre que les neurones pyramidaux de la couche V ne déchargent généralement pas à des fréquences plus élevées quel que soit le mode de stimulation.

De plus, cette limitation varie selon la durée du train. En effet, les analyses de fidélité de la réponse des neurones corticaux à la stimulation optique ont été faites sur une durée de 500

ms, mais si on s'intéresse à des durées plus courtes, la fidélité est respectée pour des fréquences plus élevées que 40 Hz dans la plupart des cellules. En effet, la perte de fidélité apparaît souvent après plusieurs flashes et est de plus en plus conséquente en allant vers la fin du train de stimulations. Ainsi, pour des protocoles plus courts, il serait possible d'utiliser une fréquence maximale plus élevée de manière fiable.

La gamme de fréquence qu'il nous est cependant possible d'utiliser semble suffisante pour étudier la transmission cortico-NST à des fréquences physiologiques exprimées par le cortex, que ce soit au repos ou lors d'un mouvement. En effet, le rythme de décharge des neurones cortico-NST chez l'animal éveillé au repos est de l'ordre de 3 Hz (Li et al., 2012). Même si aucune donnée n'est disponible lors d'un mouvement pour les neurones cortico-NST, il a été montré que la stimulation d'un neurone de la couche V du cortex à 50 Hz suffisait à faire bouger une moustache chez le rat (Brecht et al., 2004), ce qui suggère que le mouvement serait associé à des fréquences de décharge des neurones de la couche V de l'ordre de plusieurs dizaines de Hz. Un article récent rapporte un pic de fréquence de 10 Hz dans le cortex moteur chez le rat pour un mouvement de poussée de levier réussi et de 20 Hz pour un même mouvement mais prématuré (Saiki et al., 2014).

Cependant, dans les expériences de transmission synaptique, nous avons stimulé optiquement les fibres et non les corps cellulaires des neurones cortico-NST. N'ayant pas les moyens techniques d'enregistrer directement les fibres cortico-NST lors de la stimulation, nous avons essayé d'enregistrer les potentiels d'action antidromiques induits dans les neurones pyramidaux de la couche V du cortex, en réponse à une stimulation optique des fibres cortico-NST passant dans le striatum et la capsule interne. Ces essais se sont révélés infructueux : nous n'avons pas été capables d'enregistrer ce type de réponse. Lors de la réalisation des tranches de cerveau, les fibres de la voie cortico-NST sont certainement coupées à plusieurs niveaux, ce qui pourrait expliquer cet échec. Il reste donc possible que les paramètres de stimulation permettant d'obtenir un seul potentiel d'action par flash dans les corps cellulaires des neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur ne soient pas ceux qui induisent un seul potentiel d'action dans les fibres cortico-NST.

2. UTILISATION DE L'OPTOGENETIQUE POUR ETUDIER LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE ET LES PHENOMENES DE PLASTICITE A COURT TERME DE LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE

Après avoir déterminé les paramètres optimaux de stimulation optique et la fréquence maximale à laquelle il était possible de contrôler parfaitement les neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur, nous devions nous assurer qu'il était possible d'évoquer des réponses synaptiques dans les neurones sous-thalamiques. Quel que soit le modèle utilisé, nous avons obtenu des réponses synaptiques en réponse à la stimulation optique des fibres cortico-NST au niveau de la capsule interne ou directement au niveau du NST.

Cependant, dans le cas des souris Thy :: ChR2, les courants obtenus n'étaient pas purement synaptiques puisque le blocage pharmacologique simultané de la transmission synaptique et des récepteurs ionotropiques au glutamate et au GABA n'a pas permis d'abolir totalement la réponse obtenue. Le courant restant présentait un délai inférieur à la milliseconde, ce qui laisse penser qu'il n'est pas synaptique, mais produit directement par les neurones sous-thalamiques. Nous avons donc conclu que les neurones du noyau sous-thalamique exprimaient un faible taux de ChR2 chez les souris Thy :: ChR2. Il semblerait que ce problème ne soit pas limité au noyau sous-thalamique. En effet, la réduction de l'amplitude moyenne des courants observée lors du blocage des récepteurs GABAergiques laisse supposer que la stimulation optique active également les fibres GABAergiques provenant du GPe. De plus, lors d'expériences complémentaires, nous avons mis en évidence le même type de courant résistant à la TTX et aux bloquants synaptiques dans le GPe et le noyau parafasciculaire du thalamus, deux structures projetant sur le NST. Ainsi, les souris Thy :: ChR2 semblent présenter une faible expression basale de ChR2 dans d'autres structures projetant sur le NST, contrairement à ce qui a été rapporté précédemment en utilisant une approche d'immunohistochimie (Gradinaru et al., 2009). L'ensemble de ces observations nous a conduits à écarter ce modèle pour la suite de l'étude.

Les résultats obtenus chez les souris Thy :: ChR2 mettent en avant l'importance de la mesure du délai des réponses obtenues lors de l'utilisation de l'optogénétique *in vitro* pour confirmer l'origine synaptique de ces dernières. En effet, l'optogénétique repose sur des techniques d'expression pouvant conduire dans de rares cas à l'expression ectopique du transgène. La mesure du délai synaptique semble donc être un moyen rapide et fiable pour détecter une éventuelle expression non désirée de la ChR2 dans la structure étudiée. Ces

résultats posent également la question de la pertinence de l'utilisation de l'immunohistochimie à elle seule pour attester de l'absence d'expression de ChR2 lors de la validation d'un modèle d'étude en optogénétique.

Les tests réalisés chez les souris et les rats ayant subi des injections de virus antérograde directement dans le cortex moteur se sont révélés plus satisfaisants. En effet, les courants obtenus étaient d'origine synaptique, uniquement glutamatergiques, dépendants des récepteurs AMPA à -80 mV et impliquaient une libération de glutamate dépendante des potentiels d'action. De plus, la plupart du temps, les réponses induites étaient simples, ce qui laisse penser que nos réponses étaient monosynaptiques et que la stimulation n'entraînait qu'un seul potentiel d'action par flash dans les fibres cortico-NST, même si les paramètres de stimulation ont été déterminés au niveau des corps cellulaires. Les propriétés des réponses ainsi obtenues ne semblent donc pas différentes des propriétés des réponses obtenues classiquement à l'aide d'une stimulation électrique des fibres pré-synaptiques.

3. LE RECEPTEUR D5 REDUIT LA TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE DEPENDANTE DES RECEPTEURS AMPA AU NIVEAU DE LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE

Grâce à l'utilisation de l'optogénétique nous avons mis en évidence un effet inhibiteur des récepteurs D5 sur la transmission glutamatergique dépendante des récepteurs AMPA au niveau de la synapse cortico-NST. C'est la première fois qu'un effet des récepteurs de la famille D1 est mis en évidence sur la transmission glutamatergique au niveau du NST.

Il faut préciser que si cet effet a été mis en évidence dans la majorité des neurones enregistrés, nous n'avons pas retrouvé cet effet pour 3 neurones sur 12 enregistrés. Ces 3 neurones ont été testés avec le même lot de SKF 81297 à un jour d'intervalle. L'utilisation d'un nouveau lot de SKF 81297 n'a plus produit ce type d'effet. Une proportion de neurones répondant différemment aux agonistes D1/D5 a également été rapportée dans une étude s'intéressant aux effets des récepteurs D5 sur la capacité de décharger en bouffées des neurones du NST (Baufreton et al., 2003). Ces résultats suggèrent qu'une petite proportion de neurones du NST pourrait ne pas exprimer de récepteurs D5 ou que l'activation des récepteurs D5 activerait des voies de signalisation différentes dans ces neurones.

L'effet observé pourrait être minimisé. En effet, l'utilisation de la configuration cellule entière entraîne une dialyse du milieu interne du neurone enregistré, ce qui peut conduire à la

dilution de certaines molécules impliquées dans le bon fonctionnement des voies de signalisation intracellulaire. Nous avons en effet remarqué que l'effet inhibiteur était plus marqué lorsque nous utilisions des pipettes présentant des résistances élevées ($> 10 \text{ M}\Omega$). Il est donc important de trouver un équilibre entre une résistance d'accès faible et stable, nécessaire pour réaliser des expériences de pharmacologie en configuration « potentiel imposé » (obtenue en utilisant des pipettes de faible résistance), et la diminution de la dialyse des protéines intracellulaires favorisée par des résistances de pipette élevées. L'utilisation du patch-clamp en configuration « patch perforé » pourrait aider à régler ce problème. Cependant, le « patch perforé » présente ses propres inconvénients. En effet, la perforation de la membrane par l'antibiotique se fait en continu et donc la résistance d'accès ne peut pas rester stable sur des enregistrements de longue durée, ce qui présente un inconvénient majeur pour une étude pharmacologique en configuration « potentiel imposé ». Le « patch-perforé » est d'ailleurs préférentiellement utilisé pour des expériences de « courant imposé ».

L'effet mis en évidence est post-synaptique et requiert la stimulation de la PKA. Le caractère post-synaptique de cet effet est en accord avec les études précédentes décrivant une expression préférentiellement post-synaptique des récepteurs D5 au niveau du NST chez le rat (Svenningsson and Le Moine, 2002; Baufreton et al., 2003; Rommelfanger and Wichmann, 2010). Nos résultats sont également en accord avec la seule étude mettant en évidence un effet des récepteurs D5 sur les neurones du NST (Baufreton et al., 2003). En effet, la modulation du mode de décharge des neurones du NST rapportée dans cette étude passe également par l'activation de la PKA. Les effets des récepteurs D5 passeraient, ainsi, préférentiellement par la voie de l'adénylate cyclase et de la PKA dans le NST.

Cependant, c'est la première fois, à notre connaissance, qu'une diminution des courants AMPA est décrite en réponse à l'activation de récepteurs de la famille D1 post-synaptiques. En effet, dans d'autres structures telles que l'hippocampe, le cortex préfrontal ou le striatum, l'activation post-synaptique des récepteurs de la famille D1 et de la PKA est classiquement associée à une augmentation des courants AMPA. Il est donc possible qu'un intermédiaire activé par la PKA entre en jeu dans l'effet que nous rapportons ici.

Deux études ont montré que l'activation des récepteurs de la famille D2 entraînait une diminution de la transmission glutamatergique au niveau du NST (Shen and Johnson, 2000; Yamawaki et al., 2012). Les synapses cortico-NST représentant une grande part des afférences glutamatergiques du NST, il est probable que les récepteurs D2 réduisent

également la transmission synaptique au niveau de la synapse cortico-NST. Ainsi, la dopamine pourrait avoir un effet inhibiteur global sur la transmission cortico-NST en agissant à la fois sur les récepteurs de la famille D2 pré-synaptiques et sur les récepteurs D5 post-synaptiques. En condition physiologique, la dopamine limiterait donc l'influence inhibitrice de la voie hyperdirecte sur le thalamus, ce qui favoriserait l'initiation du mouvement selon le modèle classique des GB. A l'inverse, en condition physiopathologique, comme lors de la maladie de Parkinson, la diminution du tonus dopaminergique sur la synapse cortico-sous-thalamique entraînerait une favorisation de la transmission cortico-NST, ce qui contribuerait à augmenter la puissance inhibitrice de la voie hyperdirecte sur le thalamus et donc empêcherait l'initiation du mouvement. Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation de l'activité des neurones du NST observée dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson (Galvan and Wichmann, 2008). Si on considère l'implication de la voie hyperdirecte dans la sélection des patrons moteurs désirés, la dopamine contribuerait à limiter l'inhibition de la voie cortico-NST pour permettre à la voie directe d'activer les patrons moteurs désirés en condition normale. En condition de déplétion dopaminergique, l'inhibition de la voie hyperdirecte sur le thalamus serait trop forte et généralisée, ce qui élèverait le seuil à partir duquel une activation de la voie directe désinhibe les territoires thalamiques correspondant aux patrons moteurs désirés. Il faut cependant garder à l'idée que les récepteurs D5 ont une activité constitutive et pourraient donc permettre de conserver un tonus inhibiteur sur la transmission glutamatergique, même en condition de déplétion dopaminergique. Il serait à ce titre intéressant d'étudier les effets de l'activité intrinsèque des RD5 sur la transmission cortico-NST à l'aide d'un peptide découplant ou d'agonistes inverses des récepteurs D5, comme par exemple le flupenthixol, afin de mesurer l'importance du tonus exercé par l'activité intrinsèque du récepteur D5 sur la transmission cortico-NST.

Les résultats préliminaires obtenus au cours de la thèse soulignent qu'il est possible d'étudier spécifiquement la synapse cortico-NST. En effet, l'utilisation de stimulations électriques pour étudier un éventuel effet des récepteurs D5 sur la transmission glutamatergique n'a donné aucun résultat global chez les souris D1^{-/-} et D5^{-/-}. Même s'il est nécessaire de confirmer ce résultat chez des souris C57bl6 sauvages, le manque de discrimination entre les différentes afférences glutamatergiques dans les études publiées jusqu'ici pourrait expliquer l'absence de données décrivant un effet des récepteurs de la famille D1 sur la transmission glutamatergique au niveau du NST, malgré leur proximité avec

les synapses glutamatergiques. Ces données confirment la nécessité d'augmenter le niveau de précision des études fonctionnelles et anatomiques s'intéressant aux effets ou à l'expression des récepteurs dopaminergiques vis-à-vis des différentes afférences glutamatergiques du NST. Il serait intéressant, à ce titre, de réaliser des expériences de microscopie électronique sur des animaux injectés avec un traceur antérograde dans le cortex moteur ou le noyau parafasciculaire du thalamus afin d'étudier la distribution des récepteurs D5 par rapport aux différentes afférences glutamatergiques du NST. Nous avons commencé ce type d'expérience en collaboration avec l'équipe du Dr. J.L. Lanciego à Pampelune. D'après nos résultats de pharmacologie, nous nous attendons à ce que l'expression du récepteur D5 soit préférentiellement localisée à proximité des synapses cortico-NST. De même, les résultats préliminaires de l'équipe d'Alicia Rivera présentés dans la **figure 30** sont importants car ils montrent 1) que les RD5 sont principalement exprimés au niveau des épines dendritiques des neurones sous-thalamiques et 2) un changement d'expression des récepteurs D5 chez les animaux en condition de déplétion dopaminergique.

4. LA SYNAPSE CORTICO-SOUS-THALAMIQUE JOUE UN ROLE DE FILTRE PASSE-BAS

Les travaux réalisés pendant la thèse ont également mis en évidence que les synapses cortico-NST ont des propriétés de filtre passe-bas. Ainsi, en condition physiologique, la synapse cortico-NST favoriserait le transfert des informations corticales à basse fréquence et réduirait l'influence des messages corticaux à haute fréquence sur le NST.

Ces résultats s'opposent à ceux précédemment décrits (Shen et al., 2003; Bosch et al., 2012; Yamawaki et al., 2012). En effet, aucune plasticité à court terme n'a été mise en évidence, que ce soit au niveau de la synapse cortico-NST ou au niveau des synapses glutamatergiques du NST en général. Cependant, les études réalisées jusqu'ici se sont concentrées sur la plasticité à court terme exprimée après seulement deux stimulations. Ceci ne permet pas d'évaluer la plasticité à court terme exprimée lorsque la synapse cortico-NST reçoit des trains de stimulations, ce qui est plus probable en conditions physiologiques. Si on se concentre uniquement sur la plasticité à court terme exprimée après deux stimulations, nos résultats rejoignent ceux rapportés par Bosch et coll. pour les fréquences inférieures à 20 Hz. En revanche, à 20 Hz et 40 Hz nous mettons en évidence une dépression à court terme de la

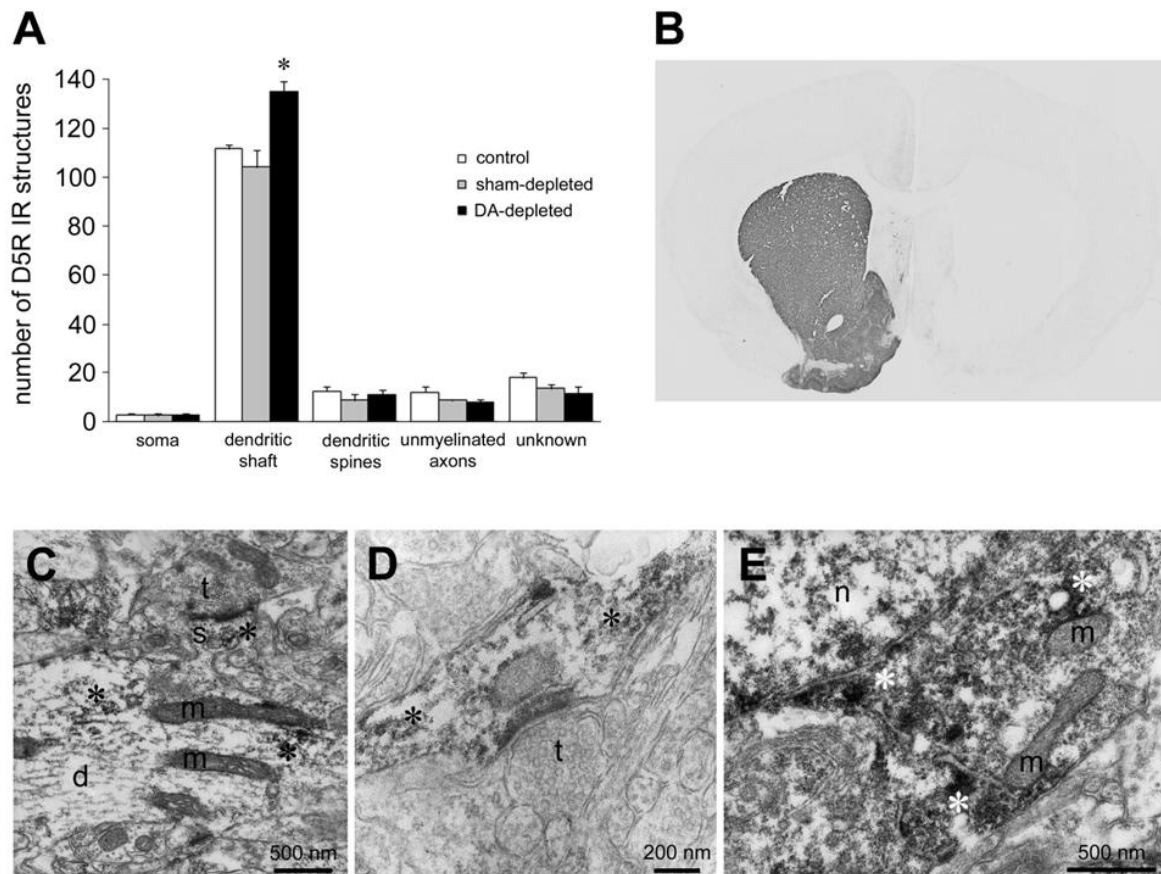


Figure 30 : Les récepteurs D5 sont principalement localisés au niveau du tronc dendritique des neurones du NST et leur nombre augmente en condition de déplétion dopaminergique.

Résultats préliminaires obtenus par l'équipe d'Alicia Rivera (Malaga, Espagne). **A** : Histogramme illustrant le nombre de structures identifiées comme soma, tronc dendritique, épine dendritique, axones non myélinisés ou « non défini » présentant une immunoréactivité pour le récepteur D5. Trois conditions : contrôle, côté non lésé (« sham ») et côté lésé (« DA-depleted »). *, différence significative entre côté lésé et côté non lésé. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn. **B** : Image de microscopie optique d'une coupe coronale de cerveau de rat lésé à la 6-OHDA après révélation de la tyrosine hydroxylase. On remarque une disparition des fibres dopaminergiques dans le striatum du côté de la lésion (hémisphère droit) par rapport au côté non lésé (hémisphère gauche). **C-D** : Images de microscopie électronique montrant les différentes localisations des récepteurs D5 (étoiles) dans le noyau sous-thalamique d'un rat lésé à la 6-OHDA. **C** : tronc dendritique (d) avec une épine dendritique (s) montrant la synapse asymétrique d'une terminaison synaptique (t). **D** : Récepteurs D5 dans un tronc dendritique, terminaison (t). **E** : Récepteurs D5 associés au réticulum endoplasmique dans le cytoplasme d'un neurone sous-thalamique. m = mitochondrie.

synapse cortico-NST dès la deuxième stimulation. Deux grandes différences entre notre étude et celle de Bosch et coll. pourraient expliquer ces résultats divergents.

La première est purement technique. En effet, nous avons utilisé l'optogénétique et stimulé directement les fibres cortico-NST au niveau de la capsule interne ou du NST alors que Bosch et coll. ont utilisé des tranches parasagittales permettant de stimuler électriquement les somas des neurones cortico-NST. Une étude très récente rapporte des différences entre stimulation optique et électrique (Jackman et al., 2014). D'après cette dernière, l'utilisation de l'optogénétique aurait tendance à favoriser l'apparition d'une dépression synaptique à court terme lors de stimulations répétées. Cependant, cette observation varie selon la synapse étudiée, le modèle d'expression utilisé pour la ChR2 ou encore selon que l'on stimule les corps cellulaires, les fibres ou les terminaisons des neurones post-synaptiques. D'après Jackman et coll., il serait préférable d'utiliser des animaux transgéniques et de stimuler les corps cellulaires des neurones pré-synaptiques pour éviter de favoriser l'apparition d'une dépression à long terme. Ainsi, la dépression que nous avons observée à 20 Hz et 40 Hz pourrait venir de l'utilisation de l'optogénétique. Cependant, plusieurs arguments vont à l'encontre de cette hypothèse. Premièrement, il nous est arrivé à plusieurs reprises d'obtenir des potentialisations sur le PPR à ces fréquences dans certaines cellules, ce qui montre que la stimulation optique n'entraîne pas systématiquement une dépression dans nos conditions. Deuxièmement, même si ce modèle présente des inconvénients, lorsque nous avons réalisé des trains de stimulations optiques sur des souris Thy-ChR2, qui est un modèle de souris transgénique, nous avons observé le même type de dépression à 20 et 40 Hz. Troisièmement, lorsque nous avons reproduit ces expériences chez des rats sauvages en utilisant une stimulation électrique, nous avons obtenu le même type de profil de plasticité à court terme. Dans ces conditions, nous retrouvons une absence de plasticité à court terme des afférences glutamatergiques du NST après deux stimulations, comme dans les autres études. En revanche, après 8 stimulations électriques, nous obtenons le même profil que chez le rat injecté avec un virus antérograde, c'est-à-dire une dépression à court terme (**figure 31**). Quatrièmement, la transmission synaptique induite au niveau du NST est bien dépendante des potentiels d'action, ce qui montre qu'une éventuelle dépolarisation des terminaisons synaptiques due à l'activation de ChR2 est faible dans nos conditions, puisqu'elle ne suffit pas à entraîner une libération de glutamate à elle seule. De plus, nous avons essayé d'obtenir un profil de transmission en stimulant uniquement les fibres afférentes ou directement les

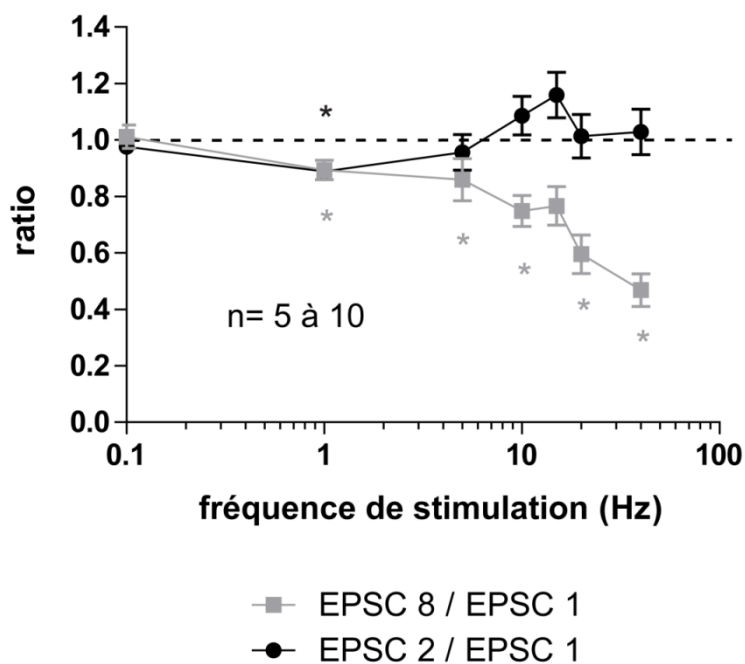


Figure 31 : Profil de plasticité à court terme des synapses glutamatergiques du NST obtenu par stimulation électrique de la capsule interne chez le rat.

La stimulation de la capsule interne à l'aide d'une électrode bipolaire standard active les afférences pré-synaptiques du NST quelle que soit leur origine (corticale, pallidale, thalamique, mésencéphalique...). En présence d'inhibiteurs des récepteurs du GABA, les synapses glutamatergiques présentent une propriété de filtre passe-bas pour 8 chocs dans toute la gamme de fréquence testée. Noter l'absence de plasticité synaptique lors de stimulations appariées. * = significativement différent de 1. Test des rangs signés de Wilcoxon.

terminaisons synaptiques sur une seule cellule. Ces expériences sont encore en cours puisqu'il est très difficile d'enregistrer le même neurone, tout en déplaçant la fibre optique et qu'il arrive très souvent qu'il ne soit pas possible d'obtenir de réponse synaptique significative en ne stimulant que les fibres au niveau de la capsule interne. Nous avons également utilisé de grands temps de pause entre chaque protocole de trains et après 40 Hz nous avons toujours changé de tranche afin d'éviter d'induire des phénomènes de plasticité à plus long terme. De même, comme pour les expériences de pharmacologie, nous avons vérifié la stabilité du premier EPSC de chaque train.

La deuxième différence majeure entre l'étude de Bosch et coll. et la nôtre est le degré de spécificité de la stimulation. En effet, nous n'avons pas ciblé la même zone corticale que Bosch et coll. et l'utilisation de la transfection nous a permis d'obtenir des réponses synaptiques plus robustes et donc impliquant probablement un plus grand nombre d'afférences corticales.

Pour résumer, malgré toutes les précautions mises en œuvre, il est possible que les résultats obtenus surévaluent l'importance de la dépression observée. Cependant, il est peu probable que l'optogénétique soit, à elle seule, responsable de la dépression à court terme observée dans nos conditions. Enfin, il est très difficile de réaliser une expérience répondant à cette interrogation dans le cadre de l'étude de la synapse cortico-NST, puisqu'il est impossible de comparer avec la même spécificité stimulation électrique et optique au niveau de cette synapse.

D'un point de vue fonctionnel, la voie hyperdirecte ayant une influence inhibitrice sur l'initiation des actes moteurs, les propriétés de filtre que nous avons mises en évidence contribueraient à réduire l'influence inhibitrice de la voie hyperdirecte sur l'initiation du mouvement pour des fréquences élevées. Sachant qu'une partie des fibres cortico-NST sont des collatérales de la voie cortico-spinale, la voie hyperdirecte peut être activée lorsqu'un acte moteur est commandé par le cortex à la moelle épinière. Il sera important de connaître la fréquence de décharge des neurones corticaux qui projettent sur le NST pour savoir si elle est caractérisée par une augmentation du rythme de décharge (comme celle des neurones cortico-spinaux). Si tel est le cas, nos résultats prédisent une dépression à court terme de la synapse cortico-NST lors d'un mouvement. Ainsi, lorsqu'un mouvement est produit, l'augmentation de la fréquence de décharge du cortex serait moins répercutée sur le NST grâce aux propriétés

de filtre passe-bas de la synapse cortico-NST. Ceci contribuerait à faciliter l'activation du thalamus par la voie directe lorsqu'un mouvement est en cours. Ce processus pourrait permettre d'éviter un blocage du réseau des GB lorsqu'un message est transmis par le cortex à la moelle épinière, voire même, de favoriser la sélection de nouveaux patrons moteurs lorsqu'un mouvement est déjà engagé.

Il serait intéressant d'étudier les propriétés de plasticité à court terme de la synapse cortico-NST en condition de déplétion dopaminergique. En effet, d'après plusieurs études, l'activité corticale serait modifiée lors de la maladie de Parkinson et la régularisation de celle-ci, que ce soit par stimulation directe du cortex ou par stimulation antidromique lors de la stimulation cérébrale profonde, est importante pour améliorer les symptômes de la maladie (Drouot et al., 2004; Li et al., 2012; Degos et al., 2013). Ainsi, selon les propriétés de filtres exprimées par la synapse cortico-NST dans ces conditions, l'influence du cortex sur le NST pourrait être amplifiée ou réduite et contribuer à aggraver les symptômes de la maladie. De plus, la stimulation cérébrale profonde pourrait induire des changements à long terme des propriétés de la synapse cortico-NST, en particulier les propriétés de plasticité à court terme. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de la stimulation cérébrale profonde sur la plasticité à court terme de la synapse cortico-NST pour mieux comprendre l'origine de ses effets.

Au final, il faut rappeler que l'interprétation de nos résultats dépend en grande partie du rythme de décharge des neurones cortico-NST, à la fois au repos et lors d'un mouvement. Très peu de données sont disponibles concernant les propriétés des neurones cortico-NST. Il n'y a même aucune donnée disponible dans la littérature concernant le comportement de ces neurones lors d'un mouvement. Il est donc important de mieux caractériser l'activité des neurones corticaux-NST, que ce soit au repos ou lors de la réalisation d'un mouvement *in vivo*. Il serait également nécessaire d'étudier les neurones cortico-NST *in vitro*, que ce soit en condition normale ou chez des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson afin de déceler d'éventuels changements de leurs propriétés intrinsèques. La caractérisation plus approfondie des neurones cortico-NST permettrait ainsi, d'avoir une vue d'ensemble du système étudié. Dans ce but, nous avons réalisé des injections stéréotaxiques de virus rétrograde dans le NST chez le rat. Ce type de virus permet de faire exprimer la protéine fluorescente mCherry dans les neurones qui projettent sur le lieu d'injection. Dans nos expériences, le virus étant injecté dans le NST, les neurones du cortex moteur expriment

mCherry, ce qui nous permet de les repérer. Au cours d'expériences électrophysiologiques préliminaires nous avons ainsi repéré et enregistré des neurones cortico-NST dans la couche V du cortex moteur sur tranche de cerveau de rat (**figure 32**). Il nous sera donc bientôt possible d'étudier les propriétés intrinsèques des neurones cortico-NST chez le rat normal et 6-OHDA.

Nous avons également réalisé des expériences préliminaires utilisant des injections spinales de virus rétrograde faisant exprimer la protéine fluorescente GFP dans les neurones infectés afin de cibler les neurones cortico-spinaux chez le rat. Les neurones cortico-NST étant au moins en partie des neurones cortico-spinaux, ce type d'approche pourrait nous permettre de comparer les propriétés des neurones cortico-spinaux avec celles des neurones cortico-NST, voire même d'étudier spécifiquement les synapses cortico-NST recevant des informations transmises à la moelle épinière en utilisant un virus portant le gène de la ChR2. Cependant, les tests réalisés jusqu'ici ne nous ont permis de marquer que quelques neurones pyramidaux dans la couche V du cortex par tranche de 100 μm , ce qui est trop peu pour réaliser des stimulations optiques des fibres cortico-NST issues de ces neurones au niveau de la capsule interne (**figure 33**).

Par ailleurs, l'étude du profil de plasticité à court terme pourrait être étendue aux autres synapses glutamatergiques projetant sur le NST. Il serait intéressant d'étudier d'éventuelles différences de propriétés de plasticité à court terme entre les synapses provenant des différents cortex. En effet, de telles variations auraient une forte influence sur l'impact des diverses structures ou aires corticales sur le NST.

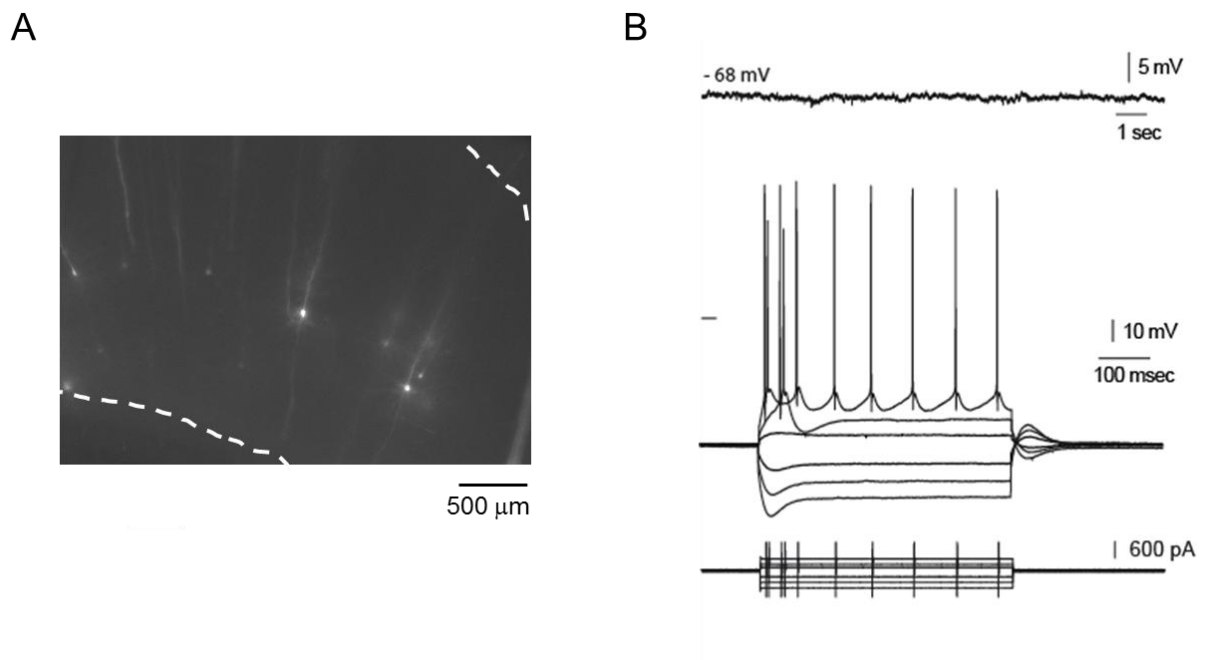


Figure 32 : Repérage et enregistrements de neurones cortico-sous-thalamiques.

A : Neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur dans une tranche vivante de cerveau de rat. L'animal a reçu une injection stéréotaxique de solution contenant un virus recombinant rétrograde (rRABV-mCherry) ciblant le noyau sous-thalamique. L'expression de la protéine fluorescente mCherry par les neurones infectés permet de repérer les neurones cortico-sous-thalamiques. **B :** Enregistrement électrophysiologique des propriétés de neurones cortico-sous-thalamiques en mode courant imposé. Au cours de ces expériences préliminaires, nous avons enregistré le potentiel de repos (haut) d'un neurone cortico-sous-thalamique ainsi que les variations du potentiel de membrane de ce dernier (milieu) en réponse à l'injection intracellulaire de créneaux de courants positifs et négatifs (bas).

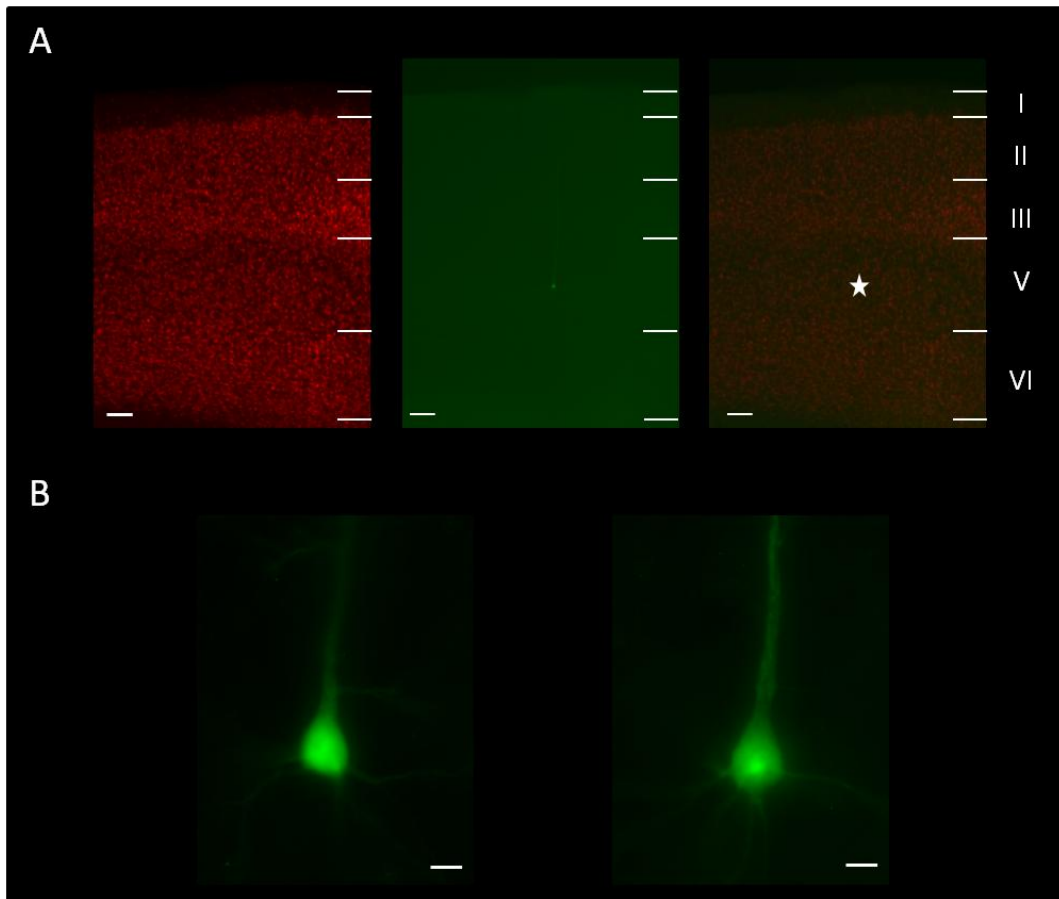


Figure 33 : Marquage rétrograde de neurones cortico-spinaux.

A : Vue à faible grossissement du cortex d'une coupe de cerveau de rat. L'animal a reçu une injection stéréotaxique de vecteur d'expression rétrograde (FuG-B-MND-EGFP-WPRE) dans la moelle épinière. La révélation du marqueur neuronal NeuN (gauche) permet de différencier les couches corticales. La révélation de l'EGFP exprimée par les neurones infectés permet de visualiser les neurones cortico-spinaux (milieu). Noter la localisation de ces neurones dans la couche V du cortex sur la superposition des deux marquages (droite). Echelle : 250 μ m. **B :** Neurones pyramidaux cortico-spinaux exprimant l'EGFP observés à plus fort grossissement. Echelle : 25 μ m.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott LF, Regehr WG (2004) Synaptic computation. *Nature* 431:796-803.
- Abraham WC, Williams JM (2003) Properties and mechanisms of LTP maintenance. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 9:463-474.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences* 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences* 13:266-271.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Progress in brain research* 85:119-146.
- Andre VM, Cepeda C, Cummings DM, Jocoy EL, Fisher YE, William Yang X, Levine MS (2010) Dopamine modulation of excitatory currents in the striatum is dictated by the expression of D1 or D2 receptors and modified by endocannabinoids. *The European journal of neuroscience* 31:14-28.
- Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54:205-218.
- Aron AR, Poldrack RA (2006) Cortical and subcortical contributions to Stop signal response inhibition: role of the subthalamic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2424-2433.
- Aron AR, Behrens TE, Smith S, Frank MJ, Poldrack RA (2007) Triangulating a cognitive control network using diffusion-weighted magnetic resonance imaging (MRI) and functional MRI. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:3743-3752.
- Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu N-P, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L, Sulzer D (2004) Heterosynaptic Dopamine Neurotransmission Selects Sets of Corticostriatal Terminals. *Neuron* 42:653-663.
- Baufreton J, Atherton JF, Surmeier DJ, Bevan MD (2005a) Enhancement of excitatory synaptic integration by GABAergic inhibition in the subthalamic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:8505-8517.
- Baufreton J, Zhu ZT, Garret M, Bioulac B, Johnson SW, Taupignon AI (2005b) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:1771-1777.
- Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A (2003) D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:816-825.
- Baunez C, Nieoullon A, Amalric M (1995) In a rat model of parkinsonism, lesions of the subthalamic nucleus reverse increases of reaction time but induce a dramatic premature responding deficit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:6531-6541.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* 63:182-217.

- Behr J, Gloveli T, Schmitz D, Heinemann U (2000) Dopamine depresses excitatory synaptic transmission onto rat subicular neurons via presynaptic D1-like dopamine receptors. *Journal of neurophysiology* 84:112-119.
- Beitz JM (2014) Parkinson's disease: a review. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 6:65-74.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *The European journal of neuroscience* 5:382-389.
- Berndt A, Schoenenberger P, Mattis J, Tye KM, Deisseroth K, Hegemann P, Oertner TG (2011) High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:7595-7600.
- Beurrier C, Bioulac B, Hammond C (2000) Slowly inactivating sodium current (I(NaP)) underlies single-spike activity in rat subthalamic neurons. *Journal of neurophysiology* 83:1951-1957.
- Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C (2006) Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140:77-86.
- Beurrier C, Congar P, Bioulac B, Hammond C (1999) Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:599-609.
- Bevan MD, Bolam JP (1995) Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:7105-7120.
- Bevan MD, Wilson CJ (1999) Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:7617-7628.
- Bevan MD, Clarke NP, Bolam JP (1997) Synaptic integration of functionally diverse pallidal information in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:308-324.
- Bevan MD, Atherton JF, Baufreton J (2006) Cellular principles underlying normal and pathological activity in the subthalamic nucleus. *Current opinion in neurobiology* 16:621-628.
- Bevan MD, Wilson CJ, Bolam JP, Magill PJ (2000) Equilibrium potential of GABA(A) current and implications for rebound burst firing in rat subthalamic neurons in vitro. *Journal of neurophysiology* 83:3169-3172.
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ (2002) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends in neurosciences* 25:525-531.
- Bischoff S, Barhanin J, Bettler B, Mülle C, Heinemann S (1997) Spatial distribution of kainate receptor subunit mRNA in the mouse basal ganglia and ventral mesencephalon. *The Journal of comparative neurology* 379:541-562.
- Blackstone C (2009) Infantile parkinsonism-dystonia: a dopamine "transportopathy". *The Journal of clinical investigation* 119:1455-1458.
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism & related disorders* 14 Suppl 2:S124-129.
- Blank T, Nijholt I, Teichert U, Kugler H, Behrsing H, Fienberg A, Greengard P, Spiess J (1997) The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of

- striatal N-methyl-D-aspartate responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14859-14864.
- Boeckers TM (2006) The postsynaptic density. *Cell and tissue research* 326:409-422.
- Bogacz R, Larsen T (2011) Integration of reinforcement learning and optimal decision-making theories of the basal ganglia. *Neural computation* 23:817-851.
- Bogen IL, Haug KH, Roberg B, Fonnum F, Walaas SI (2009) The importance of synapsin I and II for neurotransmitter levels and vesicular storage in cholinergic, glutamatergic and GABAergic nerve terminals. *Neurochemistry international* 55:13-21.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4):527-542.
- Bosch C, Mailly P, Degos B, Deniau JM, Venance L (2012) Preservation of the hyperdirect pathway of basal ganglia in a rodent brain slice. *Neuroscience*.
- Brecht M, Schneider M, Sakmann B, Margrie TW (2004) Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature* 427:704-710.
- Brenowitz S, Trussell LO (2001) Minimizing synaptic depression by control of release probability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:1857-1867.
- Brown LL, Schneider JS, Lidsky TI (1997) Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Current opinion in neurobiology* 7:157-163.
- Brunenberg EJ, Moeskops P, Backes WH, Pollo C, Cammoun L, Vilanova A, Janssen ML, Visser-Vandewalle VE, ter Haar Romeny BM, Thiran JP, Platel B (2012) Structural and resting state functional connectivity of the subthalamic nucleus: identification of motor STN parts and the hyperdirect pathway. *PLoS one* 7:e39061.
- Burguiere E, Monteiro P, Feng G, Graybiel AM (2013) Optogenetic stimulation of lateral orbitofronto-striatal pathway suppresses compulsive behaviors. *Science* 340:1243-1246.
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189-198.
- Calabresi P, Maj R, Mercuri NB, Bernardi G (1992) Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neuroscience letters* 142:95-99.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 30:211-219.
- Carandini M, Heeger DJ, Senn W (2002) A synaptic explanation of suppression in visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:10053-10065.
- Catterall WA, Few AP (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59:882-901.
- Cavanagh JF, Wiecki TV, Cohen MX, Figueroa CM, Samanta J, Sherman SJ, Frank MJ (2011) Subthalamic nucleus stimulation reverses mediofrontal influence over decision threshold. *Nature neuroscience* 14:1462-1467.
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993) Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:9576-9580.

- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH, Levine MS (1998) Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *Journal of neurophysiology* 79:82-94.
- Chance FS, Nelson SB, Abbott LF (1998) Synaptic depression and the temporal response characteristics of V1 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:4785-4799.
- Chao SZ, Lu W, Lee HK, Haganir RL, Wolf ME (2002) D(1) dopamine receptor stimulation increases GluR1 phosphorylation in postnatal nucleus accumbens cultures. *Journal of neurochemistry* 81:984-992.
- Chatha BT, Bernard V, Streit P, Bolam JP (2000) Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience* 101:1037-1051.
- Chen G, Greengard P, Yan Z (2004) Potentiation of NMDA receptor currents by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:2596-2600.
- Chetrit J, Taupignon A, Froux L, Morin S, Bouali-Benazzouz R, Naudet F, Kadiri N, Gross CE, Bioulac B, Benazzouz A (2013) Inhibiting subthalamic D5 receptor constitutive activity alleviates abnormal electrical activity and reverses motor impairment in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:14840-14849.
- Chevalier G, Deniau JM (1990) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends in neurosciences* 13:277-280.
- Choquet D, Triller A (2013) The dynamic synapse. *Neuron* 80:691-703.
- Chudasama Y, Baunez C, Robbins TW (2003) Functional disconnection of the medial prefrontal cortex and subthalamic nucleus in attentional performance: evidence for corticosubthalamic interaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:5477-5485.
- Ciliax BJ, Drash GW, Staley JK, Haber S, Mobley CJ, Miller GW, Mufson EJ, Mash DC, Levey AI (1999) Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. *The Journal of comparative neurology* 409:38-56.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Clarke NP, Bolam JP (1998) Distribution of glutamate receptor subunits at neurochemically characterized synapses in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus of the rat. *The Journal of comparative neurology* 397:403-420.
- Cook DL, Schwindt PC, Grande LA, Spain WJ (2003) Synaptic depression in the localization of sound. *Nature* 421:66-70.
- Coull JT, Vidal F, Nazarian B, Macar F (2004) Functional anatomy of the attentional modulation of time estimation. *Science* 303:1506-1508.
- Coulter CL, Kevin Happe H, Bergman DA, Charles Murrin L (1995) Localization and quantification of the dopamine transporter: comparison of [3H]WIN 35,428 and [125I]RTI-55. *Brain research* 690:217-224.
- Cragg SJ, Baufreton J, Xue Y, Bolam JP, Bevan MD (2004) Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. *The European journal of neuroscience* 20:1788-1802.
- Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494:238-242.

- Cummings JA, Mulkey RM, Nicoll RA, Malenka RC (1996) Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16:825-833.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 122 (Pt 8):1437-1448.
- Degos B, Deniau JM, Chavez M, Maurice N (2013) Subthalamic nucleus high-frequency stimulation restores altered electrophysiological properties of cortical neurons in parkinsonian rat. *PloS one* 8:e83608.
- Degos B, Deniau JM, Le Cam J, Mailly P, Maurice N (2008) Evidence for a direct subthalamo-cortical loop circuit in the rat. *The European journal of neuroscience* 27:2599-2610.
- Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nature methods* 8:26-29.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* 13:281-285.
- Demchyshyn LL, McConkey F, Niznik HB (2000) Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *The Journal of biological chemistry* 275:23446-23455.
- Di Filippo M, Picconi B, Tantucci M, Ghiglieri V, Bagetta V, Sgobio C, Tozzi A, Parnetti L, Calabresi P (2009) Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. *Behavioural brain research* 199:108-118.
- Diester I, Kaufman MT, Mogri M, Pashaie R, Goo W, Yizhar O, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Shenoy KV (2011) An optogenetic toolbox designed for primates. *Nature neuroscience* 14:387-397.
- Ding J, Peterson JD, Surmeier DJ (2008) Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:6483-6492.
- Ding S, Zhou FM (2014) Serotonin regulation of subthalamic neurons. *Reviews in the neurosciences*.
- Do MT, Bean BP (2003) Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation. *Neuron* 39:109-120.
- Doig NM, Moss J, Bolam JP (2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:14610-14618.
- Drago J, Gerfen CR, Lachowicz JE, Steiner H, Hollon TR, Love PE, Ooi GT, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP (1994) Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:12564-12568.
- Drouot X, Oshino S, Jarraya B, Besret L, Kishima H, Remy P, Dauguet J, Lefaucheur JP, Dollé F, Condé F, Bottlaender M, Peschanski M, Kéravel Y, Hantraye P, Palfi S (2004) Functional Recovery in a Primate Model of Parkinson's Disease following Motor Cortex Stimulation. *Neuron* 44:769-778.
- Elsworth JD, Roth RH (1997) Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson's Disease. *Experimental neurology* 144:4-9.
- Farries MA, Kita H, Wilson CJ (2010) Dynamic spike threshold and zero membrane slope conductance shape the response of subthalamic neurons to cortical input. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:13180-13191.
- Feger J, Bevan M, Crossman AR (1994) The projections from the parafascicular thalamic nucleus to the subthalamic nucleus and the striatum arise from separate neuronal

- populations: a comparison with the corticostriatal and corticosubthalamic efferents in a retrograde fluorescent double-labelling study. *Neuroscience* 60:125-132.
- Felmy F, Neher E, Schneggenburger R (2003) Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron* 37:801-811.
- Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K (2011) The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience* 34:389-412.
- Ferrier D (1876) *The Functions of the Brain*: G.P. Putnam's Sons.
- Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology* 21:269-274.
- Flores-Hernandez J, Galarraga E, Bargas J (1997) Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25:185-195.
- Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, Levine MS (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of neurophysiology* 88:3010-3020.
- Flores G, Hernandez S, Rosales MG, Sierra A, Martinez-Fong D, Flores-Hernandez J, Aceves J (1996) M3 muscarinic receptors mediate cholinergic excitation of the spontaneous activity of subthalamic neurons in the rat. *Neuroscience letters* 203:203-206.
- Flores G, Liang JJ, Sierra A, Martinez-Fong D, Quirion R, Aceves J, Srivastava LK (1999) Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience* 91:549-556.
- Forstmann BU, Keuken MC, Jahfari S, Bazin PL, Neumann J, Schafer A, Anwender A, Turner R (2012) Cortico-subthalamic white matter tract strength predicts interindividual efficacy in stopping a motor response. *NeuroImage* 60:370-375.
- Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Cuttle MF, Takahashi T (1998) Inactivation of Presynaptic Calcium Current Contributes to Synaptic Depression at a Fast Central Synapse. *Neuron* 20:797-807.
- Frank MJ, Samanta J, Moustafa AA, Sherman SJ (2007) Hold your horses: impulsivity, deep brain stimulation, and medication in parkinsonism. *Science* 318:1309-1312.
- Freeman TC, Durand S, Kiper DC, Carandini M (2002) Suppression without inhibition in visual cortex. *Neuron* 35:759-771.
- Friedman E, Jin LQ, Cai GP, Hollon TR, Drago J, Sibley DR, Wang HY (1997) D1-like dopaminergic activation of phosphoinositide hydrolysis is independent of D1A dopamine receptors: evidence from D1A knockout mice. *Molecular pharmacology* 51:6-11.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature neuroscience* 12:897-904.
- Fujimoto K, Kita H (1993) Response characteristics of subthalamic neurons to the stimulation of the sensorimotor cortex in the rat. *Brain research* 609:185-192.
- Galvan A, Wichmann T (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 119:1459-1474.
- Galvan A, Kuwajima M, Smith Y (2006) Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience* 143:351-375.

- Galvan A, Hu X, Rommelfanger KS, Pare JF, Khan ZU, Smith Y, Wichmann T (2014) Localization and function of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of normal and parkinsonian monkeys. *Journal of neurophysiology* 112:467-479.
- Gazewood JD, Richards DR, Clebak K (2013) Parkinson disease: an update. *American family physician* 87:267-273.
- Georgopoulos AP, DeLong MR, Crutcher MD (1983) Relations between parameters of step-tracking movements and single cell discharge in the globus pallidus and subthalamic nucleus of the behaving monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3:1586-1598.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience* 34:441-466.
- Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:5042-5054.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gotz T, Kraushaar U, Geiger J, Lubke J, Berger T, Jonas P (1997) Functional properties of AMPA and NMDA receptors expressed in identified types of basal ganglia neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:204-215.
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324:354-359.
- Graybiel AM (1998) The Basal Ganglia and Chunking of Action Repertoires. *Neurobiology of learning and memory* 70:119-136.
- Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annual review of neuroscience* 31:359-387.
- Greengard P (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294:1024-1030.
- Groutsi F, Mason MRJ, Anderson PN, Martins S, Anesti M, Coffin RS, Campbell G (2008) Retrograde viral transduction of cortical pyramidal neurons from the spinal cord. *Restorative Neurology and Neuroscience* 26:509-520.
- Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *Journal of chemical neuroanatomy* 26:317-330.
- Haber SN, Fudge JL (1997) The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Critical reviews in neurobiology* 11:323-342.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2369-2382.
- Hallett PJ, Spoelgen R, Hyman BT, Standaert DG, Dunah AW (2006) Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:4690-4700.
- Hallworth NE, Wilson CJ, Bevan MD (2003) Apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium channels, through their selective coupling to voltage-gated calcium channels, are critical determinants of the precision, pace, and pattern of action potential generation in rat subthalamic nucleus neurons in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7525-7542.

- Hamani C, Saint-Cyr JA, Fraser J, Kaplitt M, Lozano AM (2004) The subthalamic nucleus in the context of movement disorders. *Brain : a journal of neurology* 127:4-20.
- Hardman CD, Henderson JM, Finkelstein DI, Horne MK, Paxinos G, Halliday GM (2002) Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei. *The Journal of comparative neurology* 445:238-255.
- Hassani OK, Francois C, Yelnik J, Feger J (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain research* 749:88-94.
- Hausser M, Stuart G, Racca C, Sakmann B (1995) Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 15:637-647.
- Haynes WI, Haber SN (2013) The organization of prefrontal-subthalamic inputs in primates provides an anatomical substrate for both functional specificity and integration: implications for Basal Ganglia models and deep brain stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:4804-4814.
- Hernandez-Echeagaray E, Starling AJ, Cepeda C, Levine MS (2004) Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary? *The European journal of neuroscience* 19:2455-2463.
- Higley MJ, Sabatini BL (2010) Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nature neuroscience* 13:958-966.
- Hollerman JR, Grace AA (1992) Subthalamic nucleus cell firing in the 6-OHDA-treated rat: basal activity and response to haloperidol. *Brain research* 590:291-299.
- Holmes A, Hollon TR, Gleason TC, Liu Z, Dreiling J, Sibley DR, Crawley JN (2001) Behavioral characterization of dopamine D5 receptor null mutant mice. *Behavioral neuroscience* 115:1129-1144.
- Isoda M, Hikosaka O (2008) Role for subthalamic nucleus neurons in switching from automatic to controlled eye movement. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:7209-7218.
- Jackman SL, Beneduce BM, Drew IR, Regehr WG (2014) Achieving high-frequency optical control of synaptic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:7704-7714.
- Jackson A, Crossman AR (1981) Subthalamic projection to nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat. *Neuroscience letters* 22:17-22.
- Jahfari S, Waldorp L, van den Wildenberg WP, Scholte HS, Ridderinkhof KR, Forstmann BU (2011) Effective connectivity reveals important roles for both the hyperdirect (fronto-subthalamic) and the indirect (fronto-striatal-pallidal) fronto-basal ganglia pathways during response inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:6891-6899.
- Joel D, Weiner I (1997) The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. *Brain Research Reviews* 23:62-78.
- Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V, Graybiel AM (1999) Building neural representations of habits. *Science* 286:1745-1749.
- Kamiyama T, Yoshioka N, Sakurai M (2006) Synapse elimination in the corticospinal projection during the early postnatal period. *Journal of neurophysiology* 95:2304-2313.
- Kandel ERS, J.H.; Jessell, T.M. (1991) *Principles of neuroscience*, 3rd Edition.
- Kato S, Inoue K, Kobayashi K, Yasoshima Y, Miyachi S, Inoue S, Hanawa H, Shimada T, Takada M (2007) Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate

- brains using a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein. *Human gene therapy* 18:1141-1151.
- Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M (2011) A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. *Human gene therapy* 22:197-206.
- Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews Neuroscience* 8:844-858.
- Kiritani T, Wickersham IR, Seung HS, Shepherd GM (2012) Hierarchical connectivity and connection-specific dynamics in the corticospinal-corticostriatal microcircuit in mouse motor cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:4992-5001.
- Kita H, Kitai ST (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *The Journal of comparative neurology* 260:435-452.
- Kita H, Chang HT, Kitai ST (1983) The morphology of intracellularly labeled rat subthalamic neurons: a light microscopic analysis. *The Journal of comparative neurology* 215:245-257.
- Kita T, Kita H (2012) The subthalamic nucleus is one of multiple innervation sites for long-range corticofugal axons: a single-axon tracing study in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:5990-5999.
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR (1996) A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 273:1399-1402.
- Kolomiets BP, Deniau JM, Mailly P, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM (2001) Segregation and convergence of information flow through the cortico-subthalamic pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:5764-5772.
- Korf J, Zielesman M, Westerink BH (1976) Dopamine release in substantia nigra? *Nature* 260:257-258.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622-626.
- Kuba H, Koyano K, Ohmori H (2002) Synaptic depression improves coincidence detection in the nucleus laminaris in brainstem slices of the chick embryo. *The European journal of neuroscience* 15:984-990.
- Kuwajima M, Hall RA, Aiba A, Smith Y (2004) Subcellular and subsynaptic localization of group I metabotropic glutamate receptors in the monkey subthalamic nucleus. *The Journal of comparative neurology* 474:589-602.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine* 339:1044-1053.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111:219-230.
- Levine MS, Li Z, Cepeda C, Cromwell HC, Altemus KL (1996) Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse* 24:65-78.
- Li Q, Ke Y, Chan DC, Qian ZM, Yung KK, Ko H, Arbuthnott GW, Yung WH (2012) Therapeutic deep brain stimulation in Parkinsonian rats directly influences motor cortex. *Neuron* 76:1030-1041.

- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England journal of medicine* 339:1105-1111.
- Lisman JE, Harris KM (1993) Quantal analysis and synaptic anatomy — integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends in neurosciences* 16:141-147.
- Loucif AJ, Woodhall GL, Sehirli US, Stanford IM (2008) Depolarisation and suppression of burst firing activity in the mouse subthalamic nucleus by dopamine D1/D5 receptor activation of a cyclic-nucleotide gated non-specific cation conductance. *Neuropharmacology* 55:94-105.
- Magill PJ, Sharott A, Bevan MD, Brown P, Bolam JP (2004) Synchronous unit activity and local field potentials evoked in the subthalamic nucleus by cortical stimulation. *Journal of neurophysiology* 92:700-714.
- Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in neurosciences* 16:521-527.
- Mallet L, Schupbach M, N'Diaye K, Remy P, Bardin E, Czernecki V, Welter ML, Pelissolo A, Ruberg M, Agid Y, Yelnik J (2007) Stimulation of subterritories of the subthalamic nucleus reveals its role in the integration of the emotional and motor aspects of behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:10661-10666.
- Mallet L et al. (2008) Subthalamic Nucleus Stimulation in Severe Obsessive–Compulsive Disorder. *New England Journal of Medicine* 359:2121-2134.
- Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:3875-3884.
- Man HY (2011) GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors--inducers of plasticity? *Current opinion in neurobiology* 21:291-298.
- Martin DM, Skidmore JM, Fox SE, Gage PJ, Camper SA (2002) Pitx2 Distinguishes Subtypes of Terminally Differentiated Neurons in the Developing Mouse Neuroepithelium. *Developmental biology* 252:84-99.
- Martin DM, Skidmore JM, Philips ST, Vieira C, Gage PJ, Condie BG, Raphael Y, Martinez S, Camper SA (2004) PITX2 is required for normal development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain. *Developmental biology* 267:93-108.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience* 23:649-711.
- Martinez-Gonzalez C, Bolam JP, Mena-Segovia J (2011) Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. *Frontiers in neuroanatomy* 5:22.
- Mathai A, Smith Y (2011) The corticostriatal and corticosubthalamic pathways: two entries, one target. So what? *Frontiers in systems neuroscience* 5:64.
- Matsumura M, Kojima J, Gardiner TW, Hikosaka O (1992) Visual and oculomotor functions of monkey subthalamic nucleus. *Journal of neurophysiology* 67:1615-1632.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- Matveev V, Zucker RS, Sherman A (2004) Facilitation through Buffer Saturation: Constraints on Endogenous Buffering Properties. *Biophysical journal* 86:2691-2709.
- Maurice N, Deniau JM, Glowinski J, Thierry AM (1998) Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the corticosubthalamic circuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:9539-9546.

- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- Meck WH, Penney TB, Pouthas V (2008) Cortico-striatal representation of time in animals and humans. *Current opinion in neurobiology* 18:145-152.
- Meissner WG, Frasier M, Gasser T, Goetz CG, Lozano A, Piccini P, Obeso JA, Rascol O, Schapira A, Voon V, Weiner DM, Tison F, Bezard E (2011) Priorities in Parkinson's disease research. *Nature reviews Drug discovery* 10:377-393.
- Migueluez C, Morera-Herreras T, Torrecilla M, Ruiz-Ortega JA, Ugedo L (2014) Interaction between the 5-HT system and the basal ganglia: functional implication and therapeutic perspective in Parkinson's disease. *Frontiers in neural circuits* 8:21.
- Migueluez C, Morin S, Martinez A, Goillandeau M, Bezard E, Bioulac B, Baufreton J (2012) Altered pallido-pallidal synaptic transmission leads to aberrant firing of globus pallidus neurons in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of physiology* 590:5861-5875.
- Mink JW (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Progress in neurobiology* 50:381-425.
- Mink JW (2003) The basal ganglia and involuntary movements: Impaired inhibition of competing motor patterns. *Archives of neurology* 60:1365-1368.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 78:189-225.
- Mochida S, Few AP, Scheuer T, Catterall WA (2008) Regulation of presynaptic $Ca(V)_{2.1}$ channels by Ca^{2+} sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. *Neuron* 57:210-216.
- Mouroux M, Feger J (1993) Evidence that the parafascicular projection to the subthalamic nucleus is glutamatergic. *Neuroreport* 4:613-615.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13940-13945.
- Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional Activity-Dependent Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons. *Neuron* 44:759-767.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neuroscience research* 43:111-117.
- Nambu A, Tokuno H, Hamada I, Kita H, Imanishi M, Akazawa T, Ikeuchi Y, Hasegawa N (2000) Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *Journal of neurophysiology* 84:289-300.
- Neher E (1998) Vesicle Pools and Ca^{2+} Microdomains: New Tools for Understanding Their Roles in Neurotransmitter Release. *Neuron* 20:389-399.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron* 59:861-872.
- Nelson AB, Kreitzer AC (2014) Reassessing models of Basal Ganglia function and dysfunction. *Annual review of neuroscience* 37:117-135.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *Journal of receptor and signal transduction research* 24:165-205.
- Nicola SM, Kombian SB, Malenka RC (1996) Psychostimulants depress excitatory synaptic transmission in the nucleus accumbens via presynaptic D1-like dopamine receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:1591-1604.

- Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM (1996) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:436-447.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW (2000) The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology* 55:S13-20; discussion S21-13.
- Oorschot DE (1996) Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *The Journal of comparative neurology* 366:580-599.
- Otmakhova NA, Lisman JE (1999) Dopamine selectively inhibits the direct cortical pathway to the CA1 hippocampal region. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:1437-1445.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual review of neuroscience* 25:563-593.
- Parent A (1990) Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends in neurosciences* 13:254-258.
- Parent A, Hazrati L-N (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Research Reviews* 20:128-154.
- Parent M, Parent A (2006) Single-axon tracing study of corticostriatal projections arising from primary motor cortex in primates. *The Journal of comparative neurology* 496:202-213.
- Parent M, Wallman MJ, Descarries L (2010) Distribution and ultrastructural features of the serotonin innervation in rat and squirrel monkey subthalamic nucleus. *The European journal of neuroscience* 31:1233-1242.
- Pastrana E (2010) Optogenetics: controlling cell function with light. *Nature methods* 8:24-25.
- Paz JT, Deniau JM, Charpier S (2005) Rhythmic bursting in the cortico-subthalamo-pallidal network during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:2092-2101.
- Perrais D, Ropert N (1999) Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABAA receptors in central synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:578-588.
- Petralia RS, Wenthold RJ (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 318:329-354.
- Pifl C, Bertel O, Schingnitz G, Hornykiewicz O (1990) Extrastriatal dopamine in symptomatic and asymptomatic rhesus monkeys treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurochemistry international* 17:263-270.
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2012) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature reviews Neuroscience* 13:22-37.

- Prat CS, Keller TA, Just MA (2007) Individual differences in sentence comprehension: a functional magnetic resonance imaging investigation of syntactic and lexical processing demands. *Journal of cognitive neuroscience* 19:1950-1963.
- Price CJ, Kim P, Raymond LA (1999) D1 dopamine receptor-induced cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation and potentiation of striatal glutamate receptors. *Journal of neurochemistry* 73:2441-2446.
- Quintana A, Melon C, Goff LK-L, Salin P, Savasta M, Sgambato-Faure V (2010) Forelimb dyskinesia mediated by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus is linked to rapid activation of the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors. *European Journal of Neuroscience* 32:423-434.
- Ramanathan S, Tkatch T, Atherton JF, Wilson CJ, Bevan MD (2008) D2-like dopamine receptors modulate SKCa channel function in subthalamic nucleus neurons through inhibition of Cav2.2 channels. *Journal of neurophysiology* 99:442-459.
- Rao VR, Finkbeiner S (2007) NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends in neurosciences* 30:284-291.
- Ravizza SM, Ivry RB (2001) Comparison of the basal ganglia and cerebellum in shifting attention. *Journal of cognitive neuroscience* 13:285-297.
- Redgrave P, Vautrelle N, Reynolds JN (2011) Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: selection and reinforcement. *Neuroscience* 198:138-151.
- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, DeLong MR, Obeso JA (2010) Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nature reviews Neuroscience* 11:760-772.
- Reiner A, Medina L, Veenman CL (1998) Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Research Reviews* 28:235-285.
- Rommelfanger KS, Wichmann T (2010) Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy* 4:139.
- Ryan LJ, Clark KB (1992) Alteration of neuronal responses in the subthalamic nucleus following globus pallidus and neostriatal lesions in rats. *Brain research bulletin* 29:319-327.
- Sadikot AF, Parent A, Francois C (1992) Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: a PHA-L study of subcortical projections. *The Journal of comparative neurology* 315:137-159.
- Saiki A, Kimura R, Samura T, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y (2014) Different modulation of common motor information in rat primary and secondary motor cortices. *PloS one* 9:e98662.
- Sato F, Parent M, Levesque M, Parent A (2000) Axonal branching pattern of neurons of the subthalamic nucleus in primates. *The Journal of comparative neurology* 424:142-152.
- Sato K, Kiyama H, Tohyama M (1993) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. *Neuroscience* 52:515-539.
- Schmidt R, Leventhal DK, Mallet N, Chen F, Berke JD (2013) Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nature neuroscience* 16:1118-1124.
- Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research* 318:215-224.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of neurophysiology* 80:1-27.
- Scott L, Zelenin S, Malmersjo S, Kowalewski JM, Markus EZ, Nairn AC, Greengard P, Brismar H, Aperia A (2006) Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible

- dopamine 1 receptors in spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:762-767.
- Shen K-Z, Zhu Z-T, Munhall A, Johnson SW (2003) Synaptic plasticity in rat subthalamic nucleus induced by high-frequency stimulation. *Synapse* 50:314-319.
- Shen KZ, Johnson SW (2000) Presynaptic dopamine D2 and muscarine M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *The Journal of physiology* 525 Pt 2:331-341.
- Shen KZ, Johnson SW (2008) 5-HT inhibits synaptic transmission in rat subthalamic nucleus neurons in vitro. *Neuroscience* 151:1029-1033.
- Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ (2008) Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321:848-851.
- Sheng M, Lin JW (2001) Glutamatergic Synapses: Molecular Organization. In: eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Smidt MP, Cox JJ, van Schaick HS, Coolen M, Schepers J, van der Kleij AM, Burbach JP (2000) Analysis of three Ptx2 splice variants on transcriptional activity and differential expression pattern in the brain. *Journal of neurochemistry* 75:1818-1825.
- Smith Y, Kieval JZ (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in neurosciences* 23:S28-33.
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 23 Suppl 3:S534-547.
- Smith Y, Bolam JP, Von Krosigk M (1990a) Topographical and Synaptic Organization of the GABA-Containing Pallidosubthalamic Projection in the Rat. *The European journal of neuroscience* 2:500-511.
- Smith Y, Hazrati LN, Parent A (1990b) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method. *The Journal of comparative neurology* 294:306-323.
- Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends in neurosciences* 27:520-527.
- Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR (2012) Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37:213-246.
- Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P (1998) A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:10297-10303.
- Snyder GL, Allen PB, Fienberg AA, Valle CG, Haganir RL, Nairn AC, Greengard P (2000) Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor in the neostriatum by dopamine and psychostimulants in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:4480-4488.
- So CH, Verma V, Alijaniam M, Cheng R, Rashid AJ, O'Dowd BF, George SR (2009) Calcium signaling by dopamine D5 receptor and D5-D2 receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that for dopamine D1-D2 receptor hetero-oligomers. *Molecular pharmacology* 75:843-854.
- Song WJ, Baba Y, Otsuka T, Murakami F (2000) Characterization of Ca(2+) channels in rat subthalamic nucleus neurons. *Journal of neurophysiology* 84:2630-2637.

- Standaert DG, Testa CM, Young AB, Penney JB, Jr. (1994) Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *The Journal of comparative neurology* 343:1-16.
- Standaert DG, Friberg IK, Landwehrmeyer GB, Young AB, Penney JB, Jr. (1999) Expression of NMDA glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the striatum of the rat. *Brain research Molecular brain research* 64:11-23.
- Stephenson-Jones M, Ericsson J, Robertson B, Grillner S (2012) Evolution of the basal ganglia: dual-output pathways conserved throughout vertebrate phylogeny. *The Journal of comparative neurology* 520:2957-2973.
- Surmeier DJ (2013) Neuroscience: To go or not to go. *Nature* 494:178-179.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:6579-6591.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in neurosciences* 30:228-235.
- Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell* 127:49-58.
- Svenningsson P, Le Moine C (2002) Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *The European journal of neuroscience* 15:133-142.
- Takeuchi T, Duzsikiewicz AJ, Morris RG (2014) The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369:20130288.
- Teicher MH, Anderson CM, Polcari A, Glod CA, Maas LC, Renshaw PF (2000) Functional deficits in basal ganglia of children with attention-deficit/hyperactivity disorder shown with functional magnetic resonance imaging relaxometry. *Nature medicine* 6:470-473.
- Teichmann M, Dupoux E, Kouider S, Bachoud-Levi AC (2006) The role of the striatum in processing language rules: evidence from word perception in Huntington's disease. *Journal of cognitive neuroscience* 18:1555-1569.
- Temel Y, Visser-Vandewalle V (2004) Surgery in Tourette syndrome. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19:3-14.
- Tiberi M, Caron MG (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *The Journal of biological chemistry* 269:27925-27931.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:7491-7495.
- Tison F, Dartigues JF, Dubes L, Zuber M, Alperovitch A, Henry P (1994) Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: a population study in Gironde, France. *Acta neurologica Scandinavica* 90:111-115.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.

- Ullman MT, Corkin S, Coppola M, Hickok G, Growdon JH, Koroshetz WJ, Pinker S (1997) A Neural Dissociation within Language: Evidence that the Mental Dictionary Is Part of Declarative Memory, and that Grammatical Rules Are Processed by the Procedural System. *Journal of cognitive neuroscience* 9:266-276.
- Varela JA, Hirsch SJ, Chapman D, Leverich LS, Greene RW (2009) D1/D5 modulation of synaptic NMDA receptor currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:3109-3119.
- Vingerhoets FJ, Villemure JG, Temperli P, Pollo C, Pralong E, Ghika J (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology* 58:396-401.
- von Gersdorff H, Borst JG (2002) Short-term plasticity at the calyx of held. *Nature reviews Neuroscience* 3:53-64.
- Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, Wang D, Zhang F, Boyden E, Deisseroth K, Kasai H, Hall WC, Feng G, Augustine GJ (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8143-8148.
- Wichmann T, Bergman H, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. I. Functional properties in intact animals. *Journal of neurophysiology* 72:494-506.
- Willard SS, Koochekpour S (2013) Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *International journal of biological sciences* 9:948-959.
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2397-2410.
- Wilson CJ, Bevan MD (2011) Intrinsic dynamics and synaptic inputs control the activity patterns of subthalamic nucleus neurons in health and in Parkinson's disease. *Neuroscience* 198:54-68.
- Wilson CL, Puntis M, Lacey MG (2004) Overwhelmingly asynchronous firing of rat subthalamic nucleus neurones in brain slices provides little evidence for intrinsic interconnectivity. *Neuroscience* 123:187-200.
- Xu-Friedman MA, Regehr WG (2004) Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiological reviews* 84:69-85.
- Xu J, Wu LG (2005) The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuron* 46:633-645.
- Yamawaki N, Magill PJ, Woodhall GL, Hall SD, Stanford IM (2012) Frequency selectivity and dopamine-dependence of plasticity at glutamatergic synapses in the subthalamic nucleus. *Neuroscience* 203:1-11.
- Yelnik J, Percheron G (1979) Subthalamic neurons in primates: A quantitative and comparative analysis. *Neuroscience* 4:1717-1743.
- Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature reviews Neuroscience* 7:464-476.
- Yin HH, Lovinger DM (2006) Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8251-8256.
- Yin S, Niswender CM (2014) Progress toward advanced understanding of metabotropic glutamate receptors: structure, signaling and therapeutic indications. *Cellular signalling* 26:2284-2297.

- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 24:1071-1089.
- Zheng P, Zhang XX, Bunney BS, Shi WX (1999) Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. *Neuroscience* 91:527-535.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo M-m (2004) Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. *Neuron* 44:749-757.
- Zhou Y, Wu H, Li S, Chen Q, Cheng XW, Zheng J, Takemori H, Xiong ZQ (2006) Requirement of TORC1 for late-phase long-term potentiation in the hippocampus. *PloS one* 1:e16.
- Zhu ZT, Shen KZ, Johnson SW (2002) Pharmacological identification of inward current evoked by dopamine in rat subthalamic neurons in vitro. *Neuropharmacology* 42:772-781.
- Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annual review of neuroscience* 16:547-563.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology* 64:355-405.

ANNEXES

ANNEXE 1 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

**Inhibiting subthalamic D5 receptorconstitutive activity alleviates
abnormal electrical activity and reverses motor impairment in a rat model
of Parkinson's disease**

*Jonathan Chetrit, Anne Taupignon, Lionel Froux, Stephanie Morin, Rabia Bouali-Benazzouz,
Frédéric Naudet, Nabila Kadiri, Christian E. Gross, Bernard Bioulac, and Abdelhamid
Benazzouz*

The Journal of Neuroscience, September 11, 2013, 33(37):14840–14849

Inhibiting Subthalamic D₅ Receptor Constitutive Activity Alleviates Abnormal Electrical Activity and Reverses Motor Impairment in a Rat Model of Parkinson's Disease

Jonathan Chetrit,^{1,2*} Anne Taupignon,^{1,2*} Lionel Froux,^{1,2} Stephanie Morin,^{1,2} Rabia Bouali-Benazzouz,³ Frédéric Naudet,^{1,2} Nabila Kadiri,^{1,2} Christian E. Gross,^{1,2} Bernard Bioulac,^{1,2} and Abdelhamid Benazzouz^{1,2}

¹Université Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, ²CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, and ³CNRS, Institut Interdisciplinaire des Neurosciences, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

Burst firing has been reported as a pathological activity of subthalamic nucleus (STN) neurons in Parkinson's disease. However, the origin of bursts and their causal link with motor deficits remain unknown. Here we tested the hypothesis that dopamine D₅ receptors (D₅Rs), characterized by a high constitutive activity, may contribute to the emergence of burst firing in STN. We tested whether inhibiting D₅R constitutive activity depresses burst firing and alleviates motor impairments in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. Intrasubthalamic microinjections of either an inverse agonist of D₅Rs, flupenthixol, or a D₂R antagonist, raclopride, were applied. Behavioral experiments, *in vivo* and *in vitro* electrophysiological recordings, and *ex vivo* functional neuroanatomy studies were performed. Using [³S]GTPγ binding autoradiography, we show that application of flupenthixol inhibits D₅R constitutive activity within the STN. Furthermore, flupenthixol reduced evoked burst in brain slices and converted pathological burst firing into physiological tonic, single-spike firing in 6-OHDA rats *in vivo*. This later action was mimicked by calciseptine, a Cav1 channel blocker. Moreover, the same treatment dramatically attenuated motor impairment in this model and normalized metabolic hyperactivity in both STN and substantia nigra pars reticulata, the main output structure of basal ganglia in rats. In contrast, raclopride as well as saline did not reverse burst firing and motor deficits, confirming the selective action of flupenthixol on D₅Rs. These results are the first to demonstrate that subthalamic D₅Rs are involved in the pathophysiology of Parkinson's disease and that administering an inverse agonist of these receptors may lessen motor symptoms.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder characterized by a gradual degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNc), leading to a marked dopamine (DA) depletion in striatum, the primary projection region, as well as extrastriatal nuclei of the basal ganglia (Smith and Villalba, 2008). Component nuclei exhibit changes in discharge frequencies and/or firing patterns, as well as in dynamics of neuronal discharges, such as intrinsic oscillations or interneuronal synchronization (Galvan and Wichmann, 2008). However, it is not known whether these phenomena play a causal role in

parkinsonian motor symptoms. Recent evidence in behaving rodents complements earlier data obtained in DA-depleted anesthetized animals and points to a pathological persistence of a post-decision stabilized state of cortical–basal ganglia networks (Mallet et al., 2008; Cruz et al., 2011; Leventhal et al., 2012). However, the parkinsonian symptoms are alleviated by subthalamic nucleus (STN) ablation (Bergman et al., 1990), high-frequency electrical stimulation (Benazzouz et al., 1993; Limousin et al., 1998), and pharmacological inhibition (Levy et al., 2001; Luo et al., 2002), suggesting that STN has a critical role in the symptoms.

STN holds a pivotal position in basal ganglia circuitry, exerting an excitatory drive on the output structures (Albin et al., 1989; Surmeier and Bevan, 2003). It is now thought to mediate a top-down executive cortical control over all behavioral programs treated by basal ganglia (Cavanagh et al., 2011; Haynes and Haber, 2013). It is well established that dopaminergic afferents from the SNc innervate the STN and that DA modulates the electrical activity of STN neurons through a variety of mechanisms via presynaptic and postsynaptic sites (Ni et al., 2001a,b; Cragg et al., 2004; Baufretton and Bevan, 2008; Rommelfanger and Wichmann, 2010). The changes in STN electrical activity have been examined in experimental models of the disease *in vitro* and *in vivo*, but there is no unifying view of STN activity in PD (Wilson and Bevan, 2011).

Received Jan. 30, 2013; revised July 25, 2013; accepted Aug. 8, 2013.

Author contributions: A.T. and A.B. designed research; J.C., A.T., L.F., S.M., R.B.-B., F.N., and N.K. performed research; J.C., A.T., L.F., S.M., R.B.-B., F.N., N.K., and C.E.G. analyzed data; J.C., A.T., C.E.G., B.B., and A.B. wrote the paper.

This work was supported by grants from the Fondation de France, the University Victor Segalen, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Institut Fédératif de Recherche (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 8; CNRS 13). J.C. and L.F. were supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. We thank L. Cardoit for technical assistance.

* J.C. and A.T. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Abdelhamid Benazzouz, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université Bordeaux Segalen, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5293, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0453-13.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/3314840-10\$15.00/0

Among DA receptors, the D₅ receptors (D₅Rs) display a unique feature *in vitro*: a high agonist-independent constitutive activity (Tiberi and Caron, 1994; Demchyshyn et al., 2000). It has been also demonstrated *in vitro* that D₅Rs potentiate burst firing in STN neurons (Baufreton et al., 2003, 2005). Although the action of receptors in the D₂ family is not expected to be maintained in the DA-depleted state, the distinctive property of D₅R of constitutive activity argues in favor of persistence of a significant part of their burst firing-potentiating action. Abnormal burst firing may interfere with normal information processing within the basal ganglia, thus contributing to PD motor symptoms.

Here we tested the hypothesis that inhibiting the constitutive activity of D₅Rs may depress the burst firing of STN neurons, resulting in an alleviation of motor impairment in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of PD. We investigated the effects of intrasubthalamic microinjection of an inverse agonist of D₅Rs, flupenthixol, on (1) *in vitro* and *in vivo* STN neuronal activity, (2) motor behavior, and (3) *ex vivo* functional neuroanatomy in the rat.

Materials and Methods

Animals

For *in vitro* experiments, P19–P28 Wistar rats of both sexes bred in the university animal facility were used. Adult male Wistar rats weighing 280–380 g were used for behavioral, *in vivo* electrophysiological recordings and *ex vivo* experiments. Animals (Charles River) were housed four per cage under artificial conditions of light (light/dark cycle, light on at 7:00 A.M.), temperature (24°C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All animal experiments were performed in accordance with European Communities Council Directive 2010/63/UE. The study received approval from the local Ethics Committee (Bordeaux, France).

In vitro experiments

Experiments were performed on subthalamic neurons in 350- to 400- μm -thick slices. The animals were anesthetized using isoflurane and decapitated. The brain was removed, and three to four slices containing the STN were prepared in a saturated (95% O₂/5% CO₂) ice-cold solution containing the following (in mM): 250 sucrose, 26 NaHCO₃, 7 MgCl₂, 2 KCl, 1.15 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, and 11 glucose, pH 7.35. They were incubated for at least 1 h at room temperature in a saturated (95% O₂/5% CO₂) solution containing the following (in mM): 124 NaCl, 3.6 KCl, 1.3 MgCl₂, 1.25 HEPES, 2.4 CaCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose. The same solution was also used to continuously perfuse the bath at ~4 ml/min. Pipettes were pulled from Harvard glass capillaries (GC150F10; Phymep). They contained 100 mM K-gluconate, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 2 mM ATP-Mg, and 0.4 mM GTP-2Na at a pH of 7.25 and osmolarity of 290 mOsm and had a resistance of 10–14 M Ω . Signals were recorded using an Axopatch 1-D amplifier (Molecular Devices). They were digitized and stored using a Digidata 1322A and the pClamp suite version 9.2 (Molecular Devices), respectively. Both the blind and the visualized patch method were used on coronal and sagittal slices. The experiments on the 6-OHDA-treated animals and their control counterparts used sagittal slices and were entirely performed with the visualized patch-clamp method on a Carl Zeiss AxioExaminer Z1 upright microscope. All parameters (temperature, perfusion rate, composition of intrapipette and perfusion solutions, pipette resistance) were kept unchanged in the blind and visualized experiments. We observed that using pipettes with a resistance <10 M Ω , a usual condition in the visualized patch method, often led to rundown of burst competency, i.e., reduction or even disappearance of plateau potentials and rebound bursts in ~30 min. The voltage-clamp mode was first used, and a -5 mV step was applied five times at -65 mV. Input and access resistance as well as cell capacity were measured from the average current offline. The current-clamp mode was used for the remaining part of the experiment. After recording a 20 s period of spontaneous electrical activity at I₀, neurons were maintained at -65 mV by current injection, and perfusion was supplemented by antagonists of fast synaptic transmission (5–10 μM SR-95531

[2-(3-carboxypropyl)-3-amino-6-(4-methoxyphenyl)pyridazinium bromide] [GABazine], 40 μM D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, 5 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, and 5 μM S(-)-raclopride (+) tartrate). Five hundred millisecond increasingly negative and 80 ms increasingly positive steps were successively injected to test for the presence of postinhibitory rebound bursts and plateau potentials, respectively. Plateau potentials are bursts evoked at negative potentials, with regenerative responses that outlast the stimulus. Neurons displaying a significant plateau potential (i.e., a depolarization sustained after the stimulation step termination allowing the discharge of at least 10 action potentials accounted for approximately half neurons and were found in all areas within STN). They were further challenged with 1–2 μM flupenthixol, fluphenazine, or butaclamol using depolarizing steps of 80–140 pA applied at 20 s intervals. Studies on recombinant human D₅Rs have shown that doses of 1–5 μM efficiently decreased basal adenylate cyclase activity or AMPc accumulation in heterologous cell lines (Martin et al. 2001; D'Aoust and Tiberi, 2010). All the drugs, including *cis*-(z)flupenthixol di-hydrochloride, fluphenazine dihydrochloride salt, and (+)-butaclamol hydrochloride, were purchased from Sigma, prepared as stock solution, and kept at -20°C. Stock solutions of flupenthixol were not kept longer than 1 month. Bursts were evoked every 20–30 s, and their typical features (duration, number of action potentials, and discharge frequency) were measured offline throughout the recordings (usually lasting 15–20 min), using pClamp software. The control values were then calculated from the average of the five evoked bursts preceding drug application, whereas the test values were the mean of the five consecutive bursts showing the maximum change.

Ex vivo experiments

[³⁵S]GTP γ binding autoradiography. Agonist or antagonist receptor-stimulated [³⁵S]GTP γ binding in the STN was measured by autoradiography, as described previously (Laffray et al., 2012). *Ex vivo* STN-containing brain coronal slices were incubated in [³⁵S]GTP γ (0.04 nM) at 25°C for 30 min, in the absence (basal conditions) or presence of the drugs [D₅ agonist SKF 38393 (2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1H-3-benzazepine HCl), D₅ antagonist SCH 23390 (R(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride), or D₅ inverse agonist flupenthixol] at six different concentrations. Nonspecific binding was determined in the presence of 10 μM [³⁵S]GTP γ . After exposure to beta-radiation-sensitive film, relative [³⁵S]GTP γ autoradiographic binding was materialized by optical density (OD) values in the STN, measured using the Mercator image analysis system (ExploraNova). ¹⁴C standards were used to ascertain that all values were in a linear domain range. Experiments were designed as follow: three brain slices containing STN per animal, five animals per group (15 measurements for each contralateral and ipsilateral STN). Experiments were performed in triplicate (45 measurements).

Cytochrome oxidase histochemistry. The cytochrome oxidase (COx) histochemical reaction was quantified using the metal-enhanced technique, as described previously (Blandini et al., 2007). COx activity was analyzed by densitometry, using the Mercator system, as described previously (Blandini et al., 2007). Digital images of each stained section were obtained, and OD was measured on four consecutive sections throughout the STN and the pars reticulata of substantia nigra (SNr).

In vivo experiments

DA depletion. DA depletion was obtained by injection of 6-OHDA in the medial forebrain bundle of juvenile (17- to 19-d-old) and adult (280–300 g) rats. Seventeen- to 19-d-old rats were treated according to the protocol of Miguez et al. (2012). Briefly, they were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and desipramine (20 mg/kg, i.p.) was administered to avoid damage of the noradrenergic system. Thirty minutes later, 1 μl of 6-OHDA (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ plus 0.1% ascorbic acid) was infused using stereotaxy at a rate of 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ into the right hemisphere in two points. The coordinates (relative to bregma) were as follows: anteroposterior (AP), -2.4 mm; mediolateral (ML), -1.2 mm; and dorsoventral (DV), -7.4 and -7.9 mm. Asymmetry of forelimb use was evaluated using the cylinder test 2 weeks later, and animals showing limb asymmetry were used for *in vitro* recordings during the following week.

Adult rats also received a stereotaxic unilateral injection of 6-OHDA (Sigma) or its saline vehicle into the medial forebrain bundle 3–4 weeks

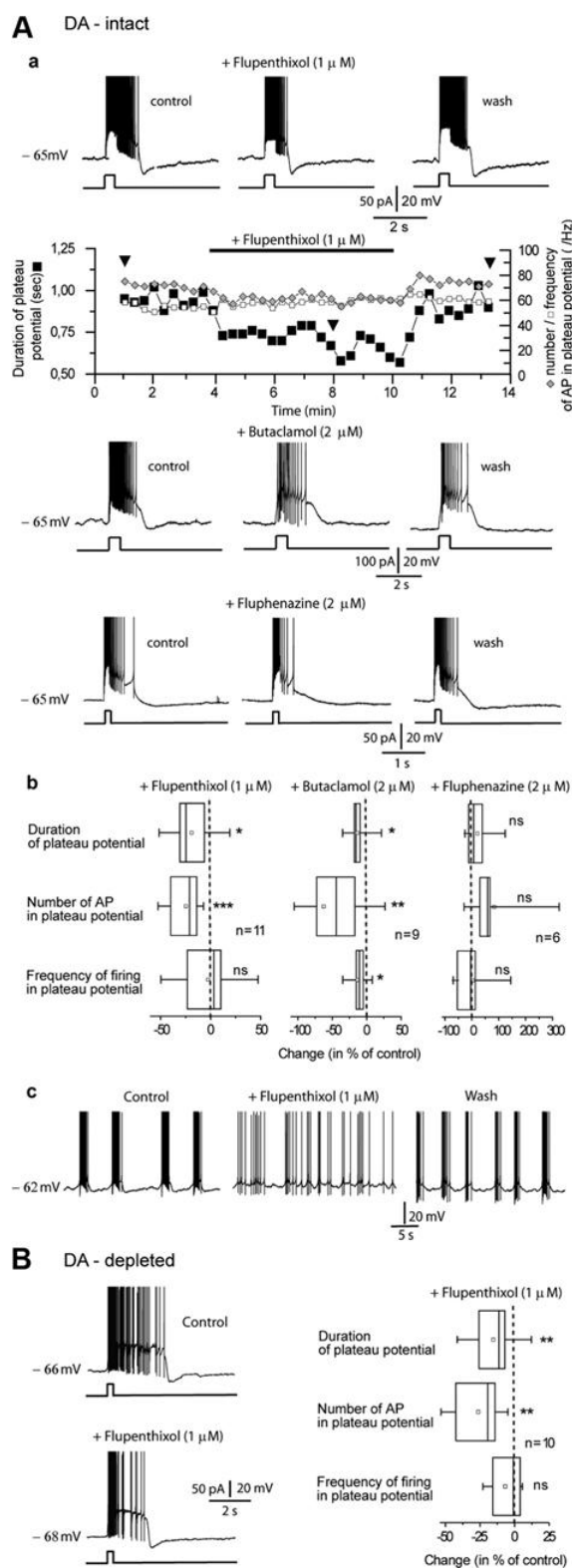


Figure 1. Flupenthixol weakens evoked bursts in burst-competent neurons and minimizes spontaneous burst firing *in vitro*. **Aa**, Representative examples of the action of flupenthixol,

before behavioral testing and electrophysiological recordings, as described previously (Belujon et al., 2007). Briefly, each animal received a unilateral injection of 2.5 μ l of 6-OHDA (Sigma; 5 mg/ml in sterile NaCl, 0.9% with 0.1% ascorbic acid) into the right medial forebrain bundle according to the brain atlas of Paxinos and Watson (1996). The coordinates (relative to bregma) were as follows: AP, -2.8 mm; ML, -2 mm; and DV, -8.4 mm.

The effectiveness of the 6-OHDA lesion in juvenile and adult rats was systematically assessed after all experiments using tyrosine hydroxylase immunoreactivity, as reported previously (Bouali-Benazzouz et al., 2009). To assess the behavioral effects of drug injection into the STN, adult rats were chronically implanted with guide cannula (Phymep). The tip of the guide cannula was lowered to 1 mm above the STN, at coordinates 3.8 mm posterior to bregma, 2.5 mm lateral to the midline, and 7 mm below the skull, according to the Paxinos and Watson brain atlas (Paxinos and Watson, 1996).

In vivo extracellular electrophysiology. Single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.), as reported previously (Belujon et al., 2007; Chetrit et al., 2009). In a preliminary set of experiments, we recorded EEG simultaneously with single-unit activity urethane anesthesia. In these experiments, a stable slow cortical oscillation (~1 Hz) was observed together with the bursty (6-OHDA rats) and tonic (control rats) firing (our unpublished data). A double-barreled pipette assembly, similar to that described previously (Akaoka and Aston-Jones, 1991), was used for STN neuronal activity recordings and simultaneous local microinjection of the drugs. Basal firing of the neurons was recorded for 20 min before drug injection to ascertain the stability of discharge activity, and then a drug or vehicle was injected directly into the STN in a volume of 20 nl of 0.9% NaCl, using brief pulses of pneumatic pressure (Picospritzer III; Parker).

In a set of experiments, we investigated the dose response of flupenthixol on STN neuron burst firing. Three doses (2, 4, and 6 μ g) were tested in 6-OHDA-lesioned rats ($n = 15$). Flupenthixol significantly affected the burst parameters in a dose-dependent manner (Kruskal–Wallis test, burst frequency, $F = 16.39$, $p = 0.0009$; percentage of spikes in burst, $F = 16.39$, $p = 0.001$). In contrast to the dose of 2 μ g, which did not affect the burst firing (Dunn's test, $p > 0.05$ for the two parameters), 4 and 6 μ g turned the pathological burst firing into tonic, single-spike firing by significantly and dramatically decreasing the burst frequency (Dunn's test, $p < 0.01$) and the percentage of spikes in burst (Dunn's test, $p < 0.01$). However, any of the three doses did not induce a change in the firing rate of STN neurons (Kruskal–Wallis test, $F = 0.53$, $p = 0.91$). According to these results, only the dose of 4 μ g has been used for all *in vivo* electrophysiological, behavioral, and metabolic studies.

Because D₂R signaling has been shown to increase burst firing through potentiation of Cav1 channels in the STN *in vitro* (Baufretton et al., 2003), we tested the effect of the Cav1 channel inhibitor calciseptine using the same experimental protocol. It was purchased from Alomone Labs, and a dose of 6 ng in 20 nl of saline was injected. Calciseptine has been chosen for a number of reasons: (1) we showed previously that calciseptine occluded the action of SKF 81297 (6-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-1H-3-benzazepine hydrobromide) *in vitro* and reduced burst competency by virtually inhibiting plateau potentials (Baufretton et al. 2003); and (2) calciseptine is stable at room temperature and is not destroyed by exposition to light, a property that is necessary for using it in *in vivo* experiments.

butaclamol, and fluphenazine on bursts (top traces) evoked by depolarizing stimuli (bottom traces) in DA-intact animals. The time course of the action of flupenthixol on the duration of evoked burst (black squares), the number (gray diamonds), and the frequency (white squares) of action potentials (AP) is shown below the traces. Inverted triangles point to the three examples. **Ab**, Box-plot summary changes in typical features of evoked bursts after application of the three drugs. **Ac**, Flupenthixol turned burst firing into irregular firing in a spontaneously bursting neuron. **B**, Flupenthixol reduced evoked bursts in neurons from DA-depleted animals. Note that the bath contained fast synaptic transmission inhibitors and raclopride, a D₂R inhibitor. Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

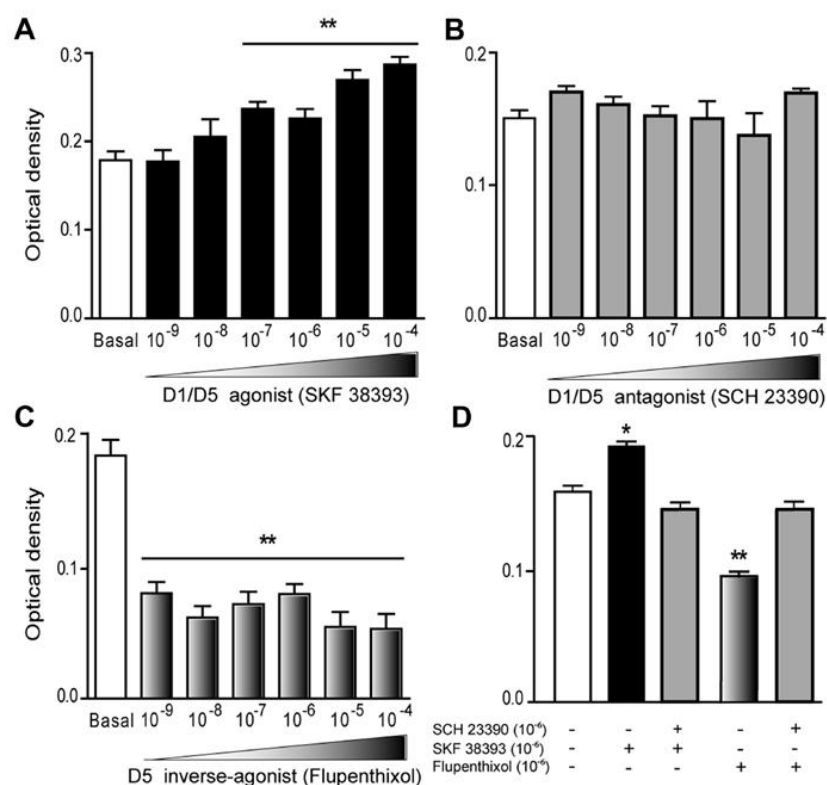


Figure 2. Constitutive activity of D₅Rs in the rat STN blocked by flupenthixol. **A–C**, Histograms showing the dose–response effects of the D₁/D₅ receptor agonist SKF 38393 (**A**) and antagonist SCH 23390 (**B**), as well as the D₅ inverse agonist flupenthixol (**C**) on [³⁵S]GTPγ binding in the STN, assessed by OD. **D**, SCH 23390 blocked the effects of both SKF 38393 and flupenthixol. Data represent mean ± SEM of OD values. One-way ANOVA (**A–C**) and unpaired *t* test (**D**). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, compared with basal OD.

Firing patterns were analyzed using the method developed by Kaneoke and Vitek (1996), as described previously (Tai et al., 2003). An algorithm using MATLAB computer software programming was used. Tonic versus bursty firing was distinguished by analyzing the distribution of the interspike intervals. Tonic firing had a Gaussian distribution, whereas burst firing had a Poisson distribution.

Behavioral assessment. Spontaneous locomotor activity was measured using a photoelectric actimeter (Actitrack; Bioseb), as described previously (Belujon et al., 2007; Chetrit et al., 2009). All testing in the actimeter were done in an isolated room between 8:00 A.M. and 1:00 P.M. and consisted of three phases. (1) Spontaneous locomotor activity was recorded during 4 consecutive days (days 1–4; two times 10 min each) during which rats were habituated to manipulation by the experimenter. The first session of 10 min was considered as the daily habituation. Only the locomotor activity recorded during the second session of 10 min was used for data analysis. (2) Local injection of flupenthixol or raclopride (Sigma) directly into the STN was applied on the fifth day, just before the measurement of locomotor activity. (3) A post-challenge test of spontaneous locomotor activity was performed: 1 day after flupenthixol injection, rats were again reexposed to the actimeter.

The stepping test was used to monitor lesion-induced changes in forelimb akinesia in the rat that may be analogous to akinesia seen in PD (Olsson et al., 1995). The number of adjusting steps was measured on a smooth-surfaced table. The rat was held by the experimenter with one hand softly blocking the hindlimbs and with the other hand fixing the forelimb not to be monitored. In this way, the other forepaw had to bear the body weight. The rat was moved slowly sideways in both right and left directions by the experimenter with a speed of 0.9 m/5 s (Abedi et al., 2013). This was done for both the contralateral and ipsilateral forepaws. When the rat was moved along the table, the free forelimb had to step with the movement of the experimenter to keep balance. The number of

adjusting steps for both directions and both paws was video recorded and counted. Values represent the number of adjusting steps.

Statistical analyses

Data are mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad Software). The Mann–Whitney and Wilcoxon's matched-pairs signed-ranks tests were used to compare behavioral and patch-clamp data from different groups and the same animals before and after drug injection, respectively. The unpaired *t* test was used for COx histochemistry and [³⁵S]GTPγ data. For *in vivo* electrophysiological analysis, firing rates and burst parameters before and after drug injection were compared using the Mann–Whitney test, and the distribution of the firing pattern was assessed using a χ^2 test.

Results

D₅R inverse agonists weaken STN burst firing *in vitro*

Application of flupenthixol and butaclamol, but not fluphenazine, to STN neurons in rat brain slices, at concentrations used on recombinant D₅Rs (1–2 μ M), significantly modified the specific features of evoked bursts (Fig. 1Aa), with partial reversibility. Flupenthixol was the only drug to significantly reduce mean burst duration as well as the average number of spikes in each burst, without any significant change in the intraburst firing frequency (Fig. 1Ab). Burst duration was reduced by 28% (1.11 ± 0.27 to 0.79 ± 0.22 s, *n* = 11, Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test, *p* = 0.0186) and the average number of spikes in evoked burst by 42% (42 ± 9 to 24 ± 5, *n* = 11, *p* = 0.001), without any significant change in intraburst firing frequency (40 ± 5 and 38 ± 7 Hz, *n* = 11, *p* > 0.8311). Such results are the opposite of those we found during application of D₁/D₅R agonists (Baufreton et al., 2003). Thus, only flupenthixol acted as an inverse agonist of D₅R on STN neurons. Furthermore, as shown in Figure 1Ac, depicting a neuron that fired spontaneously in bursts in the control condition, flupenthixol application resulted in an irregular discharge of action potentials and burst firing resumed on wash. Flupenthixol was also active on evoked bursts in brain slices obtained from DA-depleted, 6-OHDA lesioned animals (Fig. 1B). Burst duration and number of action potentials per burst were again reduced (1.40 ± 0.24 vs 1.17 ± 0.22 s, significantly different at *p* = 0.006; 58 ± 21 vs 41 ± 13, *p* = 0.002, respectively), whereas intraburst discharge frequency was unaltered (54 ± 10 vs 50 ± 8 Hz, *p* = 0.16). In contrast, we found no difference in the proportion of burst-competent neurons nor of neurons in the burst firing mode in normal and depleted states. We evoked sustained depolarizations over lasting the depolarizing stimuli in 18 of 23 neurons obtained from DA-intact rats and in 16 of 22 neurons from DA-depleted rats. This made flupenthixol the ideal drug for the following experiments.

D₅R in the STN display constitutive activity

In vitro experiments have shown that recombinant D₅R exhibit constitutive activity (Tiberi and Caron, 1994; Demchyshyn et al., 2000). However, no data are available concerning the activated

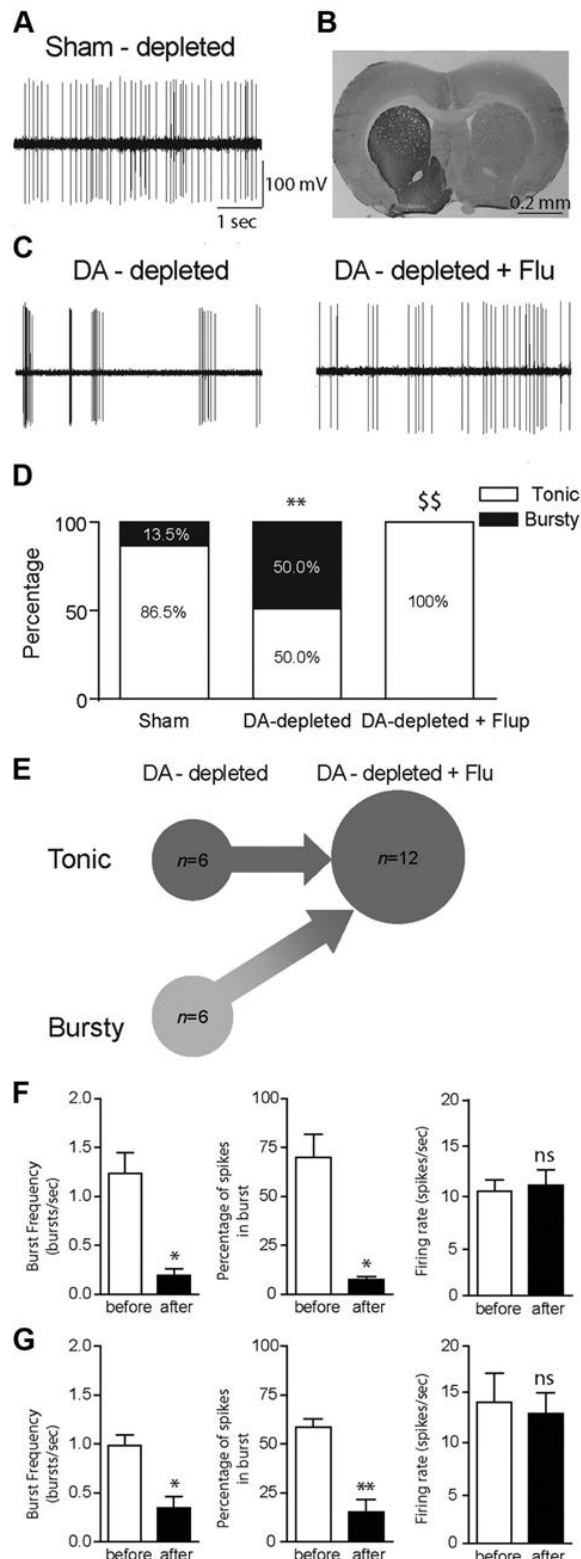


Figure 3. Flupenthixol reverses pathological burst-firing activity of STN neurons. **A**, A representative example of spike trains recorded in the STN in a sham-depleted rat. **B**, A representative photomicrograph of the striatum after immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase in

state of STN D₅R. We used a [³⁵S]GTPγ binding assay (Sim et al., 1995; O'Connor et al., 2005) to examine D₅R-activated G-proteins in brain slices. SKF 38393, a D₁/D₅ agonist, stimulated dose-dependent [³⁵S]GTPγ binding within the STN (maximum increase over basal level: 61%, one-way ANOVA, $F = 12.26$, $p < 0.0001$), indicating an increase in the activated state of local D₅R (Fig. 2A). A D₁/D₅ antagonist, SCH 23390, had no effect (Fig. 2B; one-way ANOVA, $F = 1.85$, $p = 0.1016$). Flupenthixol had an inverse agonist effect on local D₅R, decreasing [³⁵S]GTPγ binding by 52% (Fig. 2C; one-way ANOVA, $F = 21.90$, $p < 0.0001$). Furthermore, as a specificity control, previous incubation with the D₁/D₅ antagonist blocked the effect of both the D₁/D₅ agonist and D₅R inverse agonist (Fig. 2D). Together, these data provide the first evidence of D₅R constitutive activity within the STN and confirm the inverse agonist property of flupenthixol.

A D₅R inverse agonist reverses STN burst firing

Extracellular recordings in urethane-anesthetized rats ($n = 12$) were used to test the hypothesis that flupenthixol reduced the burst discharge capacity of STN neurons *in vivo*. Because the large majority of STN neurons in sham-depleted animals display a tonic, not burst, discharge pattern (Fig. 3A,D), the effect of flupenthixol was studied only on DA-depleted rats (Fig. 3B). Single-unit recordings in the STN of these animals exhibited a higher percentage of burst-firing neurons than sham-depleted rats (50 vs 13.5%; Fig. 3C,D). Interestingly, local application of flupenthixol (4 μg) in the STN turned the pathological burst-firing activity into tonic, single-spike firing ($n = 6$ of 6, $\chi^2 = 8.00$, $p = 0.0047$; Fig. 3C–E), without any effect on tonically discharging neurons ($n = 6$ of 6, $\chi^2 = 0.00$, $p = 1$; Fig. 3E). Analysis of burst parameters showed that flupenthixol induced a dramatic decrease of the burst frequency (Mann–Whitney test, $p = 0.042$; Fig. 3F) and percentage of spikes in burst ($p = 0.043$; Fig. 3F). No significant modification in the firing rate was observed ($p = 0.082$; Fig. 3F).

Because D₅R signaling has been shown to increase burst firing through potentiation of Cav1 channels in the STN *in vitro* (Baufreton et al., 2003), we tested the action of the Cav1 channel inhibitor calcisepine in local application *in vivo*. As with flupenthixol, local application of calcisepine (6 ng) in the STN turned the pathological burst-firing activity into tonic firing ($n = 5$). Analysis of burst parameters showed that calcisepine dramatically decreased the burst frequency (Mann–Whitney test, $p = 0.026$; Fig. 3G) and percentage of spikes in burst ($p = 0.002$; Fig. 3G). No significant modification in the firing rate was observed ($p = 0.81$; Fig. 3G).

Because flupenthixol can exert a D₂R antagonist activity, we examined the effect of local injection of a selective D₂R antagonist, raclopride, on neuronal activity in the STN ($n = 12$ neurons) of 12 DA-depleted rats. Raclopride (4 μg) did not modify the

←
a brain slice from a DA-depleted rat. Note the extensive lesion of fibers in the striatum ipsilateral to the side that received stereotaxic 6-OHDA injection into the medial forebrain bundle. **C**, Representative examples of spike trains recorded in the STN in DA-depleted rats before (left) and after local injection of flupenthixol (Flu, right). **D**, **E**, Histograms (**D**) and diagrams (**E**) of the effects of flupenthixol on STN neurons discharging in tonic single spike or burst mode. **F**, Histograms of burst frequency, percentage of spikes in burst, and firing rate of STN neurons before and after flupenthixol injection into the STN. **G**, Histograms of burst frequency, percentage of spikes in burst, and firing rate of STN neurons before and after local injection of calcisepine. Note that calcisepine in the same way as flupenthixol turned the pathological burst-firing activity into tonic, single-spike firing. Data represent mean ± SEM. **D**, χ^2 test, $**p < 0.01$ compared with sham-depleted rats, $^{SS}p < 0.05$ compared with DA-depleted rats. **F**, **G**, Mann–Whitney test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$; ns, not significant.

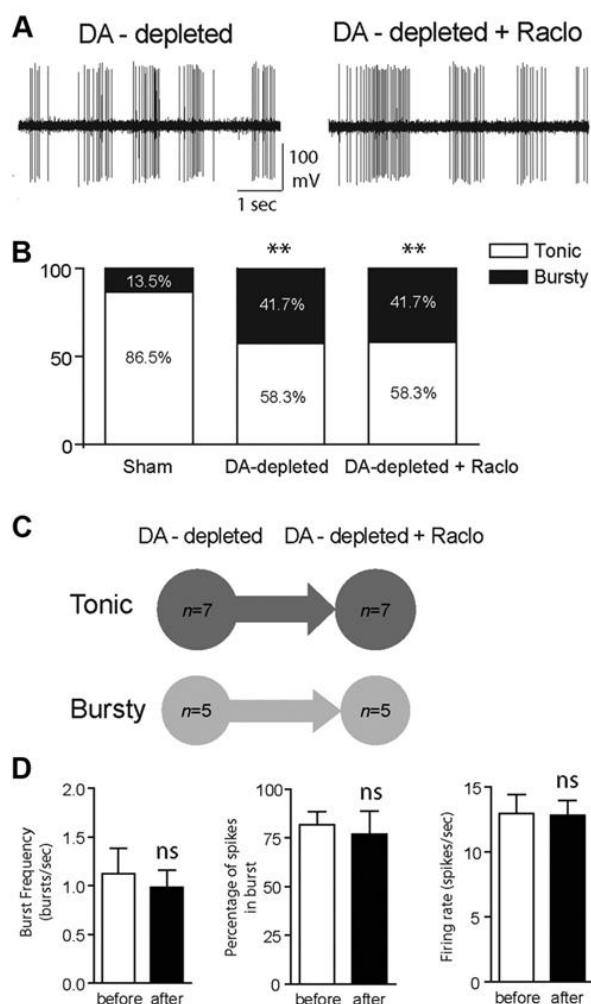


Figure 4. Raclopride does not induce any effect on the pathological burst-firing activity of STN neurons. **A**, Representative examples of spike trains recorded in the STN in DA-depleted rats before (left) and after local injection of raclopride (Raclo, right) into the STN. **B**, **C**, Histograms (**B**) and diagrams (**C**) of the effects of raclopride on STN neurons discharging in tonic single-spike or burst mode. Note that raclopride did not reverse the pathological burst-firing activity into tonic, single-spike firing. **D**, Histograms of burst frequency, percentage of spikes in burst, and firing rate of STN neurons before and after raclopride injection into the STN. Data represent mean \pm SEM. **B**, χ^2 test, $**p < 0.01$ compared with sham-depleted rats. **D**, Mann–Whitney test, $*p < 0.05$; ns, not significant.

firing pattern (χ^2 test, $\chi^2 = 0.00$, $p = 1$) or the firing rate of any of the STN neurons tested (Mann–Whitney test, $p = 0.986$; Fig. 4). The burst frequency and the percentage of spikes in burst did not change ($p = 0.625$ and 0.437 , respectively; Fig. 4). Saline injection under the same conditions did not induce any change in the firing rate ($p = 0.54$) or patterns of STN neurons ($\chi^2 = 0.00$, $p = 1$). Together, these results demonstrate that the impact of flupenthixol on firing patterns was mediated by D₅Rs in the STN.

A D₅ inverse agonist attenuates motor impairment

To test the hypothesis that flupenthixol reversed motor impairment induced by DA depletion, we assessed the behavior of adult male rats after intrasubthalamic injection of flupenthixol or saline. The outcome of DA depletion by 6-OHDA and flupenthixol treatment was assessed by analyzing spontaneous locomotor activity and asymmetry in forelimb motor activity. These motor behaviors were assessed 3–4 weeks after DA depletion. As shown

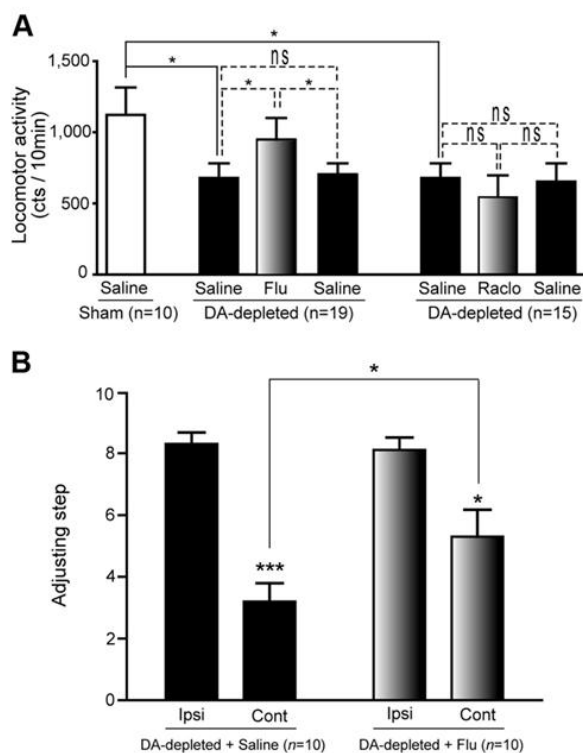


Figure 5. Flupenthixol attenuates motor impairment in DA-depleted rats. **A**, Locomotor activity in sham-lesioned rats ($n = 10$, white bars) and 6-OHDA unilaterally lesioned rats was measured before (black bars) and after (gray bars) local injection of flupenthixol (Flu, $n = 19$) or raclopride (Raclo, $n = 15$) into the STN ($4 \mu\text{g}/200 \text{ nl}$). Only flupenthixol improved locomotor activity in 6-OHDA-lesioned rats. **B**, Asymmetry in paw use was partially but significantly reversed by local injection of flupenthixol into the STN ($n = 10$). Values are presented as the mean \pm SEM. $*p < 0.05$, $***p < 0.0001$; ns, not significant. Full and dashed lines, Mann–Whitney and Wilcoxon's matched-pairs signed-rank tests, respectively. Ipsi, Ipsilateral; Cont, contralateral.

previously (Belujon et al., 2007), DA depletion impaired locomotor activity, reducing mean scores by 44% in DA-depleted rats compared with sham-lesioned animals (Mann–Whitney test, $p = 0.0313$). Local flupenthixol injection ($4 \mu\text{g}$ in 200 nl) significantly improved locomotor activity, which increased by 39%, compared with the measurements after a saline injection on the previous day (Fig. 5A; $n = 19$, Wilcoxon's test, $p = 0.0144$). To verify that this increase was attributable to flupenthixol injection, a post-challenge test was performed in which all rats received a saline injection on the next day. Rats reexposed to the actimeter had a similar locomotor activity compared with that observed after the first saline injection (Fig. 5A). Once again, in view of the antagonist activity of D₂R, the effects of raclopride, a selective D₂R antagonist, on locomotor activity were investigated. Injecting raclopride into the STN ($4 \mu\text{g}$ in 200 nl) had no effect (Fig. 5A; $n = 15$, $p = 0.7250$), confirming that the beneficial impact of flupenthixol was attributable to its action on D₅Rs in the STN. In agreement with previous studies (Tseng et al., 2005), unilateral DA depletion led to a 66% deficit in contralateral paw use (8.86 ± 0.49 ipsilateral vs 2.98 ± 0.53 contralateral, Wilcoxon's test, $p < 0.0001$; Fig. 5B). Local injection of flupenthixol into the STN on the DA-depleted side alleviated this asymmetry by $65.62 \pm 0.53\%$ (2.98 ± 0.53 vs 5.76 ± 1.03 , Mann–Whitney test, $p = 0.0137$). Local flupenthixol application in the STN thus attenuated the motor impairments of DA-depleted rats.

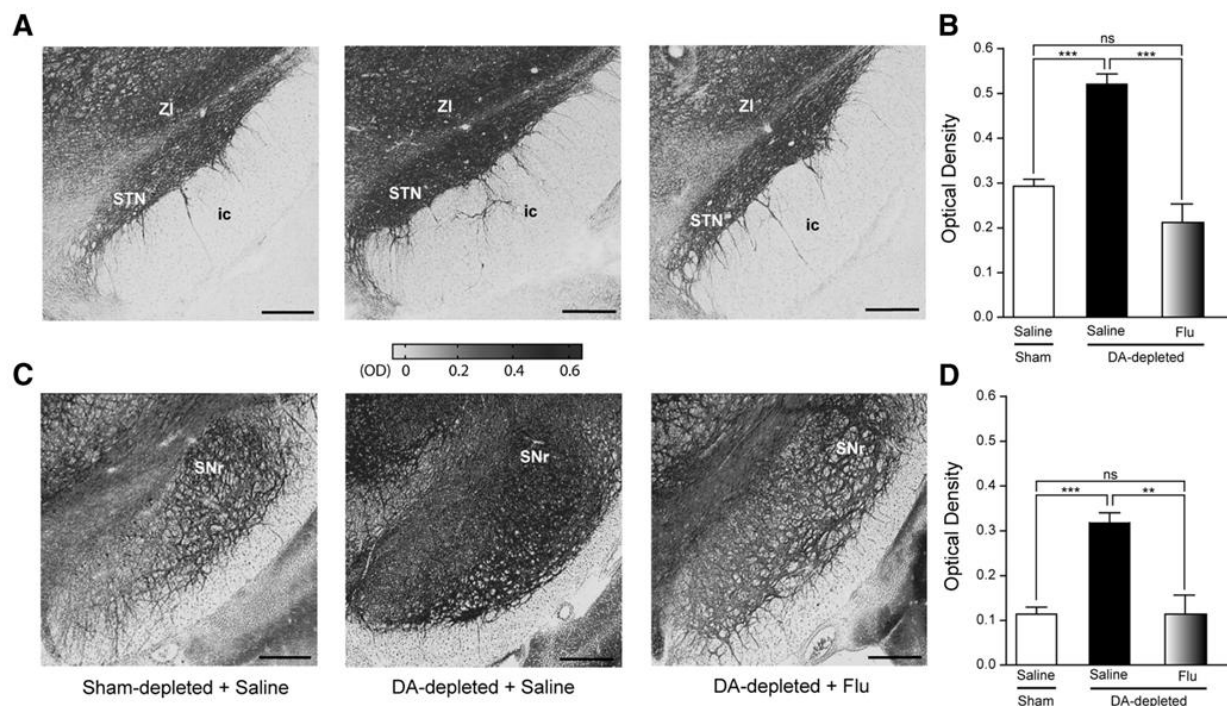


Figure 6. Flupentixol normalizes the metabolic hyperactivity in the STN and SNr. **A, C**, Representative photomicrographs of the metabolic activity revealed by COx staining in the STN (**A**) and SNr (**C**). **B, D**, STN (**B**) and SNr (**D**) hyperactivity in DA-depleted rats (black bars) compared with sham-lesioned animals (white bars) was normalized by injecting flupentixol (Flu) into the STN (gray bar). Data represent mean \pm SEM of OD values. $**p < 0.001$, $***p < 0.0001$; ns, not significant. Scale bar, 250 μ m. Note that, in addition to the increased COx levels in the STN and SNr, this figure shows an increased COx level in the zona incerta (Zi), as described previously in hemiparkinsonian rats (P erier et al., 2000). ic, Internal capsule.

A D₅ inverse agonist normalizes metabolic activity

The metabolic correlates of motor improvement were investigated by measuring the expression of COx, an endogenous marker for neuronal activity (Hirsch et al., 2000), in the STN and its efferent structure, the SNr, the principal output structure of the basal ganglia in the rat. As reported previously (Vila et al., 2000; Benazzouz et al., 2004; Blandini et al., 2007), after DA depletion by 6-OHDA in rats ($n = 4$), the COx activity in the STN (74.5%, unpaired t test, $p < 0.0001$) and SNr (146.5%, $p < 0.0001$) was significantly higher than in sham-lesioned animals ($n = 4$; Fig. 6). This abnormal hyperactive metabolism was normalized by injecting flupentixol into the STN (Fig. 6), using the same protocol applied as for behavioral experiments. Flupentixol induced a significant decrease in COx levels in STN (78.6%, $n = 4$ rats, $p = 0.0002$) and SNr (151.2%, $n = 4$ rats, $p = 0.0028$), normalizing the values with those obtained in sham-lesioned animals ($n = 4$ rats; STN, $p = 0.3828$; SNr, $p = 0.7193$). These data show that the blockade of STN D₅R constitutive activity reversed metabolic hyperactivity generated by DA depletion in both the STN and SNr.

Discussion

Pathophysiology of PD is associated with abnormal spiking activities of basal ganglia neurons, including changes in firing rates, bursting activities, power of oscillatory frequencies, and synchrony. STN, a pivotal nucleus of basal ganglia, exhibits a marked proclivity to sustained burst firing in patients and nonhuman primate and rodent models of the disease (Bergman et al., 1994; Magill et al., 2001; Ni et al., 2001a,b; Galvan and Wichmann, 2008). The mechanism underlying pathological burst activity in STN is unknown. The causal link between the pathological firing

and the manifestation of parkinsonian-like motor symptoms has not yet been determined. Our results show for the first time that D₅R_s located in the STN display constitutive activity. Inhibition of the constitutive activity by the local injection of an inverse agonist of D₅R_s, flupentixol, depresses the prevalence of the burst firing and alleviates the motor impairment in the 6-OHDA rat model of PD.

Pharmacological validation

The lack of subtype-selective ligands limits the understanding of the respective role of D₁R_s and D₅R_s. Nevertheless, in our study, it is unlikely that the observed effects here are attributable to the action of drugs on D₁R for the following arguments. (1) *In situ* hybridization studies found a high level of D₅R_s mRNA in the STN (Svenningsson and Le Moine, 2002), whereas mRNA for D₁R_s was not detected in rat (Boyson et al., 1986; Freneau et al., 1991; Svenningsson and Le Moine, 2002) and human STN (Augood et al., 2000). (2) Using a highly selective antibody raised against a peptide sequence of cloned D₅R_s, it has been shown that D₅R_s were being expressed at postsynaptic sites within STN neurons, and single-cell RT-PCR profiling evidenced that burst-competent neurons only expressed D₅R_s (Baufreton et al., 2003). Together, these evidences demonstrate that STN neurons express D₅R_s but not D₁R_s, suggesting that the effects observed in our study are attributable to the action of drugs on D₅R_s but not on D₁R_s. Then, to select a potent inverse agonist of D₅R_s, three drugs, flupentixol, butaclamol, and fluphenazine, were tested in the STN using whole-cell patch-clamp recordings in brain slices. They have been shown to behave as inverse agonists of D₅R_s (Tiberi and Caron, 1994; Charpentier et al., 1996; Demchyshyn et al., 2000; Tumova et al., 2003; Tumova et al., 2004). We found

that only flupenthixol, not butaclamol or fluphenazine, acted as an inverse agonist because it induced the opposite effects of an agonist, e.g., a reduction of burst duration and a decrease in the number of spikes in bursts (Baufreton et al., 2003). Accordingly, flupenthixol was selected and used in all the experiments of the study.

Our results of [³⁵S]GTPγ binding provide the first evidence of D₅R constitutive activity within the STN *in vivo*, in line with previous *in vitro* experiments using D₅R expression in a heterologous system (Tiberi and Caron, 1994; Demchyshyn et al., 2000). We show that the agonist of receptors in the D₁ family, SKF 38393, induced a dose-dependent activation of D₅R_s in the STN. The D₁ antagonist SCH 23390 alone had no effect, although it occluded the action of SKF 38393. Furthermore, [³⁵S]GTPγ binding showed that D₅R activation within the STN was inhibited by flupenthixol (thus behaving as an inverse agonist of D₅R_s) and that SCH 23390 prevented this effect. Constitutive activity, the functional signature of D₅R_s, has been suggested to contribute to burst firing in STN neurons *in vitro* (Baufreton et al., 2003, 2005). Our electrophysiological results provide evidence both *in vitro* and *in vivo* showing that flupenthixol dramatically reversed the pathological burst firing of STN neurons, which became a tonic single-spike firing. Flupenthixol-induced changes in the firing pattern were specific to STN bursty neurons because it did not modify the mean firing rate or the firing pattern of the tonically discharging STN neurons. These results strongly support the involvement of D₅R_s in the burst firing of STN neurons in agreement with the previous study showing that D₅R activation potentiated burst firing of STN neurons in brain slices (Baufreton et al., 2003). Calciseptine, a specific peptide antagonist of high threshold, slowly inactivating, Cav1-type calcium channels, reproduced the action of flupenthixol on firing *in vivo*. This new piece of evidence underlines the role of Cav channels in *in vivo* patterning, as suggested by a number of *in vitro* studies (Nakanishi et al., 1987; Atherton et al., 2010; Wilson and Bevan, 2011). Interestingly, flupenthixol-induced firing pattern normalization was paralleled by the improvement of motor impairment, previously induced by DA depletion. Indeed, we show that intrasubthalamic injection of flupenthixol increased locomotor activity and contralateral paw use. These results suggest the existence of a link between STN bursty activity and motor deficits, in line with a recent study demonstrating that STN electrical stimulation using negative constant currents decreased STN burst discharges and remedied locomotor deficits in 6-OHDA rats, whereas positive constant currents readily increased burst discharges and generate locomotor deficits in normal rats (Tai et al., 2012). It must be noted in this respect that clinical improvement in parkinsonian patients has been correlated with a shift from bursting activity to nonbursting discharge (Benedetti et al., 2004). To determine that the observed effects of flupenthixol were not attributable to an antagonistic action on D₂R_s, we investigated the electrophysiological and behavioral effects of raclopride, which is a selective antagonist of D₂R_s. Our results show that intrasubthalamic injection of raclopride had no electrophysiological or behavioral effects. This result rules out the involvement of D₂R_s in the action of flupenthixol. Together, our data strongly support the implication of D₅R_s in the pathophysiology of parkinsonian-like motor deficits and also the key role that STN firing abnormalities play in the manifestation of these deficits.

In several brain systems, burst firing patterns, which represent a prolonged period of densely populated spikes, have been shown to contribute to enhanced synaptic neurotransmitter release compared with tonic single-spike firing (Dutton

and Dyball, 1979; Lundberg et al., 1986; Gonon, 1988). In the STN, the enhanced proportion of burst firing recorded after DA depletion may reflect functional neuronal hyperactivity exerting an exaggerated excitatory drive on the output structures of basal ganglia. This hyperactivity can be quantified by measuring the activity of COx using *in situ* hybridization or histochemistry approaches. Several studies, including ours (Vila et al., 2000; Tai et al., 2003; Benazzouz et al., 2004), have shown that, in 6-OHDA-lesioned rats, COx expression levels in the STN and its major efferent target, the SNr, increased dramatically compared with those of sham-lesioned animals. Accordingly, the present study shows similar increases in COx activity levels in 6-OHDA-lesioned rats, and flupenthixol normalized the pathological metabolic hyperactivity in both basal ganglia nuclei. These results are in line with previous studies showing that STN high-frequency stimulation, which is known to improve parkinsonian-like motor deficits, resulted in a normalization of COx expression in both STN and SNr (Salin et al., 2002; Tai et al., 2003; Benazzouz et al., 2004).

Our findings are the first to demonstrate the involvement of D₅R_s, located in the STN, in the pathophysiology of PD because of their constitutive activity. Indeed, application of a D₅R inverse agonist induced a switch from pathological burst firing to normal tonic firing, resulting in the attenuation of parkinsonian-like motor impairment. Additional experiments are needed to determine the relationship between burst firing and rhythmicity/synchrony. Given the pivotal position of the STN in basal ganglia, we suggest that selective action on the D₅R subtype might lead to better-targeted drug therapy for PD. This not only represents a major paradigm shift in our understanding of the pathophysiology of PD but also opens up new avenues for therapeutic approaches based on specific pharmacological agents.

References

- Abedi PM, Delaville C, De Deurwaerdère P, Benjelloun W, Benazzouz A (2013) Intrapallidal administration of 6-hydroxydopamine mimics in large part the electrophysiological and behavioral consequences of major dopamine depletion in the rat. *Neuroscience* 236:289–297. CrossRef Medline
- Akaoka H, Aston-Jones G (1991) Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. *J Neurosci* 11:3830–3839. Medline
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375. CrossRef Medline
- Atherton JF, Kitano K, Baufreton J, Fan K, Wokosin D, Tkatch T, Shigemoto R, Surmeier DJ, Bevan MD (2010) Selective participation of somatodendritic HCN channels in inhibitory but not excitatory synaptic integration in neurons of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 30:16025–16040. CrossRef Medline
- Augood SJ, Hollingsworth ZR, Standaert DG, Emson PC, Penney JB Jr (2000) Localization of dopaminergic markers in the human subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 421:247–255. CrossRef Medline
- Baufreton J, Bevan MD (2008) D2-like dopamine receptor-mediated modulation of activity-dependent plasticity at GABAergic synapses in the subthalamic nucleus. *J Physiol* 586:2121–2142. CrossRef Medline
- Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A (2003) D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J Neurosci* 23:816–825. Medline
- Baufreton J, Zhu ZT, Garret M, Bioulac B, Johnson SW, Taupignon AI (2005) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *FASEB J* 19:1771–1777. CrossRef Medline
- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27:9595–9606. CrossRef Medline

- Benazzouz A, Gross C, Féger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382–389. [CrossRef Medline](#)
- Benazzouz A, Tai CH, Meissner W, Bioulac B, Bezard E, Gross C (2004) High-frequency stimulation of both zona incerta and subthalamic nucleus induces a similar normalization of basal ganglia metabolic activity in experimental parkinsonism. *FASEB J* 18:528–530. [CrossRef Medline](#)
- Benedetti F, Colloca L, Torre E, Lanotte M, Melcarne A, Pesare M, Bergamasco B, Lopiano L (2004) Placebo-responsive Parkinson patients show decreased activity in single neurons of subthalamic nucleus. *Nat Neurosci* 7:587–588. [CrossRef Medline](#)
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436–1438. [CrossRef Medline](#)
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507–520. [Medline](#)
- Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT (2007) Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastratial injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* 25:397–405. [CrossRef Medline](#)
- Bouali-Benazzouz R, Tai CH, Chetrit J, Benazzouz A (2009) Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus. *Neuroscience* 164:588–596. [CrossRef Medline](#)
- Boyson SJ, McGonigle P, Molinoff PB (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6:3177–3188. [Medline](#)
- Cavanagh JF, Wiecki TV, Cohen MX, Figueroa CM, Samanta J, Sherman SJ, Frank MJ (2011) Subthalamic nucleus stimulation reverses mediofrontal influence over decision threshold. *Nat Neurosci* 14:1462–1467. [CrossRef Medline](#)
- Charpentier S, Jarvie KR, Severynse DM, Caron MG, Tiberi M (1996) Silencing of the constitutive activity of the dopamine D1B receptor. Reciprocal mutations between D1 receptor subtypes delineate residues underlying activation properties. *J Biol Chem* 271:28071–28076. [CrossRef Medline](#)
- Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S, Belujon P, Morin S, Taupignon A, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A (2009) Involvement of basal ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One* 4:e6208. [CrossRef Medline](#)
- Cragg SJ, Baufreton J, Xue Y, Bolam JP, Bevan MD (2004) Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. *Eur J Neurosci* 20:1788–1802. [CrossRef Medline](#)
- Cruz AV, Mallet N, Magill PJ, Brown P, Averbeck BB (2011) Effects of dopamine depletion on information flow between the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *J Neurophysiol* 106:2012–2023. [CrossRef Medline](#)
- D'Aoust JP, Tiberi M (2010) Role of the extracellular amino terminus and first membrane-spanning helix of dopamine D1 and D5 receptors in shaping ligand selectivity and efficacy. *Cell Signal* 22:106–116. [CrossRef Medline](#)
- Demchishyn LL, McConkey F, Niznik HB (2000) Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *J Biol Chem* 275:23446–23455. [CrossRef Medline](#)
- Dutton A, Dyball RE (1979) Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *J Physiol* 290:433–440. [Medline](#)
- Fremeau RT Jr, Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG (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* 88:3772–3776. [CrossRef Medline](#)
- Galvan A, Wichmann T (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol* 119:1459–1474. [CrossRef Medline](#)
- Gonon FG (1988) Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* 24:19–28. [CrossRef Medline](#)
- Haynes WI, Haber SN (2013) The organization of prefrontal-subthalamic inputs in primates provides an anatomical substrate for both functional specificity and integration: implications for Basal Ganglia models and deep brain stimulation. *J Neurosci* 33:4804–4814. [CrossRef Medline](#)
- Hirsch EC, Périer C, Orioux G, François C, Féger J, Yelnik J, Vila M, Levy R, Tolosa ES, Marin C, Trinidad Herrero M, Obeso JA, Agid Y (2000) Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *Trends Neurosci* 23:S78–S85. [CrossRef Medline](#)
- Kaneoke Y, Vitek JL (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* 68:211–223. [CrossRef Medline](#)
- Laffray S, Bouali-Benazzouz R, Papon MA, Favereaux A, Jiang Y, Holm T, Spriet C, Desbarats P, Fossat P, Le Feuvre Y, Decossas M, Héliot L, Langel U, Nagy F, Landry M (2012) Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3 ζ in chronic pain conditions. *EMBO J* 31:3239–3251. [CrossRef Medline](#)
- Leventhal DK, Gage GJ, Schmidt R, Pettibone JR, Case AC, Berke JD (2012) Basal ganglia beta oscillations accompany cue utilization. *Neuron* 73:523–536. [CrossRef Medline](#)
- Levy R, Lang AE, Dostrovsky JO, Pahapill P, Romas J, Saint-Cyr J, Hutchison WD, Lozano AM (2001) Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. *Brain* 124:2105–2118. [CrossRef Medline](#)
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1105–1111. [CrossRef Medline](#)
- Lundberg JM, Rudehill A, Sollevi A, Theodorsson-Norheim E, Hamberger B (1986) Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci Lett* 63:96–100. [CrossRef Medline](#)
- Luo J, Kaplitt MG, Fitzsimons HL, Zuzga DS, Liu Y, Oshinsky ML, Durrant MJ (2002) Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* 298:425–429. [CrossRef Medline](#)
- Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106:313–330. [CrossRef Medline](#)
- Mallet N, Pogossyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci* 28:4795–4806. [CrossRef Medline](#)
- Martin MW, Scott AW, Johnston DE Jr, Griffin S, Luedtke RR (2001) Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells. *Eur J Pharmacol* 420:73–82. [CrossRef Medline](#)
- Miguelé J, Morin S, Martinez A, Goillandeau M, Bezard E, Bioulac B, Baufreton J (2012) Altered pallido-pallidal synaptic transmission leads to aberrant firing of globus pallidus neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Physiol* 590:5861–5875. [CrossRef Medline](#)
- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1987) Electrical membrane properties of rat subthalamic neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res* 437:35–44. [CrossRef Medline](#)
- Ni Z, Gao D, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL, Benazzouz A (2001a) Effect of microiontophoretic application of dopamine on subthalamic nucleus neuronal activity in normal rats and in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. *Eur J Neurosci* 14:373–381. [CrossRef Medline](#)
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2001b) Intra-subthalamic injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat. *Synapse* 40:145–153. [CrossRef Medline](#)
- O'Connor KA, Porrino LJ, Davies HM, Childers SR (2005) Time-dependent changes in receptor/G-protein coupling in rat brain following chronic monoamine transporter blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 313:510–517. [CrossRef Medline](#)
- Olsson M, Nikkha G, Bentlage C, Björklund A (1995) Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* 15:3863–3875. [Medline](#)
- Paxinos G, Watson C (1996) The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic.
- Périer C, Vila M, Féger J, Agid Y, Hirsch EC (2000) Functional activity of zona incerta neurons is altered after nigrostriatal denervation in hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol* 162:215–224. [CrossRef Medline](#)
- Rommelfanger KS, Wichmann T (2010) Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. *Front Neuroanat* 4:139. [CrossRef Medline](#)

- Salin P, Manrique C, Forni C, Kerkerian-Le Goff L (2002) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus selectively reverses dopamine denervation-induced cellular defects in the output structures of the basal ganglia in the rat. *J Neurosci* 22:5137–5148. Medline
- Sim LJ, Selley DE, Childers SR (1995) In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma]-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7242–7246. CrossRef Medline
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* 23 [Suppl 3]:S534–S547. CrossRef
- Surmeier DJ, Bevan MD (2003) "The little engine that could": voltage-dependent Na(+) channels and the subthalamic nucleus. *Neuron* 39:5–6. CrossRef Medline
- Svenningsson P, Le Moine C (2002) Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *Eur J Neurosci* 15:133–142. CrossRef Medline
- Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C, Benazzouz A (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J* 17:1820–1830. CrossRef Medline
- Tai CH, Pan MK, Lin JJ, Huang CS, Yang YC, Kuo CC (2012) Subthalamic discharges as a causal determinant of parkinsonian motor deficits. *Ann Neurol* 72:464–476. CrossRef Medline
- Tiberi M, Caron MG (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J Biol Chem* 269:27925–27931. Medline
- Tseng KY, Kargieman L, Gacio S, Riquelme LA, Murer MG (2005) Consequences of partial and severe dopaminergic lesion on basal ganglia oscillatory activity and akinesia. *Eur J Neurosci* 22:2579–2586. CrossRef Medline
- Tumova K, Iwasiow RM, Tiberi M (2003) Insight into the mechanism of dopamine D1-like receptor activation. Evidence for a molecular interplay between the third extracellular loop and the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 278:8146–8153. CrossRef Medline
- Tumova K, Zhang D, Tiberi M (2004) Role of the fourth intracellular loop of D1-like dopaminergic receptors in conferring subtype-specific signaling properties. *FEBS Lett* 576:461–467. CrossRef Medline
- Vila M, Périer C, Féger J, Faucheux B, Ruberg M, Raisman-Vozari R, Agid Y, Hirsch EC (2000) Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *Eur J Neurosci* 12:337–344. CrossRef Medline
- Wilson CJ, Bevan MD (2011) Intrinsic dynamics and synaptic inputs control the activity patterns of subthalamic nucleus neurons in health and in Parkinson's disease. *Neuroscience* 198:54–68. CrossRef Medline

ANNEXE 2 : CHAPITRE DE LIVRE

**Dopamine receptors in the subthalamic nucleus: identification and
localization of D5 receptors**

*Lionel Froux, Diana Suarez-Boomgaard, Jérôme Baufreton, Alicia Rivera, Maurice Garret,
Anne Taupignon*

A paraître

Dopamine receptors in the subthalamic nucleus: identification and localisation of D5 receptors

Lionel Froux ^{1,2}, Diana Suarez-Boomgaard ³, Jerome Baufreton ^{1,2}, Alicia Rivera ³, Maurice Garret ^{4,5}, and Anne Taupignon ^{1,2}

¹ Univ. Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

² CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

³ Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica, Facultad de Ciencias, 29071 Málaga, Spain

⁴ Univ. Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France

⁵ CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France

Running Head: D5R in STN

Corresponding author:

anne.taupignon@u-bordeaux2.fr

IMN, Université de Bordeaux, 146 rue Saignat, 33076 Bordeaux, France

Abstract

Herein we present methodological approaches for the identification and characterization of dopamine receptors in the subthalamic nucleus, a component nucleus of the basal ganglia, at pre- and post-synaptic locations, and of their roles with an emphasis given to the dopamine D5 receptor subtype. This chapter focuses on the possible sources of divergence between electrophysiological studies, and describes the pharmacological tools available for functional studies of this receptor. The procedures for single-cell reverse transcription PCR identification of dopamine D5 receptor mRNA and immunohistochemical detection of the receptor at cellular and sub-cellular levels are presented.

Key words

D5 dopamine receptor; subcellular localization; single cell RT-PCR; immunohistochemistry; electron microscopy

1) Introduction

The basal ganglia (BG) are a network of several interconnected subcortical nuclei. They form somatotopically-organised cortico-cortical loops controlling voluntary movement, as well as cognitive and motivational aspects of motor behaviour (1). The subthalamic nucleus (STN) plays a prominent role in the BG for several reasons: i) it is an input structure of the network, in the 'hyperdirect' pathway; ii) it is the sole excitatory (glutamatergic) nucleus in the BG; iii) together with these properties, the pacemaker activity of subthalamic neurons may confer on the STN the ability to drive the whole BG network; and finally, iv) high frequency electrical stimulation of the STN is used as a symptomatic treatment for Parkinson's disease in humans.

Dopamine (DA) is critical for the functions supported by the BG. It originates from midbrain DA neurons in the *substantia nigra pars compacta* and the ventral tegmental area. Axons from these neurons extend through the medial forebrain bundle to provide rich DA innervation of the striatum and more limited innervation of other basal ganglia regions, including the STN (2,3). In the STN, DA is released from *en passant* tyrosine hydroxylase immunoreactive axons that form synapses. DA fibres and release sites are sparse and local electrical stimulation evokes low extracellular DA concentrations (4). Thus, a 1 sec train of stimulations at 50Hz evoked action potential-dependent release of DA in the STN, with a (peak concentration estimated to be in the 100 to 500 nM range, 10-fold lower than that

measured upon a single stimulation in any striatal territory using the same voltametric method (2,4-6). It is unknown whether DA release also occurs at non synaptic sites.

1.1 Dopamine receptor (DAR) repertoire in the STN

Anatomical and functional studies, using techniques such as radioligand binding, immunohistochemistry for light and electron microscopy, electrophysiology, and single cell RT-PCR have established that D1 (D1R, D5R) and D2 (D2R, D3R, D4R) receptor families are present and functional in the STN (for review, see (7,8)). D1R are expressed on afferent (pre-synaptic) terminals in the primate STN, whereas D5R are expressed post-synaptically in subthalamic neurons of rats and monkeys (9,10,7,11). Activation of D1 receptor family increases the firing frequency of STN neurons in rat brain slices (12,13). D5R activation enhances evoked and spontaneous burst-firing duration, acting on the Ca_v1 channel *in vitro* and *in vivo*, through the adenylyl cyclase-cAMP-PKA cascade in burst-competent STN neurons (10,12).

The D2 receptor family are present at pre- and post-synaptic sites within the STN. Activation of postsynaptic D2R and D3R depolarizes subthalamic neurons, increases their firing frequency and excitability, but reduces their bursting potency. Thus, post-synaptic D2R have the ability to turn burst firing into single-spike firing (14,15,12). Pre-synaptic D2R or D3R activation reduces the initial release probability of GABA and glutamate by afferent terminals (16,17). D4Rs may be expressed pre-synaptically, possibly indicating an involvement in the control of GABA-afferent transmission to the STN (18).

1.2 Demonstration of DAR action

The identity of DARs acting in the STN was revealed by patch clamp experiments in whole-cell, cell-attached, and perforated-patch configurations in rodent brain slices (*see Note 1*). We will review the procedures and comment on the potential source of discrepancies between the studies. Our main technical focus is the identification of D5R action.

In the cell-attached configuration, the membrane, the neuron metabolism, and, thus, the ionic buffering, channel activity, and transduction pathways of DARs remain intact. The perforated patch, using the pore-forming molecule gramicidin to obtain electrical access to neurons, is thought to have a similar protective action. In any case, whole-cell patch-clamp is

disadvantageous and may emphasize pre-synaptic actions of DARs to the detriment of post-synaptic actions that may necessitate the preservation of neuron cytosol (*see Note 2*).

1.2.1 DAR agonists

The commonly used agonists of D1 and D2 receptor families (SKF81297 and SKF82958, and quinpirole), at concentrations of 5-10 μM , did not induce co-activation of receptors in these 2 families. These concentrations, used in perfusion on brain slices, seem a good compromise between specificity and power of action (**12**) (*see Note 3*). SKF81297, SKF82958, and SKF38393, at concentrations of 2-5 μM in Krebs medium perfusion, acted on burst firing. There was no qualitative difference in the action of these drugs, which all induced a significant increase in burst duration, accompanied by an increase in action potentials per burst (**10**) (*see Note 4*). This phenomenon was caused by activation of the post-synaptic membrane receptors and protein kinase A, followed by Ca_v1 channel phosphorylation. It was marked in approximately 90 % burst-competent neurons (**10**) (*see Note 5*). The burst firing capacity was linked to differential coupling of apamin-sensitive SK channels to Ca^{2+} channels (**19**). Furthermore, co-application of SKF81297, SKF82958, or SKF38393 together with the antagonist SCH23390 had no effect (*see 2.1.2 and Note 6*). Similarly, SKF81297 (5 μM) did not change the amplitude of inhibitory post-synaptic currents or the short term dynamics of the pallido-subthalamic GABAergic synapses, controlled by D2R and /or D3R receptors (**17**). To determine which subtype of D2 receptor family was acting on Ca_v 2.2 channels expressed at the subthalamic neuron membrane, PD168077 was applied to acutely-dissociated subthalamic neurons. The affinity of PD168077 for the D4R is about 10 nM, whereas its affinity for D2 and D3 receptors is approximately 3 μM . In contrast to quinpirole (10 μM), PD168077 (1 μM) did not alter the voltage-dependent calcium current amplitude (**14**) ruling out a role of D4R.

1.2.2 DAR antagonists

DAR antagonists may be used to probe the action of physiologically released DA, or to examine the action of exogenously applied DAR agonists. Given the location of the STN in the rodent brain, brain slices containing the STN do not usually retain the whole repertoire of afferent cell bodies (**20,21**). The experimental results of most groups studying the STN slices have revealed that pre-synaptic fibres, although presumably severed from cell bodies, release

GABA or glutamate onto subthalamic neurons, producing spontaneous and miniature post-synaptic potentials and currents. Dopaminergic fibres in the STN are unlikely to release DA in the same mode as glutamatergic fibres release glutamate. Rather, DA release is thought to be generally designed for volume transmission and its diffusion may cause spillover onto extrasynaptic receptors (2). No evidence of DAR antagonist action and, thus, tonic action of DA, has been detected in the STN in brain slices. This may simply be due to the fact that either DA is washed out of slices continuously bathed in Krebs-derived solutions, or severed DA afferents do not retain the properties of intact dopamine neurons. As noted earlier, local electrical stimulation induced transient increases in extracellular DA concentration. Stimulation consisted of 1 sec trains at 50 Hz, designed to reproduce burst-firing in dopaminergic axons. The DA increase lasted approximately 5 sec and peaked in the 100-500 nM range (4). The features of such a phasic DA release have not yet been reproduced experimentally.

A number of DAR antagonists discriminate between D1 and D2 receptor families, since their affinity for receptors in these two families differs 100- to 1000-fold. Thus, the K_i values of D2-class antagonists, such as sulpiride and raclopride, are below 50 nM for D2 receptor family and above 5 μ M for D1 receptor family. SCH23390 is even more discriminant, with a ratio of 1000 (K_i of 0.5 nM for D1/D5 receptors vs 500 nM or more for D2/D3/D4 receptors) (22). SCH23390 and raclopride can facilitate discrimination between D1 and D2 receptor families, when used in brain slices at concentrations of 10 and 5 μ M, respectively. Thus, in the STN, raclopride did not prevent the action of any of the 3 agonists (SKF81297, SKF82958 or SKF38393, 3-5 μ M) and co-application of SCH23390 with any of the 3 agonists had no effect (10).

1.2.3 Dopamine

Exogenous DA has only been tested so far using bath application or superfusion of brain slices. Its effect, at high concentrations (30 -100 μ M), on the spontaneous firing rate of subthalamic neurons in brain slices, was investigated in conjunction with a variety of dopaminergic agonists and antagonists. Results obtained with these dopaminergic drugs have led to the suggestion of an unconventional pharmacology of DAR in the STN (23). However, studies using different approaches suggest that this unconventional pharmacological regulation of STN firing could be linked to distinct modulation of firing rate parameters

(intrinsic firing, Ca²⁺ or K⁺ conductances, and inhibitory or excitatory synaptic potentials/currents) by several DAR subtypes.

DA at concentrations detected in the STN on local electrical stimulation using fast voltammetry has not been tested in brain slices from normal animals. The only evidence of DA action in the 100-500 nM range was obtained in a 6-OHDA experimental model of Parkinsonism: GABAergic but not glutamatergic transmission was inhibited by DA at 100 and 300 nM (24).

1.2.4 No specific tools to distinguish between D1 receptor subtypes

No subtype-selective ligands of receptors in the D1 family have been experimentally tested on neurons. Thus, there are no validated pharmacological tools for distinguishing between D1 and D5 action. For the moment, agonists and antagonists for D1 receptor family can be used to activate DARs, as described above, in brain slices obtained from transgenic animals bearing a null or truncated DAR (10). A mouse line bearing a null mutation for the D1R was generated by Drago and coll. (25). Mutant mice have a neomycin phosphotransferase gene inserted in the region of the D1R gene leading to the excision of the third intracellular loop and downstream encoded sequence. Their use is freely granted by Dr Drago on request. They can also be purchased from the Jackson laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). D1R mutant mice exhibit normal coordination and open field activity, but fewer rearing events than their non-mutant littermates (*see Note 7*). Sibley *et al.* generated D5R-deficient mice by including a neomycin gene in the D5R gene, to disrupt the reading frame downstream from the fourth intracellular loop (26). MTAs may be obtained from Dr Sibley. Mice homozygous for the mutant D5R show discrete deficits (*see Note 8*).

1.2.5 Cis-(Z)-flupenthixol

Constitutive activity was recognised from the earliest studies as a typical feature of recombinant D5R (27,28). Given that burst-competent neurons in the STN express D5R but not D1R, the constitutive activity of D5R may be involved in the motor deficits observed in experimental Parkinsonism. Interestingly, the burst-potentiating action resulting from the constitutive activity of D5R may be maintained in the dopamine-depleted state, *i.e.* when the synergistic action of the other DARs disappears in the absence of their ligand (12).

A number of psychoactive drugs have been shown to behave as inverse agonists of recombinant D5R, the most effective and specific being fluphenazine, (+)butaclamol and cis-(Z)-flupenthixol (29,30). The 3 drugs acted on evoked bursts from subthalamic neurons in brain slices (31). Cis-(Z)-flupenthixol alone produced the changes expected from an inverse D5R agonist (see Note 9). Then, cis-(Z)-flupenthixol was used in behavioural experiments; *in vivo* and *in vitro* electrophysiological recordings of STN neurons; and *ex vivo* functional neuroanatomy studies. Taken together, the data indicated that subthalamic D5R, acting on Ca_v1 channels, were involved in the pathophysiology of Parkinson's disease and that administering an inverse agonist of these receptors was likely to lessen motor symptoms (31).

The combined use of agonists, antagonists, inverse antagonists, and KO mice revealed a cellular function of D5R involved in the physiology as well as physiopathology of STN. The identity of receptor (D5R vs D1R) has been unequivocally demonstrated by single-cell RT-PCR. Cellular and subcellular localizations of D5R have been defined by immunohistochemistry. The two methods are discussed in the following section.

1.3 Single-cell reverse polymerase chain reaction and immunohistochemistry

Single-cell reverse polymerase chain reaction (scRT-PCR) offers a unique advantage for exploring the mRNA repertoire encoding DARs in single neurons with a known functional profile. Thus, whole-cell recordings of subthalamic neurons in brain slices and acutely dissociated subthalamic neurons are followed by scRT-PCR analysis of mRNA encoding D1 or D2 receptors (14,10). We describe in this chapter the procedure used in (10) to detect mRNA of receptors in the D1 receptor family in burst-competent subthalamic neurons.

D5R localization at the cellular and subcellular levels contributed to deciphering the role of this DAR in the STN. It is particularly interesting to demonstrate not only the presence of D5R in the STN but also its pre- and/or postsynaptic localization and, therefore, its relevance to the BG network. Typically, antibodies are generated against a peptide sequence of 10-12 amino acids exclusive to the dopamine receptor under study. In the case of D5R localization, this procedure requires a highly-specific antibody that recognizes the antigen but has no cross-reactivity with other DARs, e.g. D1R. In the experiment below, a polyclonal previously prepared and extensively characterised D5R antibody developed in

rabbit was used (32), although commercial alternatives are also available (e.g. D5R antibody #BP124S from Acris).

2. Materials

2.1 Single-cell RT-PCR

All solutions and reagents must be RNase free.

1. Sterilized 1.5-ml microcentrifuge tubes.
2. Automatic pipets capable of dispensing 1 to 20 μ l and 20 to 200 μ l
3. Sterilized, RNase-free disposable tips for automatic pipets
4. Disposable latex gloves
5. RNase-free DNase I
6. RNase-free water.
7. Thin-walled PCR tubes
8. Hexamer random primers
9. The four deoxyribonucleotide triphosphates
10. Dithiothreitol
11. Ribonuclease inhibitor
12. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
13. Taq DNA polymerase
14. Tris buffered at pH 8
15. 100 mM $MgCl_2$

2.2 Immunohistochemistry for light microscopy

1. Sodium pentobarbital
2. Needles (25 gauge) and 1.5 ml syringes
3. Perfusion pump
4. 0.1 mM phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS)
5. Paraformaldehyde
6. 10 ml glass collecting vials
7. Sucrose
8. Dry ice
9. Freezing microtome

10. 6-well plates
11. Sodium azide
12. Hydrogen peroxide solution 30%(w/w)
13. Polyclonal D5R antibody (See introduction, section 1.3)
14. Triton X-100
15. Biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody
16. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin
17. 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (DAB)
18. Nickel ammonium sulphate
19. Silane coated microscope slides
20. 50%, 70%, 96%, and 100% ethanol
21. Xylene
22. Coverslip
23. Histology slide mounting medium

2.3 Immunohistochemistry for electron microscopy

1. Sodium pentobarbital
2. Needles (25 gauge) and 1.5 ml syringes
3. Perfusion pump
4. 0.1 mM phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS)
5. Paraformaldehyde
6. Glutaraldehyde
7. 10 ml glass collecting vials
8. Vibratome (Leica)
9. 6-well plates
10. Sodium azide.
11. Hydrogen peroxide solution 30%(w/w)
12. Polyclonal D5R antibody
13. Biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody
14. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin
15. 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (DAB)
16. Osmium tetroxyde (OsSO_4)

17. Petri dishes glass (44 x 12 mm)
18. 50%, 70%, 96%, and 100% ethanol
19. Uranyl acetate dehydrate
20. Acetone
21. Durcupan ACM (araldite base embedding agent for electron microscopy)
22. Oven incubator
23. Microscope slides
24. Plastic sheets
25. Dissecting scalpel blade
26. Embedding capsule
27. Ultramicrotome
28. Diamond knife
29. Microdissecting forceps
30. Nickel grids
31. Grid storage box
32. Lead citrate
33. Sodium hydroxide

3. Methods

3.1 Single-cell RT-PCR

3.1.1 Harvesting cell content

1. Patch neurons and then hold in a whole-cell configuration for 5-20 min. Assess electrical properties (e.g. burst competency, defined by spontaneous burst firing, plateau potentials, or post-inhibitory rebounds; *see Note 10*). Apply negative pressure through the pipette holder and maintain for at least 2 min, while the seal and access resistances are monitored. Stop aspiration immediately if the seal breaks. (*see Note 11*).
2. Withdraw quickly the pipette from the slice; expel its contents into an RNase-free microcentrifuge tube and immediately place it in a -80 °C freezer (*see Note 12*).

3.1.2 Single-neuron RT-PCR procedure

1. Perform reverse transcription using protocols similar to those previously described (**33,34**). Like Karagiannis and colleagues, we find that overnight incubation at 37°C

with reverse transcriptase is more efficient than one-hour incubation. The resulting reverse transcription product is kept at -80°C until used for PCR amplification (*see Note 13*).

2. Design the primers based on GenBank rat D1 and D5 receptor sequences (accession numbers M35077 and NM012768, respectively). Sense primers are D1R-for1: AAG-CAGCCTTCATCCTGATTAGC; D1R for2: GCATGGACTCTGTCTGTCCTTATA; D5R for1: CCATCCTCATCTCCTTCATCCCG; and D5R-for2: ACTCAATTGGCACAGAGACAAGG. Antisense primers are D1R-rev2: ACA-GAAGGGCACCATACAGTTTCG; D1R-rev3: GGAGCCAGCAGCACACAACACC; D5R-rev1: CAGGATGAAGAAAGGCAACCAGC; and D5R-rev3: TGCAGAAAGGAACCATACAGTTC (*see Note 14*). A two-stage amplification strategy is designed to detect the low-abundance dopamine receptor mRNAs (*see Note 15*).
3. In the first step, amplify 10 μl of a single-cell template cDNA in a 50 μl PCR reaction mixture, using 0.25 μM D1R and D5R-for1 and D5R-rev2 primers. Perform twenty cycles: 45 sec at 94°C , 45 sec at 60°C , and 60 sec at 72°C .
4. Then, use a 1 μl aliquot of this PCR product as a template for a second round of PCR amplification, with each pair of specific nested primers (for2 and rev3). Perform PCR amplification as described above, but using 35 cycles.
5. Sequence and analyse the PCR products on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

3.1.3 Controls

1. After harvesting the cell content of 3 neurons, fill a pipette as described in 3.1.1. Lower the pipette into the slice and withdraw it without attempting to seal a neuron. Process the pipette medium as described in 3.1.1 and use it as a control for possible contamination. If amplification products are detected, the preceding three harvests are discarded.
2. In addition, harvest and treat a 4th neuron in the same way as the others, omitting the reverse transcriptase. This serves as a control for possible nuclear genomic contamination. However, note that the dimension of a patch pipette tip makes harvesting of the nucleus very unlikely.

3. Also run a PCR control experiment, using water instead of cDNA.

Sc-RT PCR is very demanding, since all steps in harvesting are crucial. With the blind patch technique, approximately 1 in 2 neurons does not yield any amplification products, presumably as no significant cell content is harvested. We expect harvesting with a visualised set-up to be more productive. However, when scRT-PCR was used to define the expression profile of subthalamic neurons and harvesting performed on a visualised set-up, detectable levels of D2 or D3 receptor mRNA were found in 37 % and 20 % neurons, respectively, but not in all neurons, whereas quinpirole, a broad spectrum D2 receptor agonist, acted on virtually all neurons in the STN (14,15). This finding was attributed to the low abundance of mRNA encoding DARs in subthalamic neurons (14).

3.2 Cellular and subcellular D5R identification in the STN by immunohistochemistry

3.2.1 Immunohistochemistry for light microscopy

3.2.1.1 Tissue preparation

1. Deeply anaesthetize the rat with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and perfuse it transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS), followed by 4% paraformaldehyde (w/v) in PBS.

2. Remove the brain and postfix by immersion in the same fixative at 4°C for 2 h.

3. Cryoprotect the brain by incubating it in a 30% sucrose solution (w/v) in PBS until it sinks to the bottom of the recipient, usually after 72 h. Then, freeze it rapidly in dry ice.

4. Cut the brain with a freezing microtome to obtain coronal free-floating sections 30 µm thick. Store the sections in 0.02% sodium azide (w/v) in PBS at 4°C until required for immunohistochemistry. Under these conditions, it may be stored for several months.

3.2.1.2 Immunohistochemistry (see Note 16)

1. Quench the endogenous peroxidase activity of the tissue by incubating it with 3% hydrogen peroxide in PBS for 15 min (*see Note 17*).

2. Incubate with the D5R antibody diluted in 0.2 % Triton X-100 and 0.1% sodium azide in PBS at 4°C for 72 h (*see Note 18*).

3. Sequentially incubate for 1 h with biotinylated goat anti-rabbit IgG, followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin, both diluted in 0.2 % Triton X-100 in PBS (*see Note 19*).

4. Develop the peroxidase reaction with a fresh dilution of 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride, 0.03% nickel ammonium sulphate, and 0.01% H₂O₂ in PBS (*see Note 20*).

5. Stop the peroxidase reaction by transferring immunostained sections into fresh PBS.

6. Mount the immunostained sections on silanized glass slides and air-dry.

7. Dehydrate the sections by passing through a series of increasing ethanol concentrations (50%, 70%, 96%, and 100%) and clear with xylene.

8. Cover-slip with a mounting medium.

3.2.2 Immunohistochemistry for electron microscopy

3.2.2.1 Tissue preparation

1. Deeply anaesthetize the rat with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and perfuse it transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS), followed by 4% paraformaldehyde (w/v) and 0.1% glutaraldehyde in PBS.

2. Remove the brain and postfix by immersion in the same fixative at 4°C for 2 h.

3. Cut the brain with a vibratome to obtain coronal free-floating sections, 40-50 µm thick. Collect the sections in PBS and process immediately for immunohistochemistry.

3.2.2.2 Immunohistochemistry

Perform immunohistochemistry as described in section 3.2.1.2 but with the following modifications:

1. Do not include Triton X-100 in any buffer in order to preserve membrane structures.

2. Develop the peroxidase reaction using only 0.05% DAB and 0.01% H₂O₂ in PBS.

3. After the peroxidase reaction, wash the sections with PBS and postfix with 1% OsSO₄ in PBS for 1 h (*see Note 21*).

3.2.2.3 Resin embedding

1. Dehydrate the immunostained sections in ascending series of ethanol dilutions (50%, 70%, 96%, and 100%) for 40 min each, and then with 1% uranyl acetate in 70% ethanol, and, finally, with acetone (100%).

2. Embed the sections with 1:1 acetone:Durcupan ACM resin for 1 h and then overnight in Durcupan ACM resin. Alternatively, other araldite embedding agents may be used.

3. Mount sections on glass slides with additional Durcupan ACM resin and cover with plastic sheets to flatten them. Polymerize at 60°C for 48 h. After polymerization, remove the plastic sheets.

4. Select STN areas, cut out from the slides, and glue onto previously Durcupan-polymerised blocks.

5. Obtain ultrathin sections (50 nm) with an ultramicrotome (*see Note 22*). Collect the sections on nickel grids and contrast with 0.25% lead citrate in 0.1 M NaOH.

6. Examine with an electron microscope.

4. Conclusion

Patch clamp experiments together with scRT-PCR identification and immunohistochemistry have framed DA control of electrical activity of subthalamic neurons. However, there are a number of unresolved questions regarding DARs in the STN. The absence of functional D1R at post-synaptic sites in pacemaker, burst-incompetent neurons within the STN remains ambiguous. Evidence of the action of DARs on identified glutamatergic afferents of subthalamic neurons is also missing. It is not known whether DARs control the cortico-subthalamic, thalamo-subthalamic, or glutamatergic afferents from midbrain structures. Finally, a crucial question is that of possible changes in DAR expression and properties in persistent DA-depleted states. In any case, caution should be exercised in inferring conclusions on the basis of equating DA absence in normal animals and persistent DA-depleted states. As constitutive D5R activity appears to contribute to motor symptoms, determining whether the expression of D5R change in experimental models of Parkinson's disease and in humans is likely to result in a better understanding of the physiopathology of this disease.

There are also a number of unsolved issues but virtually no tools to investigate them. Numerous pharmacological tools are currently used to investigate the transduction pathways

of recombinant G-protein-coupled receptors expressed in heterologous systems, but few have been used and validated in neurons. Accordingly, knowledge of the DAR transduction pathways in subthalamic neurons is limited. It would be useful to have tools that do not cross the cell membrane and can be dissolved in pipette medium, and are thus capable of acting at the single-neuron level, to differentiate unambiguously between pre- and postsynaptic action sites. Such tools are also likely to be valuable for distinguishing functionally-different subthalamic neuron subpopulations. New tools should be designed with this capacity. ‘Uncoupling peptides’, modelled on the G-protein binding site(s) of D1R and D5R, are most urgently needed.

Wholly unresolved questions include possible synergistic actions of the various DARs and their heteromerization. Evidence from native cells and heterologous expression systems support the hypothesis that G protein-coupled receptors traffic and signal within higher-order complexes (35). Since D2R and D3R mRNAs were found in the same neurons (14), these receptors may assemble in heteromers at the membrane of the subthalamic neuron subpopulation co-expressing these two subtypes. Heteromerization of D5R and D2R may also occur, since D5R-D2R hetero-oligomers were found in HEK293T cells stably expressing tagged human D5 and D2 receptors (36). Furthermore, agonist-dependent, molecular cross-talk between D5R and GABA_A receptors was reported to underlie a co-directional decrease in GABA_A and D5R function (37). In addition, the disparity between D1R and D5R subcellular localization, as revealed by recombinant receptor studies (38), as well as the demonstration that D1R-NMDA complexes may be a source of NMDA receptors for lateral diffusion to the synapses (39), raise the intriguing question of the capacity of D5R to contribute to complexes in a similar way.

The lack of tools to investigate these questions is not only true for the STN but also for the other brain regions expressing more than one receptor subtype (e.g. *substantia nigra reticulata*, entorhinal cortex, hippocampus (40-42)).

Finally, a question critically relevant to physiology and physiopathology must be tackled in the future. To date, constant, high DA concentrations have been used in brain slices to investigate its action. It is highly unlikely that these concentrations mimic the tone of ambient DA in the STN. It is even more unlikely that they reflect the acute changes in DA that may occur when dopaminergic neurons fire in bursts. Fortunately, new tools may soon help to shed light on the possible roles of tonic and phasic DA in the STN. DAT-cre and TH-

cre mouse lines are already being used to express channelrhodopsins in *substantia nigra pars compacta* neurons using the Cre-Lox strategy (43-45). This should make it possible to answer the remaining questions regarding the affinity states of DARs (high affinity for D2-like receptors vs low affinity for D1-like receptors (2)) and their possible relative changes during tonic and phasic firing of DA neurons.

5. Notes

Note 1: Frontal, horizontal, sagittal, and parasagittal slices obtained from rats or mice, varying in age from 3 weeks to 2 months are routinely used.

Note 2: Note that comparing the action of 10-100 μM DA, using extracellular, single-unit, recordings, on the one hand, and whole-cell patch-clamp, on the other hand, have led to contrasting results: virtually all the subthalamic neurons increased their firing rate, whereas only 1 in 3 were responsive, respectively (23).

Note 3: It is often requested that the action of an agonist of receptors in one family is tested in the presence of an antagonist of receptors in the other family. We suggest conducting this experiment in 2 steps: pre-incubating the slices in an antagonist solution for a few minutes, followed by co-application of the antagonist together with the agonist.

Note 4: This experiment used the blind-patch method, thus obtaining recordings from subthalamic neurons deep in the slice, which required a patch pipette with a resistance of 10-12 MOhms. We recently recorded spontaneous burst firing and evoked bursts using the visualised patch method. We observed that using pipettes with a resistance below 10 MOhms, a usual condition in the visualised patch method, often led to run down of burst competency i.e. the attenuation, or even disappearance, of plateau potentials and rebound bursts in about 30 minutes, whereas all parameters (temperature, perfusion rate, composition of intrapipette and perfusion solutions) remained unchanged in the blind and visualised experiments. In the same way, dialysis of one or more intracellular components, necessary to maintain the transduction pathways of D1 receptor family, may be accentuated at low access resistances.

Note 5: To avoid possible drug-induced priming effects, a slice is perfused once with the agonist under study.

Note 6: In our experiments, successive applications of an agonist and antagonist to a brain slice did not always fully inhibit the action of the agonist. However, pre-incubation

or pre-perfusion of an antagonist alone plus co-application of antagonist and agonist was effective.

Note 7: D1R mutant mice die on weaning unless appropriate zoo technical measures are implemented to help them access sufficient food.

Note 8: No significant qualitative difference between mice and rats regarding the molecular parameters specifically targeted by DARs has yet been reported, but the type of animal model should be taken into account when comparing global responses, such as firing patterns or behaviours.

Note 9: Cis-(Z)-Flupenthixol is a neuroleptic. In order to inhibit any possible action *via* D2R, it was tested at 1 μ M in the continuous presence of raclopride (5 μ M) *in vitro* and its action compared to that of raclopride *in vivo*.

Note 10: Capillaries for pipettes are from a dedicated stock. Always wear gloves to handle them. Only pull 2-4 pipettes at a time; store them in a dedicated container. Fill pipettes with 10 μ l standard pipette medium from a freshly-opened (every day), dedicated, stock, using a sterile, plastic tuberculin (1 ml) syringe pulled to an appropriate diameter over a flame. Pass the silver filament in the pipette holder through a flame before and after each harvest. Apply a positive pressure to the pipette holder before lowering the pipette into the bath and do not remove until contact with a neuron is detected (as usual for standard patch clamping).

Note 11: Use a negative pressure provided by depressing a tuberculin connected to the pipette-holder suction tube by 0.1-0.2 ml.

Note 12: To empty the pipette, gently break the tip on the side of a RNase free microcentrifuge tube. The pipette medium is then forced into the microcentrifuge tube by applying a positive pressure to a tuberculin tightly connected to the pipette by a dedicated tubing connection. Perform reverse-transcription as soon as possible after harvesting.

Note 13: All the steps of the reverse-transcription enzymatic reaction must be performed in complete RNase-free conditions.

Note 14: “Primer-Blast” software may be used to find appropriate primers for any mRNA of interest (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). To avoid amplifying genomic DNA, it is necessary to design intron over spanning primers. However, this is not possible for the

intronless D1R and D5R (**46**). In these cases, a control without reverse transcription is suggested (see controls in 3.1.3).

Note 15: This strategy is of great interest for detecting mRNAs with low expression from single neurons. In addition, the use of 4 different specific primers greatly enhances the specificity of the amplification process. However, this strategy is not suited to obtaining quantitative data.

Note 16: All the steps were performed with gentle shaking.

Note 17: Wash with PBS between all the steps (3 times for 10 min each).

Note 18: Proper D5R antibody dilution is previously determined by testing various concentrations. Choose the highest antibody concentration which produces the most intense immunohistochemical staining without background. In the case of the polyclonal D5R antibody, this was 1:500. We routinely incubate D5R antibody previously pre-absorbed with the peptide used in its production as a negative control.

Note 19: Avoid using sodium azide in the horseradish peroxidase-conjugated streptavidin dilution buffer as it inhibits enzyme activity.

Note 20: DAB is carcinogenic to humans. When handling this chemical, avoid all contact and work with appropriate protection equipment. We prepare a 10x DAB stock solution in 0.05M Tris Buffer (pH 7.6), which is stored at -20°C in an appropriate volume for one reaction (aliquots of 500 µl). Nickel ammonium may be used to intensify the immunohistochemical signal.

Note 21: We prepare 4x stock solution by dissolving OsO₄ in distilled water, which takes a long time. Stock solution may be stored at -20°C for several months. OSO₄ is highly toxic.

Note 22: A pale gold to silver colour indicates that sections have the correct thickness.

6 Acknowledgments

We wish to thank the Regional Council of Aquitaine and Fondation de France who partly supported this work by grants 12006005 (FCAN scheme), and 2005013850 and 00016810, respectively. Financial support was also provided by CNRS and University of Bordeaux. D. Sibley (NINDS, Bethesda) and J. Drago (Monash University) allowed us to use the D5R and D1R mutant mice they engineered. J. Waddington (Royal College of

Surgeons, Dublin) donated the D5R mutant mice we used to generate a colony. L.F received a PhD fellowship from MRT.

7 References

1. Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *Journal of chemical neuroanatomy* 26 (4):317-330
2. Rice ME, Patel JC, Cragg SJ (2011) Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198:112-137. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.066
3. Smith Y, Kieval JZ (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in neurosciences* 23 (10 Suppl):S28-33
4. Cragg SJ, Baufreton J, Xue Y, Bolam JP, Bevan MD (2004) Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. *The European journal of neuroscience* 20 (7):1788-1802. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03629.x
5. Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F (2001) Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (23):9134-9141
6. Gonon FG (1988) Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* 24 (1):19-28
7. Rommelfanger KS, Wichmann T (2010) Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy* 4:139. doi:10.3389/fnana.2010.00139
8. Wilson CJ, Bevan MD (2011) Intrinsic dynamics and synaptic inputs control the activity patterns of subthalamic nucleus neurons in health and in Parkinson's disease. *Neuroscience* 198:54-68. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.049
9. Flores G, Liang JJ, Sierra A, Martinez-Fong D, Quirion R, Aceves J, Srivastava LK (1999) Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience* 91 (2):549-556
10. Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A (2003) D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (3):816-825
11. Svenningsson P, Le Moine C (2002) Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *The European journal of neuroscience* 15 (1):133-142
12. Baufreton J, Zhu ZT, Garret M, Bioulac B, Johnson SW, Taupignon AI (2005) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (13):1771-1777. doi:10.1096/fj.04-3401hyp
13. Loucif AJ, Woodhall GL, Sehirli US, Stanford IM (2008) Depolarisation and suppression of burst firing activity in the mouse subthalamic nucleus by dopamine D1/D5 receptor activation of a cyclic-nucleotide gated non-specific cation conductance. *Neuropharmacology* 55 (1):94-105. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.04.025

14. Ramanathan S, Tkatch T, Atherton JF, Wilson CJ, Bevan MD (2008) D2-like dopamine receptors modulate SKCa channel function in subthalamic nucleus neurons through inhibition of Cav2.2 channels. *Journal of neurophysiology* 99 (2):442-459. doi:10.1152/jn.00998.2007
15. Zhu ZT, Shen KZ, Johnson SW (2002) Pharmacological identification of inward current evoked by dopamine in rat subthalamic neurons in vitro. *Neuropharmacology* 42 (6):772-781
16. Shen KZ, Johnson SW (2000) Presynaptic dopamine D2 and muscarine M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *The Journal of physiology* 525 Pt 2:331-341
17. Baufreton J, Bevan MD (2008) D2-like dopamine receptor-mediated modulation of activity-dependent plasticity at GABAergic synapses in the subthalamic nucleus. *The Journal of physiology* 586 (8):2121-2142. doi:10.1113/jphysiol.2008.151118
18. Floran B, Floran L, Erlij D, Aceves J (2004) Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology* 46 (4):497-503. doi:10.1016/j.neuropharm.2003.10.004
19. Hallworth NE, Wilson CJ, Bevan MD (2003) Apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium channels, through their selective coupling to voltage-gated calcium channels, are critical determinants of the precision, pace, and pattern of action potential generation in rat subthalamic nucleus neurons in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (20):7525-7542
20. Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C (2006) Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140 (1):77-86. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.029
21. Bosch C, Maily P, Degos B, Deniau JM, Venance L (2012) Preservation of the hyperdirect pathway of basal ganglia in a rodent brain slice. *Neuroscience* 215:31-41. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.033
22. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 78 (1):189-225
23. Tofighy A, Abbott A, Centonze D, Cooper AJ, Noor E, Pearce SM, Puntis M, Stanford IM, Wigmore MA, Lacey MG (2003) Excitation by dopamine of rat subthalamic nucleus neurones in vitro—a direct action with unconventional pharmacology. *Neuroscience* 116 (1):157-166
24. Shen KZ, Zhu ZT, Munhall A, Johnson SW (2003) Dopamine receptor supersensitivity in rat subthalamus after 6-hydroxydopamine lesions. *The European journal of neuroscience* 18 (11):2967-2974
25. Drago J, Gerfen CR, Lachowicz JE, Steiner H, Hollon TR, Love PE, Ooi GT, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, et al. (1994) Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26):12564-12568
26. Hollon TR, Bek MJ, Lachowicz JE, Ariano MA, Mezey E, Ramachandran R, Wersinger SR, Soares-da-Silva P, Liu ZF, Grinberg A, Drago J, Young WS, 3rd, Westphal H, Jose PA, Sibley DR (2002) Mice lacking D5 dopamine receptors have increased sympathetic tone and are hypertensive. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (24):10801-10810
27. Tiberi M, Caron MG (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *The Journal of biological chemistry* 269 (45):27925-27931

28. Demchyshyn LL, McConkey F, Niznik HB (2000) Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *The Journal of biological chemistry* 275 (31):23446-23455. doi:10.1074/jbc.M000157200
29. D'Aoust JP, Tiberi M (2010) Role of the extracellular amino terminus and first membrane-spanning helix of dopamine D1 and D5 receptors in shaping ligand selectivity and efficacy. *Cellular signalling* 22 (1):106-116. doi:10.1016/j.cellsig.2009.09.020
30. Martin MW, Scott AW, Johnston DE, Jr., Griffin S, Luedtke RR (2001) Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells. *European journal of pharmacology* 420 (2-3):73-82
31. Chetrit J, Taupignon A, Froux L, Morin S, Bouali-Benazzouz R, Naudet F, Kadiri N, Gross CE, Bioulac B, Benazzouz A (2013) Inhibiting subthalamic D5 receptor constitutive activity alleviates abnormal electrical activity and reverses motor impairment in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (37):14840-14849. doi:10.1523/JNEUROSCI.0453-13.2013
32. Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100 (4):689-699
33. Christophe E, Roebuck A, Staiger JF, Lavery DJ, Charpak S, Audinat E (2002) Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons. *Journal of neurophysiology* 88 (3):1318-1327
34. Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B (2009) Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (11):3642-3659. doi:10.1523/JNEUROSCI.0058-09.2009
35. Smith NJ, Milligan G (2010) Allosterism at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacological reviews* 62 (4):701-725. doi:10.1124/pr.110.002667
36. So CH, Verma V, Alijaniam M, Cheng R, Rashid AJ, O'Dowd BF, George SR (2009) Calcium signaling by dopamine D5 receptor and D5-D2 receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that for dopamine D1-D2 receptor hetero-oligomers. *Molecular pharmacology* 75 (4):843-854. doi:10.1124/mol.108.051805
37. Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403 (6767):274-280. doi:10.1038/35002014
38. Kruusmagi M, Kumar S, Zelenin S, Brismar H, Aperia A, Scott L (2009) Functional differences between D(1) and D(5) revealed by high resolution imaging on live neurons. *Neuroscience* 164 (2):463-469. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.052
39. Ladepeche L, Dupuis JP, Bouchet D, Doudnikoff E, Yang L, Campagne Y, Bezard E, Hosy E, Groc L (2013) Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (44):18005-18010. doi:10.1073/pnas.1310145110
40. Zhou FW, Jin Y, Matta SG, Xu M, Zhou FM (2009) An ultra-short dopamine pathway regulates basal ganglia output. *The Journal of neuroscience : the official journal of the*

-
- Society for Neuroscience 29 (33):10424-10435. doi:10.1523/JNEUROSCI.4402-08.2009
41. Duan TT, Tan JW, Yuan Q, Cao J, Zhou QX, Xu L (2013) Acute ketamine induces hippocampal synaptic depression and spatial memory impairment through dopamine D1/D5 receptors. *Psychopharmacology* 228 (3):451-461. doi:10.1007/s00213-013-3048-2
 42. Medin T, Rinholm JE, Owe SG, Sagvolden T, Gjedde A, Storm-Mathisen J, Bergersen LH (2013) Low dopamine D5 receptor density in hippocampus in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuroscience* 242:11-20. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.036
 43. Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL (2012) Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490 (7419):262-266. doi:10.1038/nature11466
 44. Brown MT, Bellone C, Mamei M, Labouebe G, Bocklisch C, Balland B, Dahan L, Lujan R, Deisseroth K, Luscher C (2010) Drug-driven AMPA receptor redistribution mimicked by selective dopamine neuron stimulation. *PloS one* 5 (12):e15870. doi:10.1371/journal.pone.0015870
 45. Rossi MA, Sukharnikova T, Hayrapetyan VY, Yang L, Yin HH (2013) Operant self-stimulation of dopamine neurons in the substantia nigra. *PloS one* 8 (6):e65799. doi:10.1371/journal.pone.0065799
 46. Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* 63 (1):182-217. doi:10.1124/pr.110.002642

ANNEXE 3 : ARTICLE EN PREPARATION ET COMMUNICATIONS AFFICHEES

D. Suárez-Boomgaard, L. Froux, A. Taupignon, C. Miguelez, J. Baufreton, R. Roales-Buján, A. Valderrama-Carvajal, A. de la Calle, A. Rivera. *Morphine-induced morphological changes in substantia nigra and caudate putamen: role of the Mu opioid and D4 dopaminergic receptor interaction during this process*. Article en préparation.

Froux, L., Morin,S., Bioulac, B., Baufreton, J. Lanciego, J.L., Taupignon, A.I., *Synaptic transmission at cortico-subthalamic synapses*. Abstract 204.04, Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, 2013.

Froux, L., Morin,S., Baufreton J., Taupignon, A.I., *Synaptic transmission at cortico-subthalamic synapses*. Doctoral school retreat, Arcachon, France, 2014

Froux, L., Morin,S., Baufreton J., Taupignon, A.I., *Study of cortico-subthalamic synapse short-term plasticity using optogenetics*. Doctoral school retreat, Arcachon, France, 2013

Taupignon, A.I., Froux,L., Morin, S. Baufreton, J., *Properties of glutamatergic synapses in the subthalamic nucleus*. Abstract 183.07, Meeting of the Society for Neuroscience, New-Orleans, L, USA, 2012.

ANNEXE 4 : FORMATIONS EFFECTUEES PENDANT LA THESE

- Formation au logiciel de gestion de références bibliographiques End-Note (URFIST de Bordeaux)
- Formation au logiciel de dessin vectoriel Illustrator (URFIST de Bordeaux)
- Formation à la chirurgie sur la moelle épinière (injections de virus) dans le laboratoire du professeur Grégoire Courtine à l'EPFL de Lausanne (1 semaine, juin 2012)