



HAL
open science

Caractérisation de la transmission GABAergique dans le globus pallidus externe chez des modèles rongeurs des maladies de Parkinson et de Huntington

Marine Chazalon

► To cite this version:

Marine Chazalon. Caractérisation de la transmission GABAergique dans le globus pallidus externe chez des modèles rongeurs des maladies de Parkinson et de Huntington. Neurobiologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0310 . tel-01435922

HAL Id: tel-01435922

<https://theses.hal.science/tel-01435922>

Submitted on 16 Jan 2017

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 Santé
SPÉCIALITÉ Neurosciences

Par Marine CHAZALON

**Caractérisation de la transmission GABAergique dans le
globus pallidus externe chez des modèles rongeurs des
maladies de Parkinson et de Huntington**

Sous la direction du Dr Jérôme Baufreton

Présentée et soutenue publiquement le 18 Décembre 2015

Membres du jury :

M. OLIET, Stéphane
Mme LERESCHE, Nathalie
M. VENANCE, Laurent
Mme BEURRIER, Corinne
M. VOISIN, Daniel
M. BAUFRETON, Jérôme

Directeur de recherche, Univ. Bordeaux
Directrice de recherche, Univ. Pierre & Marie Curie
Directeur de recherche, Collège de France
Chargée de recherche CNRS, Univ. Marseille
Professeur des Universités, Univ. Bordeaux
Chargé de recherche, Univ. Bordeaux

Président
Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Dir. de thèse

Titre : Caractérisation de la transmission GABAergique dans le globus pallidus externe chez des modèles rongeurs des maladies de Parkinson et de Huntington

Résumé :

Les ganglions de la base (GB) sont un ensemble de noyaux sous-corticaux impliqués dans les fonctions motrices, mnésiques et cognitives. Le globus pallidus externe (GPe) est un noyau GABAergique, qui tient la place de structure relais entre le striatum et le noyau sous-thalamique au sein du réseau des GB. Les changements de mode et de fréquence de décharge des neurones du GPe sont connus pour être les signatures électrophysiologiques des maladies de Parkinson (MP) et de Huntington (MH). Dans la MP, où les concentrations de GABA extracellulaires sont anormalement élevées dans le GPe, il est admis que la voie striato-pallidale (STR-GPe) est hyperactive ce qui contribue à l'hypoactivité des neurones pallidiaux. A l'inverse dans la MH, il est admis que l'hyperactivité des neurones du GPe est due à la dégénérescence de la voie STR-GPe levant la principale influence inhibitrice du GPe. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces changements d'activité pallidale sont encore peu connus. Nous avons donc entrepris des expériences de biologie moléculaire, d'immunohistochimie et d'électrophysiologie sur tranches, afin de mieux caractériser l'origine des modifications de transmission GABAergique conduisant aux changements d'activité électrophysiologique des neurones du GPe dans ces deux pathologies à l'aide de modèles animaux. Mes principaux résultats montrent l'apparition d'une inhibition tonique dans les neurones du GPe due à un déficit de recapture du GABA dans la MP et une réduction précoce de la transmission synaptique GABAergique dans la MH. Ces résultats suggèrent que les altérations de la transmission GABAergique contribuent à la physiopathologie de la MP et la MH.

Mots clés : Globus pallidus externe ; patch-clamp ; transmission synaptique ; inhibition tonique ; récepteurs GABAA extrasynaptiques ; transporteurs du GABA ; maladie de Parkinson ; maladie de Huntington

Title : Investigation of GABAergic neurotransmission in the external globus pallidus in rodent models of Parkinson and huntington's diseases

Abstract :

The basal ganglia (BG) are a group of sub-cortical nuclei involved in motor, memory and cognitive functions. In the BG, the GABAergic external globus pallidus (GPe) holds a position of relay nucleus between the striatum (STR) and the subthalamic nucleus within the indirect pathway of the BG. Modifications of rate and pattern of activity of this nucleus are known to be the electrophysiological signatures of Parkinson's (PD) and Huntington's diseases (HD). In PD, hyperactivity of the striato-pallidal (STR-GPe) pathway is thought to be responsible for the increase of the extracellular GABAergic concentrations in the GPe and participate to the hypoactivity of pallidal neurons observed in experimental Parkinsonism. In contrast, during HD, it is recognized that the hyperactivity of GPe neurons is due to the degeneration of striato-pallidal neurons and thus to the reduction of the main source of pallidal GABAergic inhibition. However, the molecular mechanisms involved in these modifications of pallidal activity are not well characterized. Therefore, using PD and HD animal models, the 6-OHDA rodents and the R6-1 transgenic mice respectively, we have performed molecular biology, immunohistochemistry and electrophysiological *in vitro* experiments in order to better understand the origin of GABAergic transmission alterations leading to changes in electrophysiological activity of GPe neurons into these two pathologies. My main results show the apparition of a tonic GABAergic inhibition due to a deficit of GABA uptake in PD and a early stage reduction of GABAergic synaptic transmission in HD. Altogether, these results suggest that alterations of GABAergic transmission contribute to the pathophysiology of PD and HD.

Keywords : External globus pallidus ; patch-clamp ; synaptic transmission ; tonic inhibition ; extrasynaptic GABAA receptors ; GABA transporters; Parkinson's disease; Huntington's disease

Institut des Maladies Neurodégénératives (IMN),UMR CNRS 5293

146, Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Remerciements :

Je tiens en premier à remercier mon directeur de thèse, Jérôme Baufreton. J'ai rencontré une personne extraordinaire tant sur le plan professionnel qu'humain. Merci pour votre disponibilité, votre patience, votre altruisme et vos précieux conseils. J'ai énormément évolué et appris à vos côtés. Vous avez su trouver les mots pour me soutenir, me guider et m'encourager quand j'en ai eu besoins... (Environ 20 fois par jours) donc vraiment Merci beaucoup pour ces 3 ans de thèse!!! Je vous témoigne toute ma gratitude et mon admiration!

Je suis également reconnaissante à l'ensemble des membres du jury d'avoir bien voulu juger mon travail de thèse et me faire ainsi profiter de leur expertise:

Le Dr. Stéphane OLJET qui me fait l'honneur d'être président de mon jury.

Les Drs Laurent VENANCE et Nathalie LERESCHE pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse.

Les Drs Daniel VOISIN et Corinne BEURRIER pour avoir accepté d'être examinateurs.

Un énorme merci à tous.

Je tiens aussi à remercier le Dr Erwan BEZARD, directeur de l'Institut des Maladies Neurodégénératives pour son accueil au sein de son laboratoire.

Je remercie également les personnes avec lesquelles j'ai collaboré dans le cadre de ma thèse, Maurice Garret, Marc Bevan, Ana Sebastiao, Eric Boué-grabot et leur équipe.

D'autre part, j'ai eu l'immense satisfaction de travailler dans une équipe formidable: Anne, Morgane, Stéphanie, Lionel, Azzedine et M. Bioulac.

Un grand Merci à Cristina, Stéphanie et Audrey pour leur contribution à mon travail de thèse. De manière plus personnelle, nos longues conversations philosophiques sur les garçons m'ont fait prendre conscience et agir (parfois...) mais il en faudra d'autres pour que je sorte du monde des bisounours....

Anne et Morgane merci pour tous les services que vous m'avez gentiment rendus et d'avoir été mes mamans du labo qui se sont bien occupées de moi, en me faisant courir et manger même si oui il reste du travail je l'avoue... et Morgane vraiment merci pour ta précieuse relecture et ton aide logistique (et ce super muffin à la framboise qui me laissera un souvenir impérissable).

Azz... chef des thésards, Dieu du patch... je ne peux pas dire que j'ai tout appris grâce à toi car ... Jérôme reste le « number one » mais j'ai excellé dans la réalisation des solutions...

« team Baufreton ». Tu es une personne superbe qui respire la gentillesse et toujours présente pour les autres. Tu es excellent Merci à toi !

Dudu, merci pour les innombrables services que tu m'as rendu et d'être une oreille attentive qui sache me conseiller et m'épauler. Tout comme azzedine, j'ai rencontré une personne géniale avec qui je partage une profonde amitié.

Paul, je me souviendrais de ces Weekends passés au labo qui ont largement été plus agréables en ta présence.

Eric, tu m'as énormément fait rire et beaucoup de tes « running joke » resteront mémorables... sans les citer...

Merci également à : Karine, Estelle, Till, Caro, Youna, Margaux, Sylvia, Luana, Karine, Serge, à tous les membres du bâtiment I présents et passés durant ces trois ans, que j'ai eu la joie de connaître et avec qui j'ai eu le plaisir de partager tous ces souvenirs.

PS : Jérôme en particulier: Aussi... Merci d'avoir supporté mes humeurs changeantes, pas toujours faciles à gérer.

J'ai bien entendu une immense gratitude pour mes amis et ma famille. Mes repères... Mon noyau central : Elodie, Benjamin, Jean et Vincent que j'ai la chance d'avoir auprès de moi depuis de nombreuses années, avec qui je partage bien plus qu'une amitié. Merci d'être toujours là pour moi, pour m'écouter et surtout ne pas me juger (Enfin... Merci Elo pour ce point). Et ma famille, en particulier à Babeth que j'ai de nombreuses fois appelé durant mes moments de doute, parfois longtemps et tard... Merci beaucoup pour tes conseils. Mon coach Bruno... Attention à la prononciation recommence ! Merci d'avoir toujours répondu présent pour les entrainements successifs de mes présentations et bien avant que je sois en thèse...

Et surtout un mot tout particulier et tendre pour mes parents et mon frère Pierre, qui m'ont permis d'en être là aujourd'hui par leur soutien sans faille, leurs encouragements et leur détermination... notamment il y a 26 ans.... Je suis heureuse et chanceuse d'avoir des parents comme vous. Si quelque chose ne changera jamais c'est bien ça !

Sommaire :

Introduction :	1
I. Les ganglions de la base:	1
1. Description anatomique des ganglions de la base :	1
2. Fonctionnement physiologique des ganglions de la base	3
II. Les maladies neurodégénératives	6
1. Maladie de parkinson (MP)	6
A. Etiologie et Symptomatologie	6
B. Traitement.....	8
C. Fonctionnement pathologique des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson....	9
D. Modèles animaux de la maladie de Parkinson	10
2. Maladie de Huntington	12
A. Etiologie et Symptomatologie	12
B. Traitement.....	13
C. Fonctionnement pathologique des ganglions de la base dans la maladie de Huntington	13
D. Modèles animaux	14
III. Le globus pallidus externe	16
1. Définition et origine	16
2. Afférences	16
A. Afférences glutamatergiques	16
B. Afférences GABAergiques	20
C. Afférences dopaminergiques	21
D. Autres afférences	24
3. Diversité neuronale au sein du GPe	25
A. Origine embryonnaire	25
B. Diversité Morphologique et Neurochimique	26
C. Diversité structurale et efférences.....	28
D. Diversité électrophysiologique:	30
4. Fonctions du globus pallidus externe.....	36
A. Fonction du globus pallidus externe dans le mouvement	36
B. Autres fonctions du globus pallidus externe.....	39
IV. La transmission GABAergique	41
1. Métabolisme du GABA	41
2. Les récepteurs GABAergiques	42
A. Les récepteurs GABA _B	43

B.	Les récepteurs GABA _C	44
C.	Les récepteurs GABA _A	45
3.	Les transporteurs du GABA	63
A.	Définition	63
B.	Structure.....	64
C.	Sous-types de transporteurs GABAergiques	65
D.	Les transporteurs du GABA dans le GPe	66
E.	Modulation de l'activité des transporteurs du GABA par les neuromodulateurs	68
IV.	Gliotransmission.....	70
1.	Généralités	70
2.	Excitabilité astrocytaire	72
3.	Gliotransmission :.....	73
4.	Systèmes de libération de gliotransmetteurs	75
A.	La libération vésiculaire.....	75
B.	Libération de GABA par les transporteurs.....	76
C.	Canaux perméables au GABA: Les Bestrophines.....	77
5.	Gliotransmission et excitabilité neuronale.....	77
6.	Rôle des astrocytes dans la régulation de l'équilibre ionique.....	78
7.	Les transporteurs gliaux	79
8.	Astrocytes et physiopathologie.....	80
A.	Maladie de Huntington (MH)	81
B.	Maladie de Parkinson (MP)	82
V.	Modulation GABAergique du GPe.....	84
1.	Afférences GABAergiques	84
2.	Modulation GABAergique de l'activité électrophysiologique pallidale en condition contrôle.	85
3.	Altérations GABAergiques dans le GPe pendant la MP.....	86
A.	Augmentation des concentrations extracellulaires de GABA dans le globus pallidus dans la MP:.....	87
B.	Modification de la voie striato-pallidale dans la maladie de Parkinson.....	88
C.	Modifications d'origine pallidale.....	89
4.	Modifications GABAergiques dans le globus pallidus externe dans la maladie de Huntington	91
	Rationnel scientifique :	95
	Matériel et méthode :	98
I.	Animaux.....	98
1.	Souris transgéniques et recombinaison Cre-Lox.....	98

2.	Modèle rongeur de déplétion dopaminergique.....	100
A.	Mode d'action de la 6-OHDA.....	100
II.	Enregistrements électrophysiologiques sur des tranches fraîches de cerveau de rongeur ...	101
1.	Préparation des tranches	101
2.	Solutions.....	102
A.	Solutions extracellulaires	102
B.	Solutions intracellulaires	102
3.	Enregistrements électrophysiologiques.....	103
A.	La chambre d'enregistrement	103
B.	Préparation des électrodes de patch-clamp	103
C.	La technique du patch-clamp	104
D.	Pharmacologie.....	107
E.	Acquisition des données.....	107
F.	Analyse des données.....	108
G.	Mesure et Analyse de l'inhibition tonique	108
III.	Immunohistochimie	110
1.	Prélèvement et préparation des tissus	110
A.	Révélation de la tyrosine hydroxylase par réaction enzymatique	110
B.	Marquages immunohistochimiques de GAT-3 sur les astrocytes.....	111
C.	Identification immunohistochimique des populations neuronales du GPe.....	112
2.	Acquisitions d'images.....	113
3.	Analyses statistiques	113
	Résultats.....	115
	Résultats I : Origine de l'hypoactivité du GPe dans la maladie de Parkinson.	115
	Article 1	115
	Article 2	153
	Données complémentaires à l'article 2 :	177
	Résultats complémentaires à l'article 2 :	178
I.	Régulation de l'expression de GAT-3 à la membrane astrocytaire par la voie TRPA1.....	178
II.	Origine du GABA responsable de l'inhibition tonique dans le GPe.....	180
1.	Le GABA responsable de l'inhibition tonique dans le GPe n'a pas une origine vésiculaire	180
2.	Les bestrophines ne sont pas responsables de la libération gliale de GABA	182
3.	La voie des MAOB n'est pas impliquée dans la synthèse de GABA d'origine gliale.....	182
4.	L'intégrité du métabolisme astrocytaire est nécessaire à la régulation de l'inhibition tonique dans le GPe	183
III.	Contrôle dopaminergique de l'inhibition tonique pallidale	185

Discussion des résultats complémentaires:	187
I. Régulation de l'expression membranaire de GAT-3	187
II. Origine du GABA responsable de l'inhibition tonique dans le GPe:.....	188
1. Production et libération gliale de GABA :.....	188
III. Dopamine et inhibition tonique :	190
Résultats II : Modification de la transmission GABAergique au niveau du GPe dans la maladie de Huntington.....	192
Article 3	192
Discussion générale et Perspectives :	220
I. Origine de l'hypoactivité du GPe durant la MP:.....	220
1. Altérations intrinsèques	221
2. Modifications extrinsèques	222
3. L'inhibition tonique pallidale :.....	222
A. Découverte d'une inhibition tonique GABAergique dans le GPe en condition parkinsonienne :.....	222
II. Modifications GABAergiques dans le GPe chez les souris R6-1, modèle de la MH :.....	226
Bibliographie.....	231

Table des illustrations :

Figure 1: Les structures des Ganglions de la base et leurs interconnexions.	3
Figure 2: Représentation schématique du circuit des ganglions de la base.	5
Figure 3: Mésencéphale d'un sujet sain (gauche) et d'un patient atteint de la MP (droite).	6
Figure 4: Image récapitulative de la triade symptomatique motrice de la MP.	6
Figure 5: Corps de Lewy. Images de coupes histologiques montrant des inclusions eosinophiles (corps de Lewy) dans les neurones dopaminergiques de la SNC en dégénérescence	7
Figure 6: Gènes identifiés comme impliqués dans les formes familiales de la maladie de Parkinson (MP).	8
Figure 7: Fonctionnement normal et pathologique du réseau des GB conduisant au syndrome hypokinétique observé lors de la MP.	9
Figure 8: Fonctionnement normal et pathologique du réseau des GB conduisant au syndrome hyperkinétique observé lors de la MH.	14
Figure 9: Principaux modèles de souris génétique de la maladie de Huntington (MH) communément utilisés.	15
Figure 10: Représentation schématique des principales afférences et efférences des neurones du GPe.	25
Figure 11: Classification des neurones du GPe selon leurs origines embryonnaires distinctes.	26
Figure 12: Signature moléculaire des neurones prototypiques et arkyppallidaux.	28
Figure 13: Signature moléculaire et principales projections des neurones prototypiques et arkyppallidaux.	30
Figure 14: Propriétés électrophysiologiques <i>in vitro</i> des neurones prototypiques et arkyppallidaux du GPe.	33
Figure 15: Profils électrophysiologiques typiques d'un neurone « high frequency pauser » (HFP) et d'un neurone « low frequency burster » (LFP) décrits chez le singe.	34
Figure 16: Activité de décharge spontanée <i>in vivo</i> de neurones prototypiques et arkyppallidaux identifiés par leur profil moléculaire spécifique chez les rats témoins et 6-OHDA.	36
Figure 17: Exemples de traces électrophysiologiques représentant les différents changements d'activité des neurones prototypiques.	38
Figure 18: Métabolisme du GABA.	42
Figure 19: Schéma de la topographie classique d'une sous-unité de récepteur GABA _A	46
Figure 20: Structure générale d'un récepteur GABA _A pentamérique.	47
Figure 21: Localisation des sous-unités GABA _A en fonction des synapses STR-GPe et GPe-GPe.	48
Figure 22: Tableau récapitulatif de la localisation des sous-unités de récepteurs GABA _A détectées dans plusieurs régions des GB. Résultats issus d'études chez le rat, le singe et l'homme	49
Figure 23: Exemple schématisant une synapse inhibitrice et un courant post-synaptique inhibiteur (IPSC) dû à la libération massive et rapide de GABA dans la fente synaptique.	49
Figure 24: Exemple de récepteurs GABA _A extra-synaptiques.	51
Figure 25: Exemple d'un enregistrement électrophysiologique obtenu sur une cellule granulaire du gyrus denté de l'hippocampe.	53
Figure 26: Altération de la synapse tripartite au niveau des cellules granulaires du gyrus denté chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (5xFAD).	57
Figure 27: Représentation schématique d'un récepteur GABA _A avec ses différents sites allostériques sur lesquels agissent les substances pharmacologiques.	60

Figure 28: Structure typique d'un transporteur de la famille SLC6.	65
Figure 29: Localisation des transporteurs GAT-1 et GAT-3 dans le GPe chez le singe.....	67
Figure 30: Voie de synthèse de GABA à partir des putrescines.	75
Figure 31: Représentation des voies de transduction dépendantes des canaux TRPA1.	79
Figure 32: Réaction astrocytaire dans le striatum et le GPe (GP) d'animaux modèles et de patients atteints de la MP.	83
Figure 33: Résumé des différentes modifications des synapses GABAergiques dans le GPe présentes chez les modèles animaux de la MP.....	91
Figure 34: Méthodes pour mesurer le courant tonique.	109
Figure 35: Réduction de l'expression de GAT-3 dans les astrocytes du GPe après une déplétion en dopamine.	178
Figure 36: Modulation de l'inhibition tonique pallidale par les canaux TRPA1.	179
Figure 37: L'inhibition tonique pallidale n'a pas une origine vésiculaire.	181
Figure 38: Les canaux bestrophines ne sont pas responsables de la libération gliale de GABA.....	182
Figure 39: La voie de la monoamines oxydase B n'est pas impliquée dans la synthèse du GABA responsable de l'inhibition tonique pallidale.....	183
Figure 40: L'intégrité du métabolisme astrocytaire est nécessaire au contrôle efficace des concentrations de GABA extracellulaire et à la régulation du niveau d'inhibition tonique.	184
Figure 41: Le blocage du métabolisme astrocytaire associé au blocage des transporteurs augmente l'amplitude de l'inhibition tonique pallidale.	185
Figure 42: La dopamine ne réduit pas l'inhibition tonique pallidale.	186
Figure 43: Schéma récapitulatif des résultats obtenus (Article 1 et 2)	226

Introduction:

Introduction :

I. Les ganglions de la base:

1. Description anatomique des ganglions de la base :

Les ganglions de la base (GB) sont un ensemble de noyaux sous-corticaux impliqués dans les fonctions motrices, mnésiques et cognitives (Albin et al, 1989; Alexander & Crutcher, 1990; Packard & Knowlton, 2002). Concernant en particulier le comportement moteur, les GB sont impliqués dans plusieurs aspects tels que la sélection et l'initiation du mouvement mais aussi dans la suppression d'actions indésirables (Schmidt et al, 2013). Les GB sont composés de 4 noyaux hétérogènes interconnectés: le néostriatum (STR), le globus pallidus (interne et externe, GPi et GPe), la substance noire (compacte et réticulée, SNc et SNr) et le noyau sous thalamique (NST) (**Figure 1**). Ces noyaux ont des origines embryologiques différentes. Alors que le striatum est d'origine télencéphalique, le globus pallidus et le noyau sous thalamique sont d'origine diencephalique. La substance noire quant à elle est la plus grosse masse de cellules mésencéphaliques du réseau. De ce fait, ces différents noyaux ne sont pas composés des mêmes types neuronaux et ont, dès lors, des propriétés différentes. Ces noyaux sont considérés comme la partie dorsale des GB, principalement associée aux fonctions motrices volontaires et associatives (Albin et al, 1989; Alexander & Crutcher, 1990). La division ventrale des GB, qui est associée aux fonctions limbiques (Packard & Knowlton, 2002), est composée du noyau accubens, du pallidum ventral et de la partie médiale du NST et de la SN.

Le striatum est traditionnellement considéré comme la structure d'entrée des GB puisqu'il reçoit la majorité des afférences du réseau. Ces afférences proviennent du cortex cérébral, du thalamus intralaminaire, du noyau du raphé, de l'amygdale ainsi que de la substance noire compacte (Bolam et al, 2000). Il est divisé en deux parties chez les Vertébrés supérieurs, le putamen et le noyau caudé qui sont séparés par la capsule interne. Le striatum est principalement composé de neurones GABAergiques de projection appelés neurones épineux moyens ou medium spiny neurons en anglais (MSNs) (DiFiglia et al, 1980 ; Graveland et al, 1985b) (95% des neurones striataux chez les rongeurs, 75-80% chez les primates) ainsi que d'interneurones GABAergiques et cholinergiques dont le rôle est de moduler l'activité des MSNs (Kawaguchi et al, 1995 ; Koos & Tepper, 1999 ; Lin et al, 2004 ; Schulz et al, 2011; Tepper & Bolam, 2004). Bien que les MSNs aient des propriétés électrophysiologiques et morphologiques relativement similaires (Parent & Hazrati, 1995a),

ils sont subdivisés en deux groupes en fonction de leur identité neurochimique et des structures sur lesquelles ils projettent. Cette dichotomie striatale est à l'origine du modèle anatomo-fonctionnel proposé à la fin des années 1980 par Albin et collègues (Albin et al, 1989) permettant d'expliquer le fonctionnement des GB. Le premier groupe de MSNs est caractérisé par l'expression de récepteurs dopaminergiques D1, de la substance P et de la dynorphine et projette directement sur les structures de sortie du réseau qui sont le GPi et la SNr. Ce premier groupe neuronal constitue la voie directe des ganglions de la base. Le second groupe de MSNs exprime lui les récepteurs dopaminergiques de type D2, les récepteurs à l'adénosine A2A et de l'enképhaline et projette sur le GPe qui relaie l'information *via* le NST jusqu'aux structures de sortie. Il constitue l'origine de la voie indirecte des GB. Il est à noter que chez le singe, un faible pourcentage de MSNs co-exprime à la fois les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 mais une telle co-expression n'est pas retrouvée chez la souris (Bertran-Gonzalez et al, 2010; Nadjar et al, 2006). La majorité des afférences striatales proviennent du cortex cérébral puisque chaque cellule striatale reçoit des projections de plusieurs millions de cellules corticales (Bolam et al, 2000). Le striatum reçoit également une large proportion d'entrées du thalamus intralaminaire. De nature glutamatergique, ces entrées corticales et thalamiques représentent 85% de l'ensemble des synapses striatales. L'autre entrée majeure au niveau du striatum provient des neurones de la SNc, aussi nommée *locus niger*, qui synthétise et libère de la dopamine. Le fonctionnement optimal du réseau des GB est sous l'action de ce neuromodulateur. La dopamine a des effets opposés sur les MSNs striataux en fonction des récepteurs dopaminergiques qu'ils expriment (Calne et al, 1979 ; Stoof & Kebabian, 1984). Les MSNs de la voie directe qui possèdent les récepteurs métabotropiques D1 positivement couplés à adénylase cyclase (AC), vont être activés par l'action de la dopamine alors que ceux de la voie indirecte, possédant les récepteurs métabotropiques D2, négativement couplés à l'AC, vont être inhibés par l'action de la dopamine (Gerfen & Engber, 1992).

Le globus pallidus est composé de segments distincts, nommés chez les primates, globus pallidus externe (GPe) et globus pallidus interne (GPi). Le GPe et le GPi ont respectivement pour équivalent chez les rongeurs le globus pallidus (GP) et le noyau entopédonculaire (EP). Bien que composés tous deux principalement de neurones GABAergiques, ces deux segments n'ont pas les mêmes fonctions et projettent sur des structures distinctes. Le GPe constitue le premier noyau qui relaie l'information des neurones striataux de la voie indirecte et la distribue dans l'ensemble du réseau. Le GPi quant à lui est le principal noyau de sortie du réseau chez l'homme et envoie ses projections inhibitrices sur les noyaux moteurs du thalamus (les noyaux thalamiques ventrolatéraux et ventromédians) et sur le tronc cérébral (noyau pédonculopontin (PPN) et colliculus supérieur (CS)). Je reviendrai plus en détail sur le GPe dans le chapitre III de mon introduction.

La substance noire quant à elle est composée de la substance noire compacte (SNc) et de la substance noire réticulée (SNr). Ces deux parties ont des fonctions distinctes puisqu'elles sont composées de types neuronaux différents et ne modulent pas l'activité des mêmes noyaux. Alors que la SNc est composée des neurones dopaminergiques dont l'action majeure est de moduler les MSNs, la SNr est composée de neurones GABAergiques qui projettent sur les noyaux moteurs du thalamus ventrolatéraux (VL) et ventromédians (VM) mais aussi au niveau du tronc cérébral sur le noyau pédonculo-pontin (PPN) et au niveau du colliculus supérieur (CS) (Bolam et al, 2000).

Le noyau sous-thalamique est un petit noyau de forme ovoïde qui a la particularité d'être la seule structure glutamatergique des GB. Il projette à la fois sur les structures de sorties des GB, le GPi et la SNr pour augmenter leur tonus inhibiteur sur le thalamus moteur mais il renvoie également un rétrocontrôle positif sur le GPe qui aura pour action de stimuler son activité. Comme il reçoit une projection directe du cortex, le NST est à la fois un noyau relai de la voie indirecte et aussi une structure d'entrée des GB (Bolam et al, 2000).

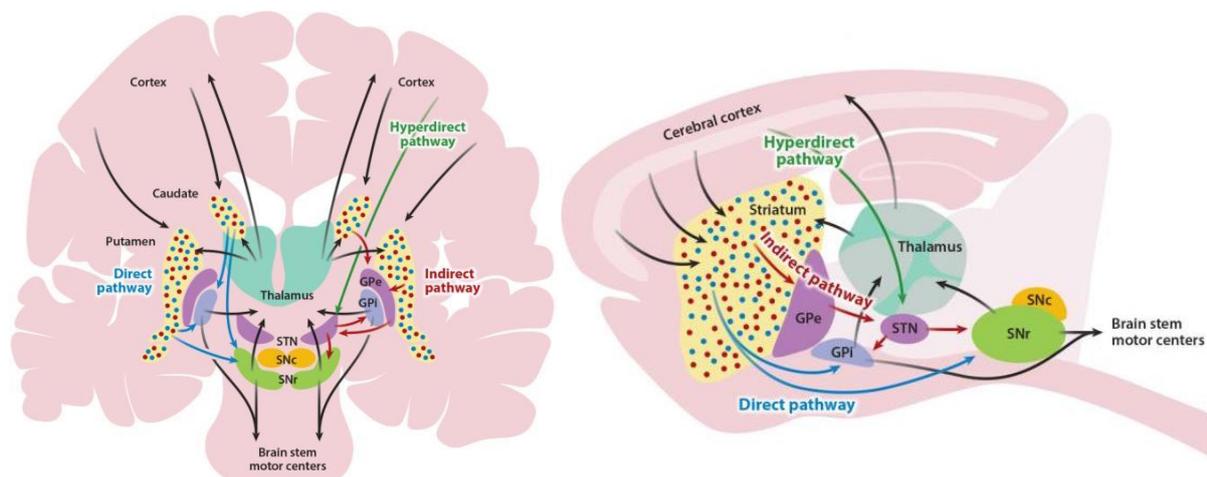


Figure 1: Les structures des Ganglions de la base et leurs interconnexions. Coupe coronale chez le primate à gauche et en coupe sagittale chez le rongeur à droite. GPe : Globus pallidus externe, GPi : Globus pallidus interne, NST : Noyau Sous-thalamique, SNc : Substance Noire compacte, SNr : Substance Noire réticulée (Nelson & Kreitzer, 2014).

2. Fonctionnement physiologique des ganglions de la base

Sur la base des données anatomiques, physiologiques et pharmacologiques obtenues chez l'animal et l'homme en post mortem, l'organisation anatomo-fonctionnelle des GB a été décrite pour la première fois par Albin (Albin et al, 1989) et est connue sous le nom de double circuit « direct-indirect ». Puis, Alexander et Crutcher (Alexander & Crutcher, 1990) ainsi que DeLong (DeLong, 1990) ont amélioré la description de ce circuit en proposant une organisation des GB en boucles parallèles impliquées dans le traitement de l'information à

plusieurs niveaux tels que la locomotion, la motivation et les émotions. Bien que les connaissances sur ce réseau aient largement progressées, le schéma des GB décrit précédemment est encore reconnu valide à l'heure actuelle. Il montre comment au sein des GB, les informations corticales sont traitées et transmises selon deux voies striatales parallèles. La mise en jeu de ces voies a des effets opposés sur le comportement moteur. La voie directe comprend les MSNs du striatum qui expriment des récepteurs dopaminergiques de type D1 (D1-MSN). Ces derniers projettent directement sur les neurones GABAergiques du GPi/SNr, ce qui entraîne la désinhibition du thalamus moteur et facilite ainsi l'exécution du mouvement. La voie indirecte comprend elle les MSNs qui possèdent des récepteurs dopaminergiques de type D2 à leur membrane (D2-MSN). Ils projettent majoritairement sur les neurones GABAergiques du GPe. Ces neurones en retour innervent indirectement les structures de sortie en contactant les neurones glutamatergiques du NST qui eux innervent les neurones GABAergiques du GPi/SNr. L'inhibition du GPe par les MSNs de la voie indirecte entraîne la désinhibition du NST qui va lui activer les neurones du GPi et de la SNr. Le thalamus moteur est donc inhibé, ce qui a pour conséquence une inhibition du mouvement. Les voies directe et indirecte ont donc une action opposée sur l'exécution du mouvement volontaire (**Figure 2**). Ainsi, la voie directe est aussi appelée voie « GO » puisqu'elle est à l'origine de l'initiation et de l'exécution du mouvement alors que la voie indirecte aussi appelée « NO GO » est impliquée dans la suppression des actions indésirables en compétition avec le programme moteur sélectionné (Frank et al, 2004, Schmidt, 2013 #3052).

Récemment, le principe d'organisation du réseau des GB, proposé initialement par Alexander et Crutcher, a été en partie validé par des expériences d'optogénétiques *in vivo* montrant que l'activation spécifique de la voie directe favorise, chez la souris normale, le mouvement volontaire alors que l'activation de la voie indirecte, l'inhibe (Kravitz et al, 2010). Cependant, *in vivo*, les MSNs des voies directe et indirecte sont conjointement activés lors d'un acte moteur, ce qui indique que les deux voies doivent être activées de manière concomitante pour la sélection d'un acte moteur approprié plutôt que de manière séquentielle (Cui et al, 2013 ; Surmeier, 2013). Par conséquent, le fonctionnement physiologique de ce réseau repose sur un équilibre entre l'activité de ces deux voies et toute perturbation de cet équilibre a pour conséquence les troubles moteurs observés dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie de parkinson (MP) ou la maladie de Huntington (MH).

Bien que le fonctionnement des GB repose sur l'antagonisme entre la voie directe et la voie indirecte il existe une autre voie nommée « voie hyperdirecte » reliant directement le cortex au NST. Avec la voie hyperdirecte, le NST se positionne comme une seconde structure d'entrée des informations corticales au niveau des GB (Nambu et al, 2002). Les projections corticales et celles du NST étant glutamatergiques, une activation de cette voie va

augmenter l'inhibition des structures de sortie des GB (SNr/GPi) sur le thalamus (Nambu et al, 2002). Pour résumer, les aires motrices cérébrales et le cortex préfrontal convergent vers le striatum qui focalise d'une part une inhibition sur le GPi/SNr aboutissant à la levée d'inhibition des sorties thalamo-corticales et des réponses du tronc cérébral. C'est la voie directe appelée « voie GO » facilitant le mouvement. D'autre part, le striatum en inhibant le GPe, va favoriser l'activation du GPi/SNr. C'est la voie indirecte appelée « No GO » inhibant le mouvement. Parallèlement, la voie hyperdirecte ou « voie STOP » projette une décharge excitatrice sur le NST qui renvoie vers les structures de sortie des GB (SNr/GPi) un large patron d'excitation aboutissant au renforcement de l'inhibition des sorties thalamocorticales et des réponses du tronc cérébral. La voie « GO », plus lente mais plus puissante aboutit à une levée spécifique de l'inhibition sur le mouvement alors que se maintient l'inhibition des autres mouvements indésirables. De ce fait, la voie « No GO » serait donc principalement impliquée dans une meilleure sélection de l'action et une inhibition accrue des actions concurrentes indésirables. La voie « STOP » aboutissant à l'arrêt d'une action déjà commencée (**Figure 2**).

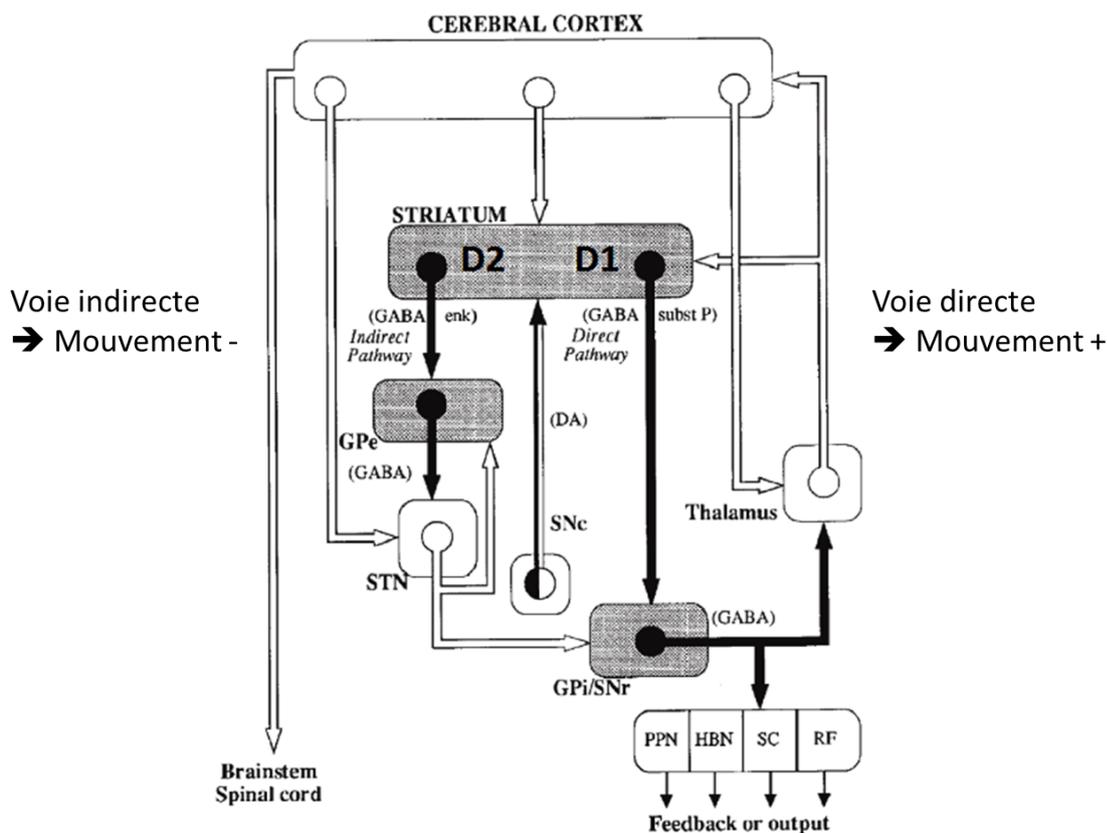


Figure 2: Représentation schématique du circuit des ganglions de la base. D2 : MSNs de la voie indirecte possédant à leur surface le récepteur dopaminergique D2, D1 : MSNs de la voie directe possédant à leur surface le récepteur dopaminergique D1, GPe : Globus pallidus externe, SNC : Substance Noire compacte, NST : Noyau Sous-thalamique, SNr : Substance Noire réticulée, EP : Noyau Entopédonculaire. Les rectangles gris représentent les structures GABAergiques alors que les rectangles blancs représentent les noyaux glutamatergiques. Dans ce schéma se distinguent les voies directe, indirecte et hyperdirecte. (Alexander & Crutcher, 1990).

II. *Les maladies neurodégénératives*

1. Maladie de parkinson (MP)

A. Etiologie et Symptomatologie

La **maladie de Parkinson (MP)** est une maladie neurodégénérative, qui touche 1.5% de la population de plus de 65 ans, et atteint autant les hommes que les femmes. Il s'agit de la pathologie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Décrite pour la première fois en 1817 par le Docteur James Parkinson, la cause première de la MP est la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (**Figure 3**).

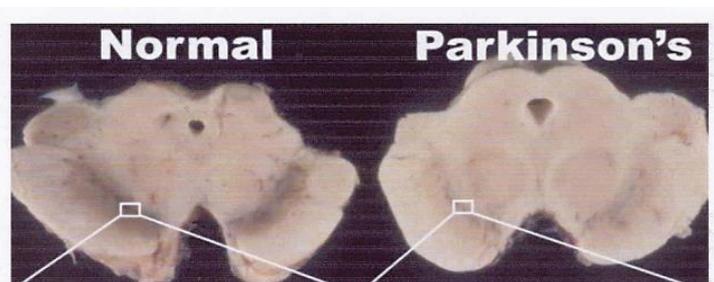


Figure 3: Mésencéphale d'un sujet sain (gauche) et d'un patient atteint de la MP (droite). Les neurones dopaminergiques de la SNc sont pigmentés en noir chez le sujet sain et disparaissent chez le patient parkinsonien (Frank et al, 2006).

La MP fait partie des syndromes hypokinétiques. Elle est caractérisée par une triade de symptômes moteurs qui sont, l'akinésie, ou la difficulté à initier un mouvement, l'hypertonie, ou rigidité posturale, et le tremblement de repos (**Figure 4**).



Figure 4: Image récapitulative de la triade symptomatique motrice de la MP. Dessins illustrant la posture en « statue de sel », typique du patient parkinsonien qui est causée par la triade des symptômes moteurs caractérisant la MP.

Lors de cette maladie, la première phase est asymptomatique. En effet quand apparaissent les premiers troubles moteurs, environ 60% des neurones dopaminergiques ont déjà disparus. Les symptômes moteurs s'aggravent avec l'augmentation de la perte neuronale qui peut atteindre jusqu'à 90% de ces neurones à la fin de la maladie. De plus avec l'évolution de la maladie, peuvent apparaître d'autres symptômes non moteurs tels que des troubles des fonctions exécutives, des épisodes dépressifs et une démence. Ces troubles sont notamment dus à la dégénérescence des systèmes non dopaminergiques du cerveau comprenant les systèmes sérotoninergique et noradrénergique. Une autre caractéristique de la maladie de Parkinson est la présence de corps de Lewy, (**Figure 5**) qui sont des inclusions intraneuronales éosinophiles de forme arrondie dans les neurones dopaminergiques de la SNc en dégénérescence (Frank et al, 2006). Les corps de Lewy sont des agrégats cytoplasmiques composés de nombreuses protéines incluant entre autres l'alpha-synucléine, la parkine et l'ubiquitine. Ces inclusions ont longtemps été considérées comme spécifiques de la MP, mais ont ensuite été mises en évidence dans différentes structures dans de nombreuses affections neurodégénératives telles que la démence à corps de Lewy.

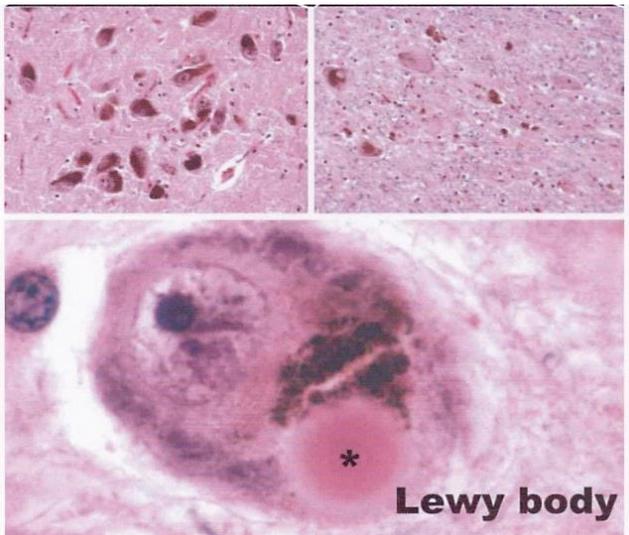


Figure 5: Corps de Lewy. Images de coupes histologiques montrant des inclusions éosinophiles (corps de Lewy) dans les neurones dopaminergiques de la SNc en dégénérescence (Frank et al, 2006)

L'étiologie de la maladie est encore inconnue mais on dénombre une majorité de cas sporadiques probablement dus à de multiples facteurs d'origine environnementale et génétique. Il existe également de rares formes familiales (environ 10% de patients) ayant une symptomatologie précoce. Dans ces formes de la maladie, une dizaine de gènes ont été identifiés parmi lesquels la famille de gènes PARK qui codent pour des protéines impliquées dans différentes fonctions importantes dans l'intégrité cellulaire (**Figure 6**).

Nom du gène	Locus	Chromosome	Caractéristiques
alpha-synucléine	PARK1	4	protéine présente dans les corps de Lewy
parkine	PARK2	6	enzyme impliquée dans le système ubiquitine-protéasome
UCH-L1	PARK5	4	enzyme impliquée dans le système ubiquitine-protéasome
PINK1	PARK6	1	enzyme mitochondriale
DJ-1	PARK7	1	protéine anti-oxydante
LRRK-2	PARK8	12	enzyme (kinase) au substrat inconnu
ATP13A2	PARK9	1	fonction inconnue
GIGYF2	PARK11	2	fonction inconnue

Figure 6: Gènes identifiés comme impliqués dans les formes familiales de la maladie de Parkinson (MP).

B. Traitement

Il n'existe pas de traitement curatif de la MP, mais seulement des thérapies qui visent à compenser la perte en dopamine. Les traitements sont médicamenteux et chirurgicaux. Au niveau pharmacologique, le traitement de référence de la MP est la Levodopa (L-DOPA), le précurseur de la dopamine pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique contrairement à la dopamine. La L-DOPA est le médicament le plus puissant pour l'amélioration des troubles moteurs.

Après une période de grande efficacité du traitement appelée « lune de miel » durant plusieurs années (environ de 2–6 ans), les patients commencent à ressentir des effets secondaires caractérisés par des mouvements anormaux appelés dyskinésies. Pour prévenir les effets secondaires dus à la prise chronique de L-DOPA, il existe également d'autres agonistes dopaminergiques (molécules mimant l'action de la dopamine). Ces diverses classes de médicaments constituent aujourd'hui l'élément central du traitement. Ces traitements visant à compenser la perte en dopamine peuvent également être prescrits avec des inhibiteurs de Monoamine oxydase (IMAO). Les IMAO sont des molécules qui bloquent la MAOB, l'enzyme responsable de la dégradation de la dopamine lors de sa recapture par les neurones. Malheureusement, l'association des IMAO à certains médicaments est risquée. Récemment, des recherches ont montré une implication d'autres systèmes que le système dopaminergique dans la maladie de parkinson et de nouveaux médicaments voient le jour tel que la nicotine qui affiche des effets prometteurs (Ross & Petrovitch, 2001; Thiriez et al, 2011). La stimulation haute fréquence (SHF) du NST est une alternative aux traitements médicamenteux qui provoque une amélioration spectaculaire des symptômes moteurs de la MP. Cette stratégie chirurgicale qui reste très invasive s'applique principalement chez des patients parkinsoniens résistants à la thérapie L-DOPA. Elle consiste à implanter des électrodes au niveau du NST du patient pour stimuler de manière chronique ce noyau à haute fréquence (autour de 130 Hz) et ainsi améliorer les principaux

symptômes moteurs tels que l'akinésie, la rigidité mais également le tremblement. Le mode d'action de la SHF est toujours mal compris de nos jours et les mécanismes d'action sont actuellement vivement débattus (Hammond et al, 2008).

C. Fonctionnement pathologique des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson

Le modèle des GB décrit par Alexander et Crutcher (Alexander & Crutcher, 1990) prédit que la réduction de la dopamine striatale suite à la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNc va provoquer un déséquilibre entre la voie directe et la voie indirecte au profit d'une hyperactivité de la voie indirecte, ce qui aura pour conséquence une inhibition du mouvement volontaire. En effet, les MSNs de la voie directe porteurs des récepteurs D1 ne vont plus être activés et devenir hypoactifs. A l'inverse, les MSNs de la voie indirecte porteurs des récepteurs D2 ne vont plus être inhibés par la dopamine et devenir hyperactifs. Ce déséquilibre d'excitabilité au niveau striatal va donc avoir pour conséquence une stimulation accrue des structures de sortie du réseau et donc une inhibition exacerbée du thalamus moteur. Il en résulte une faible activation des systèmes moteurs corticaux et des dysfonctionnements dans la sélection, l'initiation et l'exécution des mouvements à l'origine de l'hypokinésie (**Figure 7**).

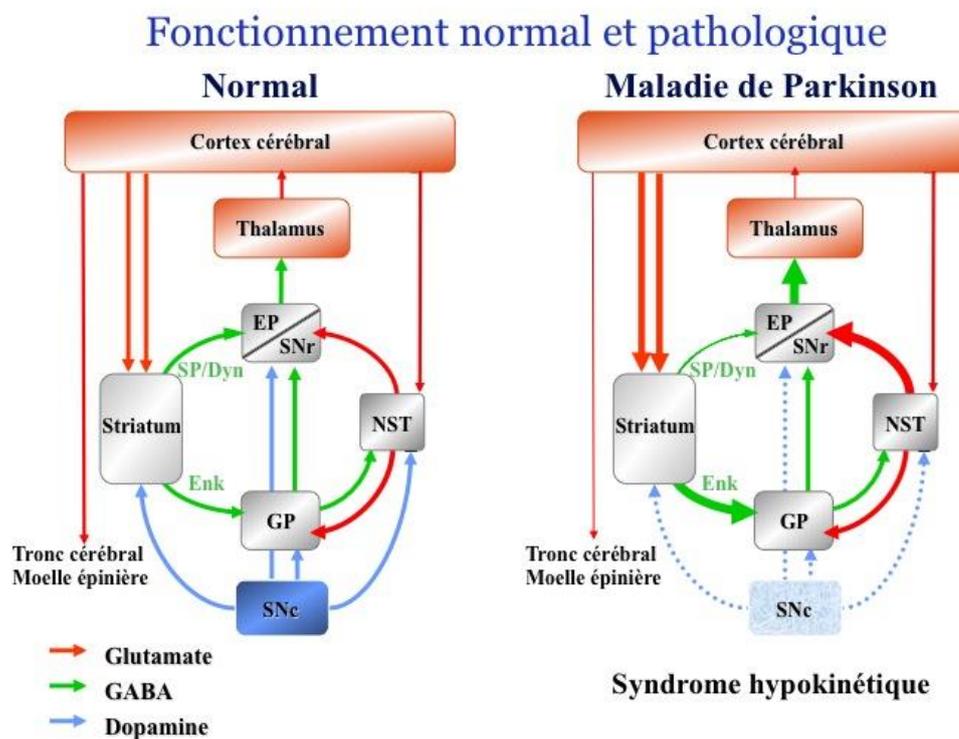


Figure 7 : Fonctionnement normal et pathologique du réseau des GB conduisant au syndrome hypokinétique observé lors de la MP.

D. Modèles animaux de la maladie de Parkinson

Il existe différents modèles animaux de la MP. Classiquement, ils peuvent être divisés en 2 catégories : les modèles pharmacologiques, utilisant l'injection de neurotoxines ou l'administration de drogue pour induire des symptômes parkinsoniens, et les modèles génétiques basés sur l'altération de protéines impliquées dans la MP. Concernant les modèles neurotoxiques, les animaux peuvent être rendus parkinsoniens de manière réversible par l'administration de réserpine ou d'halopéridole (antagoniste dopaminergique) ou de manière irréversible par injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA), de 1-méthyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), de roténone ou de paraquat. La réserpine, injectée par voie intraveineuse, se fixe sur les vésicules pré-synaptiques de stockage des monoamines, incluant le système dopaminergique, et provoque une profonde déplétion de la neurotransmission. Ces animaux « réserpinisés » développent une rigidité posturale et une lenteur dans l'exécution de leurs mouvements (Carlsson et al, 1957), des symptômes communément associés à la MP. De manière intéressante, la L-DOPA est capable de reverser les symptômes associés à l'administration de réserpine (Carlsson, 1959), ce qui a conforté l'implication du système dopaminergique dans la symptomatologie associée à la MP. En raison du caractère aigu de ce modèle « réserpine » ainsi que de l'absence de dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, les modèles de lésion irréversible sont plus largement utilisés pour étudier la physiopathologie de la MP. Les modèles les plus utilisés sont les rongeurs et les singes présentant des signes parkinsoniens par injection de 6-OHDA et de 1-méthyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), respectivement. Des caractéristiques communes à tous ces modèles, sont la capacité de ces neurotoxines à produire du stress oxydatif (radicaux libres réactifs) et à causer la mort des neurones dopaminergiques, provoquant de manière artificielle la dégénérescence neuronale observée dans la MP. D'autre part, bien que dans la majorité des cas, la MP est de forme sporadique dont l'origine est inconnue, il a été établi dans 10% des cas que la MP pouvait provenir de causes génétiques dues à la mutation de protéines telles que l' α -synucléine, l'UCHL1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1), la parkine, LRKK2 (leucine-rich repeat kinase 2) ou encore PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1). L'identification de ces différentes mutations génétiques a conduit au développement de modèles génétiques de la MP (Dawson et al, 2010). Ces modèles sont importants dans la compréhension des mécanismes moléculaires spécifiques qui conduisent à la mort des neurones dopaminergiques. Récemment, de nouveaux modèles ont été développés par injection dans la SNc d'un vecteur viral contenant le gène de l' α -synucléine humaine (Decressac et al, 2012b). Ces modèles confèrent l'avantage d'une évolution progressive de la symptomatologie de la

maladie et de fait, reproduisent plus étroitement la pathologie humaine que les modèles neurotoxiques (Decressac et al, 2012a ; Decressac et al, 2012b).

Ayant utilisé le modèle rongeur traité à la 6-OHDA pendant ma thèse, je vais maintenant vous parler plus précisément de ce dernier.

L'injection de 6-OHDA est le modèle animal classiquement utilisé pour la destruction de la voie nigro-striatale (Schwartz & Huston, 1996). Bien que plusieurs espèces animales soient sensibles à la 6-OHDA, elle est le plus souvent utilisée chez le rat et la souris (Ungerstedt, 1968). Cette drogue a une haute affinité pour les transporteurs dopaminergiques (DAT) et noradrénergiques (NET) (Sachs & Jonsson, 1975), c'est pourquoi elle est utilisée avec une injection intrapéritonéale de désipramine (un inhibiteur de recapture des NET) dans le but de préserver les neurones noradrénergiques de la lésion. Bien que la structure de la 6-OHDA soit similaire à celle de la dopamine, la présence d'un groupe hydroxyde supplémentaire la rend toxique pour les neurones dopaminergiques car elle entraîne la production de radicaux libres (ROS) et de quinones (Cohen, 1984) qui peuvent engendrer une inflammation dans le cerveau. La 6-OHDA est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique. C'est pourquoi, il est nécessaire de réaliser une injection intracérébrale soit au niveau de la SNc, soit au niveau du faisceau médian du télencéphale (FMT) ou dans le striatum (Perese et al, 1989). Le plus souvent les injections de 6-OHDA sont réalisées dans le FMT. Par le FMT, transite tout le faisceau de fibres dopaminergiques de la voie nigro-striatale. L'injection de 6-OHDA dans cette structure confère donc l'avantage d'une destruction complète de cette voie. Cependant en entraînant la dégénérescence de l'ensemble des neurones DA (SNc et VTA), cette lésion ne sera pas spécifique du système moteur.

Ainsi, l'avantage de l'injection intra-striatale est la spécificité de la déplétion en DA. En effet, le striatum étant organisé de manière somatotopique, une injection ciblée dans la région dorso-latérale va entraîner une déplétion dopaminergique de la région motrice sans affecter les autres fonctions striatales. Cependant, le striatum étant beaucoup plus volumineux, il est nécessaire de réaliser plusieurs points d'injections et d'utiliser une quantité plus importante de 6-OHDA. Le degré de déplétion dopaminergique dépend de la quantité de drogue injectée, du site d'injection et de l'espèce animale manipulée. Le plus communément utilisé est une injection unilatérale dans le FMT dans le but de détruire l'ensemble des projections nigro-striatales dans un hémisphère cérébral. Le modèle de lésion bilatérale entraîne des symptômes très sévères et donne lieu à plus de mortalité (Ungerstedt, 1971) c'est pourquoi on lui préfère le modèle unilatéral. De plus, le côté non lésé peut ainsi servir de contrôle suite au marquage immunohistochimique contre la tyrosine hydroxylase (TH) permettant de quantifier la mort des neurones dopaminergiques suite à la lésion. Cette déplétion

dopaminergique est visualisable et quantifiable par la perte de marquage TH suite à la dégénérescence des terminaisons nigrales TH-positives dans le striatum. Pourtant, bien que les animaux présentent une déplétion dopaminergique, la mort des neurones dopaminergiques de la SNc et des déficits moteurs, ces modèles ne présentent pas toutes les caractéristiques moléculaires et comportementales de la MP. Par exemple, ces animaux ne présentent pas d'agrégats protéiques ou d'inclusions à corps de Lewy comme nous pouvons l'observer au niveau du mésencéphale des patients atteints de la MP (Frank et al, 2006). Malgré certaines limitations, l'injection intracérébrale de 6-OHDA a énormément contribué à comprendre la physiopathologie de la MP et reste le modèle de référence de cette pathologie.

2. Maladie de Huntington

A. Etiologie et Symptomatologie

La maladie de Huntington (MH) fut décrite pour la première fois par le Dr Georges Huntington (1850-1916) sous le nom de « chorée de Huntington ». Il s'agit d'une affection rare, neurodégénérative, d'origine génétique autosomale dominante dont le gène nommé « *IT15* » a été identifié depuis l'année 1993 sur le chromosome 4. Si l'un des deux parents est atteint, le risque d'être porteur du gène défectueux est de 50%. Les hommes et les femmes sont touchés de manière équivalente. Cette maladie entraîne une altération profonde et sévère des capacités physiques et intellectuelles qui surviennent généralement vers l'âge de 40-50 ans. Des formes juvéniles existent également où les premiers symptômes se déclarent vers l'âge de 15 ans. C'est une maladie chronique et évolutive dont la survie moyenne après le début des premiers symptômes est d'environ 15 ans. Au niveau cérébral, elle se traduit par une atrophie cérébrale due à une mort neuronale notamment des neurones striataux de la voie indirecte. Sur le plan clinique la maladie se traduit par le développement de symptômes moteurs tel que des mouvements involontaires, brusques et irréguliers, une démarche instable et une agitation globale. Sur les plans cognitif et émotionnel, on notera la perte du sens de l'orientation, des troubles de la mémoire, une impulsivité et une agressivité qui évoluent irrémédiablement vers la démence. Cette maladie est provoquée par une répétition anormale de tri-nucléotides CAG sur le gène de la protéine huntingtine (HTT). Le gène de la HTT peut contenir entre 1-35 répétitions de codons CAG sans que cela impacte la protéine alors que chez les patients atteints de la maladie de Huntington (MH), il y a plus de 40 répétitions. L'âge d'apparition ainsi que la sévérité de la maladie est dépendante du nombre de répétitions de codon CAG dans le gène de HTT (Andrew et al, 1993; Aylward et al, 1996; Telenius et al, 1993) qui conduit à l'expansion de la

queue N-terminale de polyglutamine (polyQ) de la protéine de HTT. Cela a pour conséquence une agglutination de la HTT dans les neurones formant des agrégats intranucléaires (Gutkunst et al, 1999) mais le lien entre ces agrégats et la mort neuronale n'est pas établi. La protéine HTT normale est une protéine ubiquitaire impliquée dans le transport intracellulaire, le transport vésiculaire, dans l'assemblage du cytosquelette, dans la transcription notamment de BDNF et dans l'ancrage des récepteurs NMDA à la surface membranaire. La protéine HTT-polyQ mutée pourrait continuer à interagir avec ses anciens partenaires ainsi qu'avec la protéine HTT normale et ainsi empêcher le bon fonctionnement cellulaire en les séquestrant dans les agrégats qu'elle forme lors de son agglutination.

B. Traitement

De nos jours, il existe un test sanguin permettant de détecter la présence du gène muté sur une personne à risque avant l'apparition des symptômes. Bien qu'à l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif de la MH, plusieurs stratégies thérapeutiques sont aujourd'hui utilisées pour soulager un grand nombre de ces symptômes. Au niveau médicamenteux, différents types de psychotropes comme « la Tétrabénazine » (un inhibiteur des transporteurs vésiculaires des monoamines), l'halopéridol (antagoniste des récepteurs dopaminergiques de la famille D2), le tiapride (antagoniste dopaminergique) ou encore la rispéridone (antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5HT2) sont proposés au malade, en fonction de ses symptômes.

Des voies de thérapie génique sont en cours d'exploration et d'expérimentation sur des animaux. Ces thérapies cherchent à intervenir très en amont du développement de la maladie, soit pour protéger la protéine altérée par la maladie de manière à ce qu'elle ne soit pas altérée (neuroprotection), soit en visant la « réparation » de la cellule altérée (réparation cellulaire). La stratégie qui semble la plus prometteuse actuellement est l'inhibition de la production de huntingtine par de l'ARN anti-sens. Des greffes de cellules souches embryonnaires ont également été réalisées dans le striatum de certains patients dans le but de combler la perte neuronale mais cette stratégie n'empêche pas l'évolution de la maladie à long terme.

C. Fonctionnement pathologique des ganglions de la base dans la maladie de Huntington

Dans la maladie de Huntington, la dégénérescence massive des neurones striataux conduit à un déséquilibre au sein du circuit des GB inverse à celui observé dans la maladie de Parkinson. En effet, il se produit une dégénérescence globale des MSNs striataux avec les

MSNs de la voie indirecte qui sont particulièrement touchés. Cela produit une hyperactivation du GPe (Starr et al, 2008) qui a pour conséquence une inactivation du NST. Il en résulte un déséquilibre en faveur de la voie directe des GB, et donc une hypoactivité des structures de sorties des GB (GPi/SNr) sur le thalamus moteur. Les mouvements sont donc désinhibés et complètement incontrôlables (**Figure 8**).

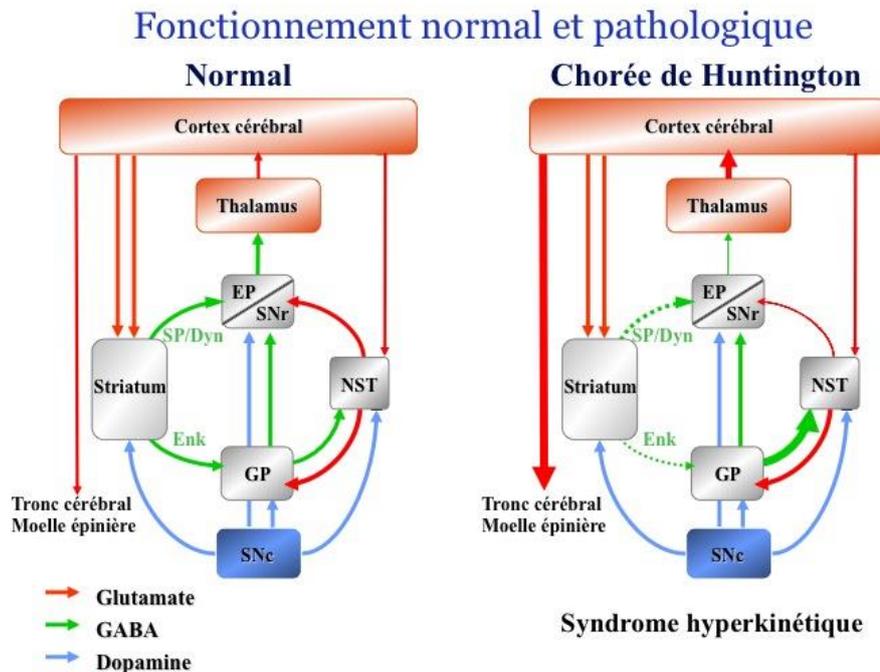


Figure 8 : Fonctionnement normal et pathologique du réseau des GB conduisant au syndrome hyperkinétique observé lors de la MH.

D. Modèles animaux

Le gène muté responsable de la maladie de MH est connu depuis les années 1993, ce qui a donné lieu à la création de modèles animaux transgéniques. Les premiers modèles transgéniques ont été établis chez la souris sous le nom de lignée R6 (Mangiarini et al, 1996). Les lignées R6 (R6/0, R6/1, R6/2, R6/5) possèdent l'exon 1 du gène *IT15* humain avec de longues répétitions de codon CAG variables selon les lignées (> 115 répétitions pour la lignée R6/1 et 145-190 CAG concernant la lignée R6/2). La lignée R6/2 est largement la plus utilisée mais ces souris présentent des déficits moteurs et d'apprentissages précoces et une mort prématurée ce qui rend difficile leur utilisation à différents stades de la maladie contrairement au modèle R6/1 qui possède moins de répétitions de codons CAG et donc une symptomatologie moins sévère. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie amino-terminale de la huntingtine mutée a révélé l'existence d'inclusion intranucléaires et agrégats cytosoliques de cette protéine (Lievens & Birman, 2003), tout comme ce qui est observé

dans le cerveau de patients MH. L'apparition de ces agrégats cytosoliques précède l'apparition des signes comportementaux chez les lignées R6, qui en outre ne présentent pas de dégénérescence neuronale. Ceci suggère que les troubles moteurs seraient dépendants d'un dysfonctionnement précoce des circuits neuronaux avec l'implication directe de ces inclusions dans la pathologie suivie d'une dégénérescence neuronale qui pourrait en découler. Deux autres lignées de souris transgéniques (les lignées HD et YAC) ont ensuite été développées avec l'intégralité de l'ADNc du gène *IT15* humain muté (Reddy et al, 1998, Hackam, 1999 #1513). Ces souris présentent une dégénérescence neuronale partielle (lignées HD) ou sélective des neurones striataux (lignées YAC) et des défauts comportementaux entre 4-8 mois. Il existe également des souris Knock-in où le gène de huntingtine murin est muté pour lui insérer une répétition de codon CAG mais ces souris bien que présentant des inclusions intracellulaires, ne présentent pas de mort neuronale ni de signes moteurs très tardifs (Lin et al, 2001, Menalled, 2002 #2996) (**Figure 9**). Des modèles établis chez la drosophile (Jackson et al, 1998, Kazantsev, 2002 #2997, Kazemi-Esfarjani, 2000 #2998) ont permis de grandes avancées des recherches dans ce domaine. Elles présentent une dégénérescence neuronale progressive et la formation d'agrégats intracellulaires de protéine de Huntingtine mutée ce qui est comparable aux caractéristiques pathologiques observées chez les patients et qui ne se retrouve pas dans la plupart des modèles murins.

Strain Name	Transgenic or Knockin	Gene Characteristics	Promoter	Repeat Length	Motor Symptom Onset	Lifespan
R6/2	Transgenic fragment	Exon 1 of human <i>HTT</i> gene	1 kb of Human <i>HTT</i>	~150	6 weeks	10–13 wks
R6/1	Transgenic fragment	Exon 1 of human <i>HTT</i> gene	1 kb of Human <i>HTT</i>	116	18 weeks	32–40 wks
N171-82Q	Transgenic fragment	First 171 AA of human <i>HTT</i> (exons 1, 2, part of 3)	<i>Pmp</i>	82	3 months	16–22 wks
Tg100	Transgenic fragment	First ~3 kb of human <i>HTT</i> cDNA	Rat <i>NSE</i>	100	3 months (nonspecific)	Normal
HD94	Transgenic fragment	Chimeric human/mouse <i>HTT</i> exon 1	TetO + tTA	94	4–8 weeks (claspings)	Normal
YAC72	Transgenic full-length	Full length human <i>HTT</i> gene	Human <i>HTT</i>	72	16 months	Normal
YAC128	Transgenic full-length	Full length human <i>HTT</i> gene	Human <i>HTT</i>	120	6 months	Normal
BACHD	Transgenic full-length	Full length human <i>HTT</i> gene (floxed exon 1)	Human <i>HTT</i>	97 (mixed)	2 months	Normal
HdhQ72, Q80	Knockin	Endogenous murine <i>Htt</i> gene, expanded CAG inserted	Mouse <i>Htt</i>	72,80	12 months	Normal
HdhQ111	Knockin	Endogenous murine <i>Htt</i> gene, chimeric human/mouse exon 1	Mouse <i>Htt</i>	109	24 months (gait)	Normal

Figure 9 : Principaux modèles de souris génétique de la maladie de Huntington (MH) communément utilisés (Crook & Housman, 2011)

III. *Le globus pallidus externe*

1. Définition et origine

Le globus pallidus est composé de segments distincts, nommés chez les primates, globus pallidus interne (GPi) dont les efférences se projettent sur la formation réticulaire et le thalamus (Noyau ventro-latéral) et le globus pallidus externe (GPe) dont les efférences se projettent sur l'ensemble des structures des GB, mais aussi sur le cortex. Le GPe est désigné GP chez les rongeurs alors que le GPi est l'équivalent du noyau entopédonculaire (EP). Par souci de simplicité, nous utiliserons le terme globus pallidus externe (GPe). Nous allons nous concentrer ici sur le GPe qui est le noyau des GB que j'ai étudié durant ma thèse. Le GPe est un noyau faisant partie de la voie indirecte des GB. Longtemps considéré comme un simple noyau relai composé d'une population homogène de neurones GABAergiques de projection, de récentes études montrent que le GPe présente en fait une grande diversité neuronale (Nobrega-Pereira et al, 2010, Mastro, 2014 #2841, Abdi, 2015 #1400, Dodson, 2015 #2033, Hernandez, 2015 #2842), et que ce noyau participe à de nombreuses fonctions cérébrales en plus de son rôle dans le contrôle du mouvement volontaire.

2. Afférences

A. Afférences glutamatergiques

A1 Localisation des récepteurs glutamatergiques dans le GPe

Le glutamate exerce ses actions à travers des récepteurs ionotropiques (iGluRs) et métabotropiques (mGluRs). Les iGluRs sont catégorisés en 3 types nommés en fonction de leur affinité pour leur agoniste spécifique : les récepteurs AMPA, NMDA et Kainate.

Le récepteur AMPA est un hétérotétramère formé de quatre sous-unités. Les sous-unités des récepteurs AMPA sont nommées GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Les récepteurs les plus abondants sont les formes GluA1/2 et GluA2/3. Concernant les récepteurs NMDA, il s'agit de tétramères, formés de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C ou GluN2D) ou GluN3 (GluN3A et 3B). Les sous-unités GluN1 sont obligatoires, tandis que les sous-unités GluN2 et GluN3 spécifient les propriétés électrophysiologiques des récepteurs NMDA telles que leur sensibilité au glutamate, leur perméabilité au calcium, l'inhibition par le magnésium (Pachernegg et al, 2012). Les sous-

unités GluN2 spécifient également leurs interactions avec les protéines intracellulaires. De manière générale dans les structures cérébrales, les récepteurs AMPA et NMDA sont exprimés à forte densité au niveau des synapses asymétriques (glutamatergiques) sur les neurones post-synaptiques, tout comme ce qui est connu dans le GPe au niveau des synapses subthalamo-pallidales (Bernard & Bolam, 1998) ce qui facilite leur rôle dans la médiation d'une transmission excitatrice rapide. Il y a une forte co-localisation des récepteurs AMPA et NMDA au niveau des synapses subthalamo-pallidales ce qui suggère que les réponses synaptiques excitatrices rapides au glutamate dans le GPe sont médiées par ces deux types de récepteurs de manière concomitante (Bernard & Bolam, 1998). Concernant les récepteurs Kainate (GluK), leur structure est tétramérique et composée des sous-unités GluK1-5. Leur expression dans le GPe de rat et de singe est située sur les éléments pré et post-synaptiques des synapses glutamatergiques et GABAergiques (Jin et al, 2006; Kane-Jackson & Smith, 2003). L'activation des récepteurs GluK dans le GPe de rat a différents effets sur la transmission glutamatergique. En post-synaptique, ils sont responsables d'EPSC (courants post-synaptiques excitateurs). Situés en pré-synaptique, ils réduisent la libération de glutamate en activant une voie de signalisation intracellulaire dépendante des protéines G (Jin et al, 2006).

Les mGluRs sont divisés en trois groupes distincts (mGluRs I-III) reliés à une protéine Gq ou Gi/o. Dans le GPe, la modulation de certains de ces récepteurs a des effets antiparkinsoniens ce qui a augmenté l'intérêt d'étudier leurs fonctions dans les GB. Les récepteurs mGluR I (mGluR1 et mGluR5) semblent fortement exprimés dans le GPe tant chez le singe que chez le rat (Berthele et al, 1998; Smith et al, 2000). Bien que la majorité du marquage soit extra-synaptique, une proportion (27-44%) est retrouvée au niveau des synapses striato-pallidales, ce qui pose la question du rôle de ces récepteurs au niveau de synapses connues comme GABAergiques (Hanson & Smith, 1999). Ces récepteurs sont également toujours présents au niveau de l'espace périssynaptique des synapses asymétriques subthalamo-pallidales (Smith et al, 2000). Leur activation dans le GPe stimule l'activité des neurones pallidaux en produisant une excitation de longue durée (Kaneda et al, 2007). Ces récepteurs semblent donc jouer un rôle important dans le contrôle de l'activité neuronale pallidale. Les récepteurs mGluR II sont également exprimés dans le GPe de rat au niveau des synapses glutamatergiques avec une localisation principalement présynaptique (Poisik et al, 2005). Des études ont montré que l'activation des récepteurs mGluR II a des effets antiparkinsoniens (Poisik et al, 2005) ce qui peut s'expliquer par le fait que leur activation va inhiber la transmission glutamatergique à travers une cascade de protéines de signalisation et donc réduire la libération de glutamate en provenance du NST sur le GPe. De la même façon, l'activation des récepteurs mGluRs III (mGluR4, 7, 8) réduit la

transmission synaptique GABAergique ainsi que glutamatergique dans le GPe (Matsui & Kita, 2003). Plus précisément, les récepteurs mGluR4 ont clairement été identifiés dans le GPe de singe principalement au niveau pré-synaptique (90%) avec une immunofluorescence majoritairement présente au niveau de synapses présentant des caractéristiques striato-pallidales bien que les terminaisons excitatrices soient également marquées (Bogenpohl et al, 2013). Enfin, des études suggèrent que la transmission striato-pallidale peut être inhibée à travers l'activation de ces récepteurs mGluR4 (Marino et al, 2003 ; Valenti et al, 2003).

A2 Modulation glutamatergique du GPe

Concernant la transmission glutamatergique ionotropique, des études *in vitro* ont indiqué que les neurones du GPe possèdent les récepteurs AMPA/kainate et NMDA qui peuvent être activés par une stimulation du NST (Hanson & Jaeger, 2002 ; Ogura & Kita, 2000). De plus, il a également été montré que l'application locale de NBQX (antagoniste des récepteurs AMPA/kainate) réduit fortement l'activité de décharge spontanée des neurones du GPe tout comme le CPP (antagoniste des récepteurs NMDA) (Kita et al, 2004 ; Yasukawa et al, 2004) bien que son effet soit moins probant que celui du NBQX (Kita et al, 2004).

Pour les récepteurs métabotropiques, la modulation de la transmission glutamatergique dans le GPe à travers l'utilisation d'agonistes des récepteurs mGluR, améliore les symptômes parkinsoniens chez les modèles animaux de la MP par une action sur l'activité électrique des neurones du GPe. D'une part, l'injection d'agoniste mGluR I chez le singe éveillé augmente l'activité de décharge des neurones pallidaux alors que leurs antagonistes spécifiques produisent l'effet inverse (Kaneda & Kita, 2005) ce qui suggère que l'effet excitateur du glutamate dans le GPe passe en partie par une action sur les mGluR I. De manière intéressante, chez le singe MPTP, il y a une réduction significative des récepteurs mGluR I dans les deux segments pallidaux (Kaneda et al, 2005). Ces résultats suggèrent la mise en place d'un mécanisme de compensation pour contrebalancer l'hyperactivité de la voie NST-GPe à l'état parkinsonien. D'autre part, il a été montré par des enregistrements extracellulaires réalisés sur le singe MPTP éveillé, que l'injection d'agoniste sélectif des récepteurs mGluR4 promeut la désynchronisation et réduit les pauses d'activité dans 80% des neurones du GPe ce qui a pour effet d'améliorer les symptômes parkinsoniens (Bogenpohl et al, 2013). Il a été montré que l'utilisation de tel agoniste réduit la transmission synaptique GABAergique et glutamatergique dans le GPe (Matsui & Kita, 2003). En agissant sur l'inhibition des IPSCs striatopallidales par des effets sur les récepteurs mGluR4 pré-synaptiques, l'utilisation de tels agonistes semble diminuer l'inhibition excessive exercée par le STR sur les neurones du GPe en conditions parkinsoniennes et ainsi restaurer l'équilibre du circuit moteur des GB expliquant leurs effets antiparkinsoniens (Valenti et al, 2003).

A3 Connexions et influences réciproques NST-GPe :

Le GPe reçoit des entrées glutamatergiques en provenance du NST et du thalamus. Néanmoins, il est considéré que la principale source de glutamate provient du NST qui est le seul noyau glutamatergique des GB (Albin et al, 1989; Kita & Kitai, 1987). Les axones subthalamo-pallidaux forment des contacts principalement sur les dendrites des neurones pallidaux pour former des synapses asymétriques (Kita & Kitai, 1987). Le NST projette également de manière massive sur le EP/GPi et la SNr (Deniau et al, 1978). En effet, les études de marquages intracellulaires (Falls et al, 1983) ainsi que d'activation antidromique (Deniau et al, 1978) indiquent que chez le rat, un seul neurone du NST envoie des collatérales d'axone au GP, au EP et à la SNr. Ce n'est pas le cas chez le primate où il a été montré que les neurones projetant sur le GPe et sur le GPi/SNr sont des populations distinctes spatialement au sein du NST (Parent & Hazrati, 1995b; Smith et al, 1990). Les projections entre le GPe et le NST sont réciproques, c'est-à-dire que beaucoup de neurones du NST qui reçoivent des entrées pallidales projettent en retour sur le GPe (Moriizumi et al, 1987; Okoyama et al, 1987). La relation étroite entre le GPe et le NST est un point essentiel du fonctionnement des GB. Comme les neurones du NST sont spontanément actifs quand l'animal est au repos, l'activité des neurones pallidaux, va être modifiée en permanence par les entrées glutamatergiques du NST dans ces conditions (Bergman et al, 1994). Il a aussi été montré chez le singe éveillé, qu'une injection locale de muscimol (agoniste GABAergique) dans le NST entraîne de profonds changements du patron de décharge des neurones du GPe. En effet, le blocage du NST diminue le taux de décharge des neurones pallidaux jusqu'à entraîner le silence total de l'activité de certains d'entre eux. Ces données prouvent que les neurones du GPe sont sous l'influence d'un tonus excitateur permanent en provenance du NST qui a un rôle important dans l'activité basale des neurones du GPe *in vivo*. De manière intéressante, quelques minutes après l'injection de muscimol dans le NST, l'activité pallidale commence à augmenter avec l'apparition de bouffées de potentiels d'action (PA) intercalées de périodes de pauses, où les neurones sont complètement silencieux (Nambu et al, 2000 ; Yasukawa et al, 2004). Ce réseau constituerait une boucle de rétrocontrôle positif de la voie « indirecte ». Il est largement admis que ce réseau GPe-NST forme une boucle excitation-inhibition (Bevan et al, 2002). Il est important de noter que l'hyperactivité du NST est une des signatures électrophysiologiques de la MP et que son inactivation chirurgicale améliore les symptômes parkinsoniens moteurs chez le singe MPTP (Bergman et al, 1990). Les données de la littérature *in vivo* suggèrent que l'activité rythmique physiologique du réseau GPe-NST est fortement dépendante de l'activité corticale puisque cette rythmicité est perdue lors d'une inactivation corticale (Magill et al, 2000). Il existe une étude *in vitro* suggérant que le réseau GPe-NST peut générer des oscillations de manière

autonome (Plenz & Kital, 1999). Le mécanisme supposé de ces oscillations repose d'une part sur les propriétés électrophysiologiques particulières et les entrées mutuelles des neurones du GPe et du NST (Bevan et al, 2002 ; Gatev et al, 2006). En revanche, d'autres études suggèrent que la voie cortico-sous-thalamique est nécessaire pour la genèse d'activités oscillantes au sein du réseau GPe-NST (Chu et al, 2015; Magill et al, 2001). En effet, les oscillations β aberrantes observées entre ces deux noyaux lors d'une déplétion dopaminergique sont en partie dues à une activité rythmique inappropriée des entrées corticales puisque l'inactivation de ce dernier rétablit en partie l'activité physiologique du réseau (Magill et al, 2001). Néanmoins, des travaux plus récents du groupe du Dr Magill en révélant l'existence de deux types neuronaux dans le GPe, les neurones prototypiques qui déchargent en antiphase avec le NST et les neurones arkypallidiaux qui déchargent en phase avec ce dernier en conditions parkinsoniennes, complexifie la vision de ce réseau (Mallet et al, 2012; Mallet et al, 2008a). Les altérations sous-tendant les oscillations β dépendraient à la fois des interactions réciproques entre le GPe et le NST et du différentiel de connectivité du NST avec chaque population pallidale ainsi que de l'inhibition latérale entre les neurones du GPe (Nevado-Holgado et al, 2014). La naissance de ces oscillations β persistantes entre ces deux noyaux est considérée comme une caractéristique d'états physiopathologiques (Magill et al, 2001; Mallet et al, 2008a).

B. Afférences GABAergiques

Je vais ici vous présenter brièvement les principales entrées GABAergiques du GPe car cette partie sera reprise en détail dans le chapitre « Modulation GABAergiques du GPe ». La principale source d'inhibition GABAergique du GPe provient du striatum (Hedreen & DeLong, 1991 ; Park et al, 1982 ; Shink & Smith, 1995 ; Wilson & Phelan, 1982) et principalement des MSNs de la voie indirecte, bien que quelques collatérales d'axones des MSN de la voie directe aient été décrites (Cazorla et al, 2014; Nadjar et al, 2006). Les longues dendrites des neurones pallidiaux sont complètement recouvertes de synapses. 80-90% de ces synapses proviennent du striatum alors qu'en comparaison seulement 5-10% proviennent du NST. Ces projections striatales forment une arborisation diffuse établissant des synapses symétriques avec les neurones pallidiaux sur toute la longueur de leurs dendrites (Difiglia et al, 1982 ; Parent & Hazrati, 1995a ; Parent & Hazrati, 1995b; Park et al, 1982 ; Smith et al, 1998). Classiquement, la large arborisation dendritique des neurones du GPe est orientée de manière perpendiculaire par rapport aux projections striatales (Yelnik et al, 1984). Il semblerait qu'un seul neurone striatal soit capable d'établir des connections avec plusieurs neurones pallidiaux (Percheron et al, 1984). Il existe une forte probabilité d'interaction entre un seul neurone afférent au GPe et les dendrites pallidales ce qui signifie que de nombreux

neurones pallidiaux partagent les mêmes afférences neuronales et donc reçoivent les mêmes informations simultanément. Il y a donc une convergence de l'information au niveau pallidal (Bergman et al, 1998).

La seconde source de GABA de ce noyau provient de la connectivité intrinsèque des neurones du GPe. En effet, la majorité de ces neurones possède des collatérales d'axones formant un vaste réseau intrapallidal (Falls et al, 1983 ; Francois et al, 1984 ; Kita & Kitai, 1994 ; Nambu & Llinas, 1997). Ces axones peuvent innervent des régions restreintes ou étendues du noyau et former des groupes de terminaisons denses sur les régions proximales d'un petit nombre de neurones (Kita & Kitai, 1994). Elles sont principalement localisées sur le corps cellulaire et notamment au niveau de la région périsomatique des neurones (Gross et al, 2011; Sadek et al, 2007). Ces collatérales intrapallidales représentent 10% des terminaisons GABAergiques en contact avec le corps cellulaire chez le singe (Shink & Smith, 1995). L'analyse de la disposition des terminaisons axonales de neurones individuels du GPe suggère que ce noyau pourrait être subdivisé en deux parties, avec la partie externe innervant la partie interne du GPe (Sadek et al, 2007). Cette observation indique un traitement des informations afférentes à l'intérieur même du GPe.

C. Afférences dopaminergiques

Bien que la SNc envoie ses projections dopaminergiques majoritairement sur le STR, elle envoie également des projections éparses sur le GPe. L'existence d'une projection nigro-pallidale a été démontrée chez le rongeur, les primates non humain ainsi que chez l'homme (Debeir et al, 2005; Eid & Parent, 2015 ; Jan et al, 2000). Une étude morphologique indique que l'innervation dopaminergique dans le GPe provient des collatérales des fibres nigro-striatales (Fallon & Moore, 1978). De plus, l'établissement de contacts synaptiques des terminaisons dopaminergiques sur les dendrites pallidales a été reporté chez le rat (Rodrigo et al, 1998) et le singe (Eid & Parent, 2015). Il apparaît que cette innervation dopaminergique pallidale est distribuée de manière régionalisée avec un gradient décroissant le long des axes antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral (Eid & Parent, 2015). De plus, une dénervation dopaminergique significative du GPe et du GPi a été observée chez les patients atteints de la MP (Jan et al, 2000 ; Rajput et al, 2008). Bien que les conséquences de cette dénervation restent mal connues sur le dysfonctionnement du GPe dans la MP, elle contribue certainement à l'apparition des symptômes moteurs. En effet, l'injection de 6-OHDA dans le GPe de rat mime les symptômes moteurs parkinsoniens et les perturbations de l'activité neuronale classiquement observées dans les GB dans ces conditions de perte

dopaminergique (Abedi et al, 2013 ; Jan et al, 2000). D'autre part, la DA et ses transporteurs sont retrouvés dans le GPe chez l'Homme et le rat (Ciliax et al, 1999 ; Coulter et al, 1995).

C1. Localisation des récepteurs dopaminergiques dans le GPe

Dans le GPe, les récepteurs dopaminergiques sont localisés en pré et post-synaptique. Les études suggèrent que les récepteurs dopaminergiques pré-synaptiques sont principalement des récepteurs de la famille D2 (récepteurs D2, D3 et D4) localisés sur les terminaisons des neurones striato-pallidaux (Gerfen et al, 1990; Parent & Smith, 1987). Il a été montré que l'activation de ces récepteurs inhibe la libération de GABA dans le GPe (Floran et al, 1997). Les récepteurs dopaminergiques de type D2 sont aussi retrouvés en post-synaptiques sur le corps cellulaire et les dendrites d'environ 40-50% des neurones pallidaux (Khan et al, 1998; Levey et al, 1993). De plus, supportant l'expression des récepteurs D2 en post-synaptique dans le GPe, les ARNm des récepteurs D2 et D3 sont retrouvés dans le GPe humain (Murray et al, 1994). Chez le rat, les ARNm des récepteurs D2 sont également présents dans les neurones pallidaux et particulièrement dans les neurones pallido-striataux (Hoover & Marshall, 2004; Marshall et al, 2001). De manière moins claire, il apparaît que des récepteurs de type D1 (récepteurs D1 et D5) sont principalement présents sur les terminaisons des neurones pré-synaptiques formant les synapses symétriques dans le GPe de rongeurs et dans une moindre mesure sur les synapses asymétriques (Kliem et al, 2009; Levey et al, 1993, Yung, 1995 #1225). Des récepteurs D5 ont aussi été identifiés sur le corps cellulaire des neurones du GPe chez les rongeurs et le singe (Ciliax et al, 2000 ; Khan et al, 2000). Nous pouvons ainsi constater que tous les récepteurs dopaminergiques ont été identifiés dans le GPe et ceci dans les différentes espèces étudiées suggérant un rôle majeur de la modulation dopaminergique dans le GPe.

C2. Modulation dopaminergique du GPe

De manière globale la dopamine aurait un effet excitateur sur les neurones pallidaux puisque l'application locale de dopamine ou d'agoniste non spécifique (apomorphine) des récepteurs dopaminergiques augmente l'activité de la majorité des neurones du GPe chez l'animal sain (Maslowski & Napier, 1991). Plus précisément, des études électrophysiologiques montrent que l'administration systémique d'agoniste des récepteurs dopaminergiques de type D1 augmente l'activité de décharge spontanée des neurones du GPe chez des rats contrôles. Cependant, une telle administration a l'effet inverse dans le GPe de rats rendus parkinsoniens (Zhang et al, 1998). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'administration d'agoniste des récepteurs de la famille D1 augmente la libération de GABA des synapses

striato-pallidales chez les rats 6-OHDA (Floran et al, 1990). De plus, des expériences de patch clamp montrent que l'activation de ces récepteurs augmente également la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs (sEPSCs) suggérant une facilitation pré-synaptique de la transmission glutamatergique dans le GPe (Hernandez et al, 2007). Concernant les récepteurs de type D2, il serait possible que l'activation de ces derniers inhibe l'activité électrique des neurones pallidaux puisque l'utilisation d'antagoniste de ces récepteurs favorise l'expression du gène c-fos dans le GPe, le striatum, la substance noire et le noyau entopedonculaire de rat (Billings & Marshall, 2003 ; Hauber & Lutz, 1999a). D'autres études menées chez le primate, montrent que l'injection locale de quinpirole (agoniste des récepteurs D2) inhibe l'activité électrique des neurones pallidaux et son antagoniste le sulpiride a l'effet opposé (DeLong, 1990; Hadipour-Niktarash et al, 2012). Ces effets semblent passer par la modulation de la transmission GABAergique. En effet, des études *in vitro* ont montré que l'agoniste des récepteurs D2 réduit la transmission GABAergique striato-pallidale en diminuant la libération de GABA (Cooper & Stanford, 2001). Des études complémentaires ont révélé que la dopamine supprimait l'inhibition GABAergique par une action synergique sur les récepteurs D2 pré-synaptiques et les récepteurs D4 post-synaptiques (Chuhma et al, 2011 ; Shin et al, 2003 ; Watanabe et al, 2009). Cependant, d'après les résultats obtenus par l'équipe du Dr Benazzouz chez le rat 6-OHDA anesthésié, l'injection locale de dopamine ou de quinpirole (un agoniste des RD2) augmente le taux de décharge de la majorité des neurones pallidaux (Mamad et al, 2015). Cette augmentation du taux de décharge est empêchée par le sulpiride (un antagoniste des RD2). Cependant, ni la dopamine, ni le quinpirole ne modifient le patron de décharge des neurones du GPe. Des données obtenues *in vivo* suggèrent également que la dopamine est directement capable de moduler la transmission excitatrice subthalamo-pallidale et inhibitrice striato-pallidale (An et al, 2004; Hadipour-Niktarash et al, 2012) par la présence de récepteurs D(2/3) pré-synaptiques et D4 post-synaptiques (Hernandez et al, 2006 ; Khan et al, 1998). Pour finir et relier le système dopaminergique aux altérations d'activité du GPe dans la MP, une lésion des neurones DA de la voie nigro-striatale entraîne une augmentation des niveaux d'expression des ARNm de l'enzyme responsable de la synthèse du GABA dans les neurones striataux de la voie indirecte suggérant une augmentation de l'activité striato-pallidale (Laprade & Soghomonian, 1997). De plus, le blocage pharmacologique des récepteurs D1/D2 dans le GPe induit des akinésies (Hauber & Lutz, 1999b). L'ensemble de ces données suggère une importance capitale de la DA dans le fonctionnement optimal du GPe. Il a de plus été montré que l'injection locale de DA dans le GPe pouvait également améliorer partiellement (50% des performances motrices restaurées) les symptômes moteurs chez les rats rendus parkinsoniens par une injection unilatérale de 6-OHDA dans le MFB (Galvan et al, 2001) suggérant un impact direct de la déplétion

dopaminergique pallidale dans les symptômes moteurs lors de la MP. Cependant, il est intéressant de noter qu'il a été montré chez le rat que la dopamine ne module pas directement le patron de décharge des neurones pallidaux mais uniquement leur fréquence de décharge (Mamad et al, 2015).

D. Autres afférences

Des expériences de marquage rétrograde ont permis de visualiser les différentes structures projetant sur le GPe. Ce type de traçage a permis de montrer une large innervation pallidale en provenance de neurones de la SN (dont 93% des neurones marqués sont dopaminergiques), du noyau du raphé (dont 25% des neurones marqués sont 5-HT) et une innervation du noyau pédonculopontin en faible proportion (PPN) (Charara & Parent, 1994; Eid et al, 2013). Outre les principales afférences du GPe que je viens de décrire, de nombreux autres neurotransmetteurs/neuromodulateurs participent à la régulation de l'activité de ce noyau. Plusieurs études rapportent que les enképhalines (Frey & Huffman, 1985), la morphine (Frey & Huffman, 1985), la neurotensine (Xue et al, 2009), l'histamine (Chen et al, 2005a), la sérotonine (Charara & Parent, 1994) et la substance P (Chen et al, 2004c ; Cui et al, 2007) modulent l'activité des neurones du GPe. Aux vues des nombreuses interactions entre les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques (5-HT) et les altérations de la transmission sérotoninergique (5-HT) qui ont été décrites dans les maladies de Parkinson et de Huntington, je vais vous décrire plus en détails ce système notamment dans le GPe.

Le GPe reçoit une abondante innervation sérotoninergique (5-HT) en provenance du noyau du raphé qui joue un rôle significatif sur le contrôle de l'activité pallidale autonome (Rav-Acha et al, 2008). En effet, la 5-HT peut inhiber la transmission synaptique excitatrice comme inhibitrice par une diminution de libération de neurotransmetteurs à travers les récepteurs 5-HT_{1B-D} pré-synaptiques, et moduler également l'excitabilité des neurones pallidaux par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ post-synaptiques (Hashimoto & Kita, 2008 ; Rav-Acha et al, 2008). D'autre part, une déplétion du système sérotoninergique produit une augmentation de l'activité des enzymes responsables de la synthèse de GABA (135% d'augmentation par rapport au niveau contrôle) dans les MSNs striataux de la voie indirecte sans qu'il ne soit observé de réels changements dans le GPe (Di Cara et al, 2003). Cette dénervation produit aussi une augmentation des concentrations de glutamate extracellulaires striatales ce qui pourrait contribuer à augmenter la transmission striato-pallidale plutôt que de l'inhiber (Di Cara et al, 2001). Ceci suggère que dans la MP, la perte des neurones 5-HT peut contribuer à l'hyperactivité striato-pallidale. De surcroît, une dépolarisation striatale induite chez les rats déplétés en dopamine entraîne une augmentation des concentrations

de GABA extracellulaires plus importantes comparées aux animaux contrôles (Di Cara et al, 2003). Ainsi, une diminution de la transmission 5-HT striatale peut également contribuer aux changements pathologiques de l'activité des MSNs GABAergiques striataux en augmentant leur réactivité à des stimuli dépolarisants. De façon intéressante, il a été montré lors de la dénervation dopaminergique, qu'une augmentation de l'innervation 5-HT pouvait se mettre en place dans le striatum et de manière simultanée dans le GPe après un traitement de L-DOPA. Ces données suggèrent que les neurones 5-HT compensent la dégénérescence de la voie nigro-striée en vue de synthétiser de la dopamine. Il a été suggéré qu'un tel phénomène pouvait sous-tendre les dyskinésies liées à ce traitement (Zeng et al, 2010). L'ensemble des principales afférences pallidales décrites précédemment est résumé dans la **Figure 10** ci-dessous.

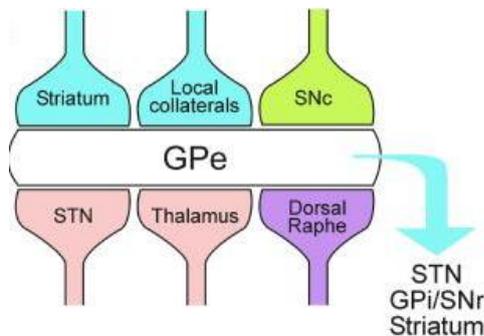


Figure 10: Représentation schématique des principales afférences et efférences des neurones du GPe. Les synapses glutamatergiques sont représentées en rose, GABAergiques en bleu, dopaminergiques en vert et sérotoninergiques en violet. Abréviations: GPe: globus pallidus externe; GPI: globus pallidus interne; SNc: substance noire part compacte; SNr: substance noire part réticulée; STN: noyau sous-thalamique (Galvan et al, 2006).

3. Diversité neuronale au sein du GPe

A. Origine embryonnaire

Un groupe de recherche, étudiant l'origine embryonnaire des neurones du GPe, a permis de mettre en évidence 5 classes distinctes de neurones pallidaux liées à leur origine embryonnaire et donc à leur profil d'expression de différents facteurs de transcription (**Figure 11**) (Nobrega-Pereira et al, 2010). Trois populations majoritaires se distinguent. En effet, leurs données révèlent que les neurones exprimant le facteur de transcription Nkx2.1 sont issus de l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) (~ 70% des neurones du GPe) et de l'aire pré-optique (POA). Cette population se divise en 2 groupes dont un exprimant en plus du facteur de transcription NKX2.1 la parvalbumine (PV), une protéine liant le Ca^{2+} à l'âge adulte. Le troisième groupe, originaire de l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) (~ 25% des neurones du GPe), est caractérisé par l'expression des facteurs de transcription Pax6 et Forkhead Box 2 (FoxP2) (Ferland et al, 2003 ; Nobrega-Pereira et al, 2010; Takahashi et al, 2003).

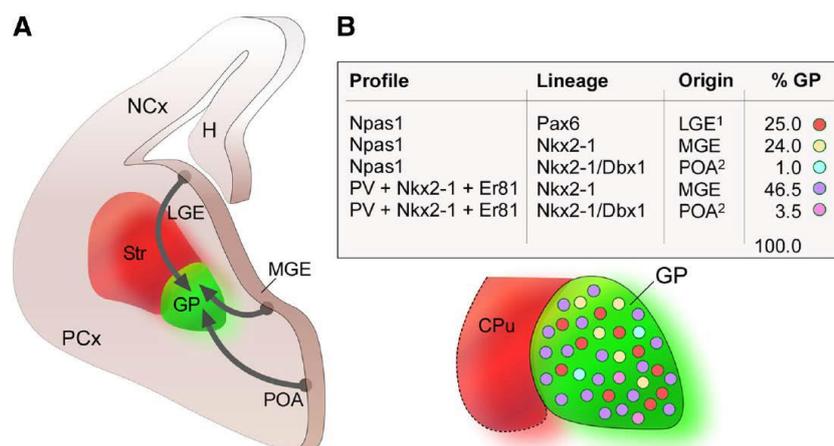


Figure 11 : Classification des neurones du GPe selon leurs origines embryonnaires distinctes. A. Représentation schématique d'une hémisection transversale montrant les origines embryonnaires des neurones du GPe. B. Tableau représentant la classification des neurones du GPe, en fonction de leur profil moléculaire et de leur origine embryonnaire. GP, globus pallidus externe ; H, Hippocampe ; CPu, noyau caudal du putamen ; PCx et NCx, cortex ; Str, striatum (Nobrega-Pereira et al, 2010).

Partant de ces connaissances, deux études récentes ont permis la mise en relation du profil moléculaire de ces neurones avec leur expression de marqueurs neurochimiques et leurs différentes cibles structurales. Ces groupes de recherche ont affiné la classification des neurones pallidiaux et établi que les neurones exprimant la PV expriment également le facteur de transcription NKX2.1. Ensuite, 30% de neurones dans le GPe sont positifs pour les enképhalines et expriment le facteur de transcription Forkhead Box 2 (FoxP2). Puis une faible proportion (environ 15%) de neurones sont négatifs pour la PV et la PPE mais expriment néanmoins le facteur de transcription NKX2.1 (Abdi et al, 2015 ; Dodson et al, 2015). Il existe moins de 1% de co-localisation entre les neurones exprimant le facteur de transcription NKX2.1 et ceux exprimant FoxP2 et le neuropeptide PPE. En fonction des facteurs neurochimiques et transcriptionnels qu'ils expriment, les neurones ne projettent pas sur les mêmes structures et n'ont pas les mêmes fonctions durant le mouvement (Abdi et al, 2015 ; Dodson et al, 2015).

B. Diversité Morphologique et Neurochimique

Bien que composé principalement de neurones GABAergiques (5% des neurones du GPe sont cholinergiques mais appartiennent au noyau basal de Meynert situé dans la partie ventrale du noyau) (Grove et al, 1986), les neurones pallidiaux ont des propriétés électrophysiologiques et neurochimiques distinctes ainsi que des cibles de projection différentes (Mallet et al, 2012 ; Saunders et al, 2015b) ; Abdi et al, 2015). Une étude pionnière suggérait l'existence de deux populations neuronales GABAergiques dans le GPe

chez le rat (Kita, 1994) basée sur l'expression de la PV. Cette étude a révélé l'existence d'une première population de neurones qui expriment la PV et qui représentent approximativement 2/3 des neurones pallidiaux. Le tiers restant de neurones n'exprimant pas la PV constituant le 2ème groupe. Dans ce même article, ils ont pu montrer que ces 2 groupes de neurones étaient également distinguables de par leur morphologie puisque en outre, le soma des neurones PV+ est en moyenne plus large que celui des PV-, et la forme et la localisation de leurs dendrites sont également différentes. En effet, en fonction de la morphologie dendritique, ces mêmes auteurs ont distingué également des neurones épineux et des neurones sans épines dendritiques (Kita & Kitai, 1994 ; Millhouse, 1986). Néanmoins, les deux types neuronaux reçoivent les mêmes entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices extrinsèques et sont connectés les uns aux autres par leurs collatérales d'axones de façon similaire (Kita, 1994). Puis d'autres études ont affiné la classification de ces neurones en fonction de l'expression de marqueurs neurochimiques. Des recherches menées chez le rat décrivent l'existence de 3 populations neuronales différenciables par l'expression mutuellement exclusive de protéines liant le calcium: la PV, la calbindine D-28k (CB) et la calretinine (CR) (Cooper & Stanford, 2002). Certains des neurones pallidiaux n'expriment aucune protéine liant le calcium. Les neurones exprimant la PV représentent 55% des neurones alors que ceux exprimant la CB uniquement 2% de l'ensemble des neurones. Les neurones CR sont rares (1% des neurones) et peuvent être assimilés à des interneurones (Cooper & Stanford, 2002). Une étude d'hybridation *in situ* dirigée contre la preproenkephaline combinée à des expériences d'immunohistochimie a permis d'établir qu'une population neuronale importante dans le GPe (42% des neurones) contient les ARNm de la preproenkephaline et que cette population innerve le striatum (Hoover & Marshall, 2002). Bien que la majorité de ces études s'accorde sur l'existence d'une population principale exprimant la PV, aucune classification claire n'avait été proposée. Ce n'est que grâce à des travaux très récents, combinant le marquage de protéines impliquées dans le développement avec celles classiquement utilisées chez le rongeur adulte, qu'une nouvelle classification a pu être établie. L'utilisation de souris transgéniques a permis de différencier deux populations majoritaires dans le GPe ayant des profils moléculaires, anatomiques et électrophysiologiques bien distincts. Il s'agit des neurones exprimant le facteur de transcription Lim homeobox 6 (Lhx6) et des neurones exprimant la PV (Mastro et al, 2014). Puis, une seconde étude a identifié les neurones exprimant le facteur de transcription Npas1 et les neurones exprimant la PV comme deux populations neuronales distinctes, n'ayant pas les mêmes cibles de projections (Hernandez et al, 2015). Pour finir, deux études (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015) ont clairement défini que les neurones dérivant de l'éminence ganglionnaire médiane sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Nkx2.1 et pour une grande majorité d'entre-eux également la PV et Lhx6

(Figure 12). Ces neurones ont été identifiés comme étant les « neurones prototypiques » décrits pour la première fois par Mallet et al (Mallet et al, 2012) *in vivo*. Une deuxième population neuronale dérivant de l'éminence ganglionnaire latérale/caudale est caractérisée par l'expression du facteur de transcription FoxP2, de la PPE et de Meis2, un autre facteur de transcription **(Figure 12)**. Cette population qui représente 25-28% des neurones du GPe correspond aux neurones arkyvallidiaux décrits par Mallet et al (Mallet et al, 2012) *in vivo*. Il est à noter que bien que NPas1 soit exprimé par les neurones arkyvallidiaux, ce dernier n'est pas un marqueur spécifique de cette population puisqu'il est aussi exprimé dans les neurones prototypiques.



Figure 12: Signature moléculaire des neurones prototypiques et arkyvallidiaux. Schéma résumant les deux types majoritaires de neurones GABAergiques dans le GPe de rat en respectant leur proportion. Les neurones prototypiques sont représentés par la zone verte et les neurones arkyvallidiaux par la zone bleue (Abdi et al, 2015).

C. Diversité structurale et efférences

Ces différents types neuronaux sont également distinguables par leurs projections axonales. La majorité des neurones pallidiaux sont des neurones de projections (Kita & Kitai, 1994) ayant des collatérales denses qui influencent l'activité des GB à plusieurs niveaux. Des études de marquage sur cellule unique montrent que ces neurones projettent sur le NST qui est sa principale cible, mais également sur le GPi/EP et la SNr (Bolam & Smith, 1992; Kincaid et al, 1991), et probablement aussi sur la SNc (Bevan et al, 1998; Kita & Kitai, 1994) et sur le noyau thalamique réticulaire (Cornwall et al, 1990). De plus, de ¼ à 1/3 des neurones du GPe chez le rongeur (Bevan et al, 1998) et plus de 30% de ces neurones chez le primate (Kita et al, 1999) renvoient des projections sur le striatum. Ces neurones innervent préférentiellement les interneurons GABAergiques striataux (Bevan et al, 1998). Plus précisément, leur diversité neurochimique est liée à leur cible de projections. En effet, les neurones doublement positifs pour le facteur de transcription NKX2.1 et la PV,

projetent presque exclusivement sur le NST. Ils sont maintenant connus sous le nom de « neurones prototypiques » (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015 ; Mallet et al, 2012). La proportion des neurones prototypiques NKX2.1⁺ n'exprimant pas la PV, quant à eux projetent à la fois sur le NST et le STR (**Figure 13**) (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015) et innervent préférentiellement les interneurons GABAergiques (Bevan et al, 1998). S'agissant des interneurons GABAergiques du striatum, il en existe une grande diversité, qui est différenciable par les protéines liant le calcium qu'ils expriment (Bolam et al, 2000). Il semblerait que les projections pallido-striatales envoyées par les neurones prototypiques NKX2.1⁺/PV⁻ soient préférentiellement localisées sur les interneurons GABAergiques PV⁺ et NOS du striatum. Les neurones arkyvallidiaux envoient quant à eux leurs projections exclusivement sur le STR où ils forment des contacts synaptiques à la fois sur les MSNs et tous les types d'interneurones (**Figure 13**) (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015 ; Mallet et al, 2012). L'innervation striatale par les neurones arkyvallidiaux est très dense puisque qu'un seul neurone arkyvallidial possède une arborisation axonale qui forme environ 10 000 boutons synaptiques dans le STR. Cette dichotomie structurale des neurones pallidiaux, bien que découverte chez les animaux parkinsoniens, a également été mise en évidence chez des rats et souris contrôles, ce qui suggère qu'elle n'est pas due à une réorganisation provoquée par la perte de dopamine (Abdi et al, 2015 ; Dodson et al, 2015). De ce fait, le GPe n'est pas un simple noyau relais comme il a pu être considéré dans le schéma Alexander et Crustcher mais plutôt un noyau intégrateur capable de moduler l'activité de l'ensemble des noyaux des GB. Le GPe projette aussi hors des GB (Chen et al, 2015b; Saunders et al, 2015b). En effet, deux études récentes ont mis en lumière l'existence d'une projection de nature GABAergique entre le GPe et le cortex et en particulier dans les couches profondes du cortex prémoteur frontal. Ces projections pallido-corticales ciblent en particulier les interneurons GABAergiques corticaux et en moindre mesure les cellules pyramidales. La nature de ces neurones pallido-corticaux n'est pas encore déterminée mais il est connu qu'ils reçoivent une dense innervation du striatum dorsal. Il a aussi été montré que les neurones du GPe projetent sur le noyau réticulaire du thalamus, suggérant que le GPe pourrait influencer directement la fonction motrice indépendamment des structures de sortie des GB (Divac et al, 1987 ; Haber et al, 1985 ; Shammah-Lagnado et al, 1996 ; Smith et al, 1998). L'ensemble de ces résultats amène à penser que le GPe est capable de par ses projections de moduler directement différents noyaux des GB mais également des structures extrinsèques à ce réseau telle que le cortex moteur, appuyant l'idée d'une importance capitale de ce noyau dans différents aspects comportementaux en conditions normales et pathologiques.

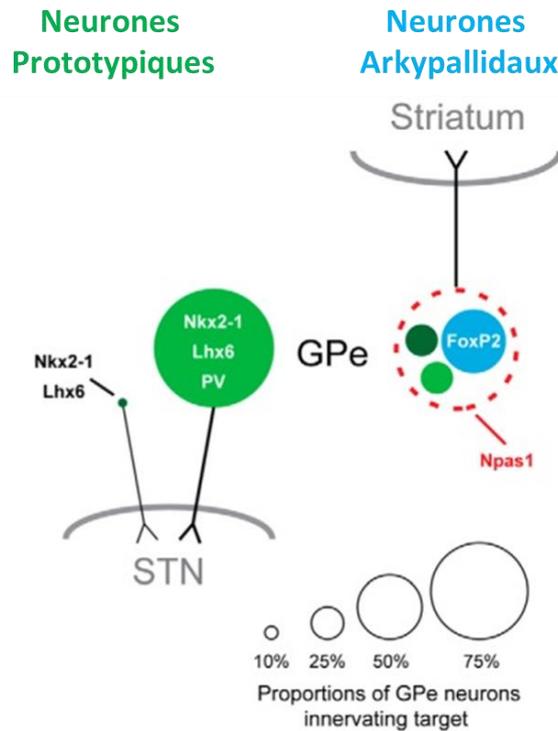


Figure 13: Signature moléculaire et principales projections des neurones prototypiques et arky pallidaux. Schéma résumant les deux types cellulaires majeurs dans le GPe innervant le NST à gauche (neurones prototypiques) et le striatum dorsal à droite (neurones arky pallidaux).

D. Diversité électrophysiologique:

D1. Propriétés électrophysiologiques *in vitro* en condition physiologique

Les expériences *in vitro* visant à caractériser les propriétés électrophysiologiques intrinsèques des neurones du GPe ont principalement été réalisées sur des tranches aigues de rongeurs. Ces expériences ont révélé qu'au niveau électrophysiologique, les neurones du GPe présentent une vaste hétérogénéité et la classification en fonction de leurs propriétés intrinsèques reste très controversée (Deister et al, 2013; Gunay et al, 2008). Cependant, une caractéristique fondamentale et universelle de ces neurones est leur activité autonome. En effet, les résultats obtenus par Chan et al (Chan et al, 2004) démontrent que *in vitro* les neurones du GPe génèrent une activité autonome et régulière. Ceci leur est permis en particulier par la présence à leur surface de canaux HCN (*Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*) et de courant sodiques persistants INaP (Chan et al, 2011; Chan et al, 2004; Mercer et al, 2007). Dans le GPe, les canaux HCN ont une désactivation relativement lente donc leur action dépolarisante se ressent tout au long de la décharge et d'autant plus après l'hyperpolarisation du neurone (Chan et al, 2004). Cela

aide à garantir que le potentiel de membrane ne se stabilise pas à des potentiels inférieurs à ceux nécessaires pour activer les canaux Na^+ . Néanmoins, il a été observé qu'alors que l'activité de décharge des neurones du GPe est assez régulière à haute fréquence, ces neurones peuvent décharger de manière irrégulière à basse fréquence. La régularité de leur activité électrique serait due aux propriétés des canaux potassiques de type SK activés par les conductances calciques qui sont présents dans ces neurones (Deister et al, 2009) même si les canaux HCN participent aussi activement à ces caractéristiques de décharge (Chan et al, 2011) puisqu'il a clairement été établi que leur blocage pharmacologique ralentit la décharge électrique et diminue la régularité des neurones du GPe.

La grande variabilité électrophysiologique des neurones du GPe (Deister et al, 2013) provient certainement du fait que plus de 10 types de canaux voltage-dépendants différents sont présents sur la membrane plasmique de ces derniers (Baranauskas et al, 1999; Chan et al, 2004 ; Mercer et al, 2007 ; Surmeier et al, 1994). Dès lors, des différences d'expression de ces canaux vont contribuer aux activités électriques variables des différents neurones (Gunay et al, 2008). Diverses études se sont penchées sur la caractérisation des propriétés membranaires des neurones pallidiaux dont la connaissance est cruciale dans la compréhension de son fonctionnement et ont proposé une classification de ces neurones. D'après les résultats de Cooper et Stanford (Cooper & Stanford, 2000) obtenus *in vitro*, les neurones du GPe peuvent être classés en trois catégories. Les neurones de type A, représentant 63% des neurones pallidiaux, possèdent une large arborisation dendritique et leur fréquence de décharge spontanée est régulière. Les neurones de type B représentent 32% des neurones pallidiaux. Ces cellules sont spontanément actives et leur patron d'activité électrique est irrégulier. Les neurones de types C sont rares (5% des neurones pallidiaux). Ils sont identifiables par leur gros corps cellulaire ($27 \times 15 \mu\text{m}$) et ces neurones possèdent une large arborisation dendritique ce qui pourrait correspondre aux neurones cholinergiques du noyau basal de Meyert. Les neurones de type A pourraient correspondre aux neurones de type I décrits par Nambu & Llinas {Nambu, 1997 #1392; Nambu, 1994 #1393} alors que les caractéristiques des neurones de types B correspondent à celles des neurones de type II décrit par ces mêmes auteurs chez le cochon-d'inde. De plus, la morphologie des neurones de type B est similaire à celle des neurones décrits par (Millhouse, 1986). Une étude utilisant des stimulations computationnelles suggère que la variabilité intrinsèque des neurones du GPe est due à la diversité des canaux présents sur le neurone (Gunay et al, 2008). De plus, les propriétés électrophysiologiques des neurones sont extrêmement dépendantes du contexte environnemental et des autres conductances présentes au moment de l'enregistrement (Gunay et al, 2008). Ainsi, cette étude suggère qu'il existerait un continuum concernant les propriétés électrophysiologiques des neurones et il serait

impossible de les classer en fonction de ces critères. Une étude récente menée au laboratoire a permis de clarifier le nombre de sous-populations neuronales du GPe grâce à une corrélation entre la présence d'un marqueur neurochimique et les propriétés électrophysiologiques intrinsèques des neurones du GPe chez le rat (**Figure 14**) (Abdi et al, 2015). Les auteurs ont montré que les neurones prototypiques exprimant la Parvalbumine (PV) sont caractérisés par un taux de décharge spontané rapide et régulier (25-30Hz), des rebonds d'inhibition, une accommodation de leur fréquence de décharge, un courant I_h participant à l'activité pacemaker et une amplitude de l'AHP (*After hyperpolarisation potential*) faible alors que les neurones arkypallidaux, exprimant le facteur de transcription FoxP2 et le neuropeptide PPE déchargent à basse fréquence (5Hz) et de manière irrégulière. Ils n'ont pas la capacité de rebond après une bouffée de potentiel d'actions (PA) et ont une amplitude de l'AHP prononcée (deux fois plus importante que celle des neurones prototypiques PV⁺). Les neurones prototypiques n'exprimant pas la PV (uniquement Nkx2.1+) ont quant à eux des propriétés intermédiaires. Ces résultats suggèrent que la différence d'excitabilité entre les neurones prototypiques et arkypallidaux repose en partie sur la différence d'amplitude des courants I_{NaP} qui sont deux fois plus grands chez les neurones prototypiques que chez les neurones arkypallidaux et sur des différences de densités de canaux Ca_{vH} et K_v4 pouvant respectivement sous-tendre les différences observées entre l'amplitude de l'AHP et le taux de décharge spontané des deux types neuronaux pallidaux.

D2. Propriétés électrophysiologiques *in vivo* en condition physiologique

In vivo, les neurones du GPe ont une activité autonome (DeLong, 1971 ; Filion & Tremblay, 1991). Selon différentes études, les neurones du GPe ont un taux de décharge moyen compris entre 10-40Hz (Cruz et al, 2009; Kita & Kitai, 1991 ; Ni et al, 2000) en condition contrôle qui est largement diminué en condition parkinsonienne (Cruz et al, 2009). Néanmoins, certaines données remettent en cause cette hypocativité des neurones du GPe en condition parkinsonienne (Levy et al, 1997). De manière générale, les neurones pallidaux enregistrés *in vivo* affichent un taux de décharge régulier, à haute fréquence qui est interrompu par des pauses. L'activité globale de ces neurones *in vivo* est désynchronisée (DeLong, 1971, Bergman, 1998 #1429). Comme les neurones du GPe reçoivent leurs principales afférences du striatum, ils diminuent globalement leur activité de décharge au cours du mouvement. Mais ils reçoivent également de denses entrées excitatrices du NST qui peuvent accélérer leur fréquence de décharges. Malgré le fait que les neurones pallidaux n'ont pas besoin des entrées synaptiques pour maintenir leur activité, les pauses observées *in vivo* apparaissent dépendre des entrées synaptiques GABAergiques du striatum et

glutamatergique du NST ainsi que de leur modulation inter-neuronale réciproque (Kita & Kita, 2011; Noblejas et al, 2015).

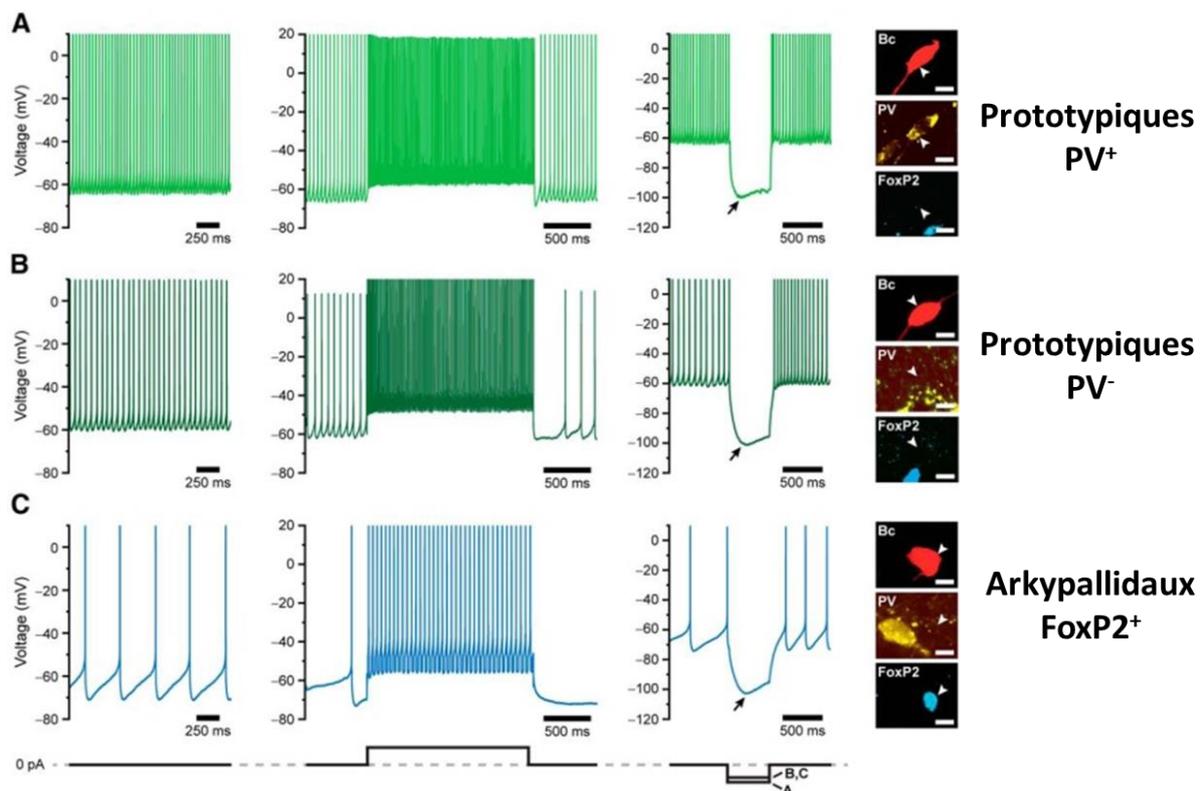


Figure 14: Propriétés électrophysiologiques *in vitro* des neurones prototypiques et arypallidaux du GPe. A-B. Activité de décharge typique de neurones prototypiques enregistrés en configuration patch perforé. De gauche à droite : Activité de décharge spontanée, activité de décharge évoquée induite par l'injection de 100 pA de courant pendant 2 s, et en réponse à un créneau de courant hyperpolarisant (-100 pA ou -80 pA pendant 500 ms; produisant une déflexion du potentiel de ~ 40 mV (flèche noire) suivi d'un "sag qui est un phénomène d'échappement à l'hyperpolarisation provoqué par l'activation des canaux HCN. A droite, images du neurone enregistré rempli à la biocytine (Bc) sur lequel un marquage immunohistochimique a été réalisé l'identifier sa nature moléculaire. Ce neurone est PV-positif et donc identifié comme un neurone prototypique. C. Même description qu'en A et B mais pour un neurone arypallidal exprimant le marqueur FoxP2. Température d'enregistrement : 32°C.

Ainsi, le mode d'activité de ces neurones repose sur un équilibre entre leur propriété pacemaker et la modulation synaptique qu'ils reçoivent. D'après différentes données issues d'enregistrements électrophysiologiques extracellulaires, réalisés *in vivo* chez le singe, les neurones du GPe ont été classés en deux grandes catégories. Les plus nombreux sont des neurones qui déchargent à haute fréquence et ayant des pauses spontanées de leur activité. Ces neurones sont nommés « high frequency pausers » (HFP). Puis une seconde population minoritaire de neurone pallidaux déchargent à basse fréquence et plutôt en ayant une activité en bouffées de PA. Ces neurones sont appelés « low frequency bursters » (LFP) (**Figure 15**) (DeLong, 1971, Gardiner, 1992 #3141). De plus, des études également

réalisées chez le singe, ont montré que la forme des PA de ces neurones est différente (Bugaysen et al, 2010). Ceci suggère l'existence de différentes propriétés cellulaires dans la génération des PA. Des enregistrements réalisés chez l'homme confirme l'existence de plusieurs types cellulaires dans le GPe (Magnin et al, 2000) suggérant que ces sous-populations sont conservées chez l'Homme. Les expériences réalisées chez le rat anesthésié révèlent qu'environ 70% des neurones pallidiaux ont une activité régulière continue, d'autres affichent une activité en bouffées de PA périodiques et d'autres ne déchargent pas spontanément. Une partie des neurones présentant une activité continue peut être activée par des stimulations antidromiques dans le STR, le NST ou la SN alors que ce n'est pas le cas de ceux présentant une activité en bouffées. Un très faible nombre de neurones silencieux présente une réponse antidromique uniquement lors d'une stimulation du STR (Kita & Kitai, 1991). Ces profils d'activités sont en partie retrouvés chez le singe concernant les neurones HFPs et LFBs. Les neurones HFP et LFP enregistrés chez le primate semblent correspondre respectivement aux neurones prototypiques et arkpallidiaux retrouvés chez les rongeurs.

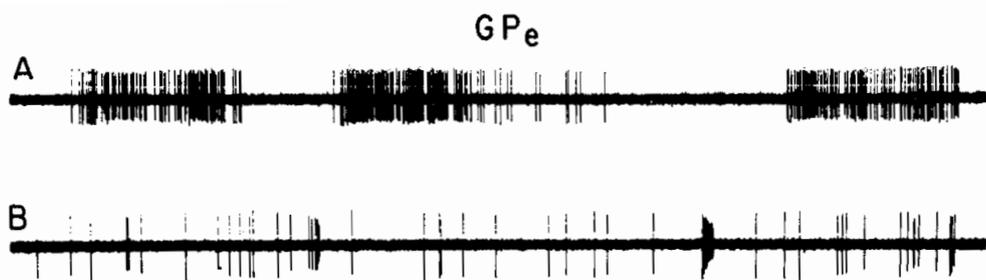


Figure 15: Profils électrophysiologiques typiques d'un neurone « high frequency pauser » (HFP) (A) et d'un neurone « low frequency burster » (LFP) (B) décrits chez le singe.

D3. Propriétés électrophysiologiques pathologiques *in vivo*

- **Animal éveillé**

L'activité du GPe est fortement perturbée en condition parkinsonienne. En effet, chez le singe MPTP éveillé et les patients parkinsoniens, le profil d'activité de ces neurones change par rapport aux données obtenues en condition contrôle. Une activité de décharge synchronisée, rythmique et en bouffées de PA émerge du GPe. De plus, la variabilité moyenne de l'activité de décharge augmente et les neurones du GPe deviennent hypoactifs (Filion & Tremblay, 1991 ; Magnin et al, 2000; Nini et al, 1995). Des résultats similaires sont obtenus chez le rat lésé à la 6-OHDA. L'intensité de ces changements varie avec le temps et la sévérité de la lésion dopaminergique. L'ensemble de ces changements

électrophysiologiques sont associés à certains symptômes tels que l'akinésie et les tremblements de repos observés dans la MP. L'hypoactivité des neurones du GPe peut être expliquée par une hyperactivité de la voie striato-pallidale comme le prédit le modèle classique d'organisation anatomo-fonctionnelle des GB décrit par Alexander et crutcher (Alexander et al, 1990). Pour étayer cette hypothèse, une augmentation des pauses d'activité est observée uniquement au niveau des neurones du GPe. Ce résultat est en faveur d'une augmentation des entrées inhibitrices dans le GPe (Kita & Kita, 2011). Mais d'autres hypothèses sont également envisagées telles qu'une perte d'excitabilité intrinsèque. En effet, une étude menée sur des souris parkinsoniennes montre que les neurones du GPe subissent une réduction d'expression des canaux HCN ce qui a pour conséquence une réduction de l'activité de décharge de ces neurones (Chan et al, 2011).

L'émergence d'activités oscillatoires au niveau du GPe chez les modèles animaux de la MP est une autre signature électrophysiologique de cette pathologie. Ces oscillations, mesurées au niveau de potentiels de champs locaux (LFP), sont situées dans la gamme de fréquence des ondes β (entre 15-30Hz) et sont dues à la synchronisation excessive des neurones du GPe (Nini et al, 1995). Les oscillations β du GPe sont de moins grande amplitude que celles observées dans le NST et le GPi (Sharott et al, 2005). Les canalopathies touchant en particulier les canaux HCN et Na^+ dans les neurones du GPe lors de la MP pourraient avoir une implication dans l'établissement de ces ondes lentes (Chan et al, 2011 ; Hashimoto & Kita, 2006). Il a également été montré que la boucle de rétrocontrôle existant entre le GPe et le NST joue un rôle important dans l'apparition de ces oscillations. En effet, une étude menée chez le singe MPTP révèle que l'injection d'un antagoniste glutamatergique dans le NST ou de muscimol (agoniste des récepteurs GABA_A) dans le GPe, a pour conséquence un renforcement de la voie pallido-sous-thalamique, conduisant à une profonde réduction des oscillations β dans le réseau GPe-NST (Tachibana et al, 2011).

- **Animal anesthésié**

Chez le rat anesthésié, des données révèlent que les neurones du GPe ont une fréquence de décharge plus lente suite à une déplétion dopaminergique par rapport à la situation contrôle. Il apparaît également une synchronisation entre les neurones et l'émergence d'activité dans la gamme des oscillations β (Mallet et al, 2008a) ce qui est aussi observé au niveau du NST (Mallet et al, 2008a ; Sharott et al, 2005). De plus, des observations révèlent que chez des rats parkinsoniens anesthésiés, durant les vagues d'activité lentes corticales (SWA), les neurones prototypiques déchargent en antiphase avec l'activité corticale alors que les neurones arypallidaux déchargent en phase avec cette dernière (**Figure 16**) (Mallet et al, 2012). Cette dichotomie fonctionnelle est retrouvée chez les rats contrôles (**Figure 16**) (Abdi et al, 2015) ce qui prouve qu'elle n'est pas une adaptation induite par le

développement de la MP. Mais chez les animaux contrôles, les neurones prototypiques déchargent de manière très régulière et sans coordination avec les vagues d'activité corticale, alors que la déplétion dopaminergique induit une profonde irrégularité de leur activité et les couple en anti-phase avec les vagues d'activité de ce dernier. La perte dopaminergique a peu d'effet sur les neurones arkpallidaux qui en condition contrôle et en condition parkinsonienne sont couplés en phase avec l'électrocorticogramme (ECoG) même s'il est à noter un couplage plus important en condition parkinsonienne (Abdi et al, 2015).

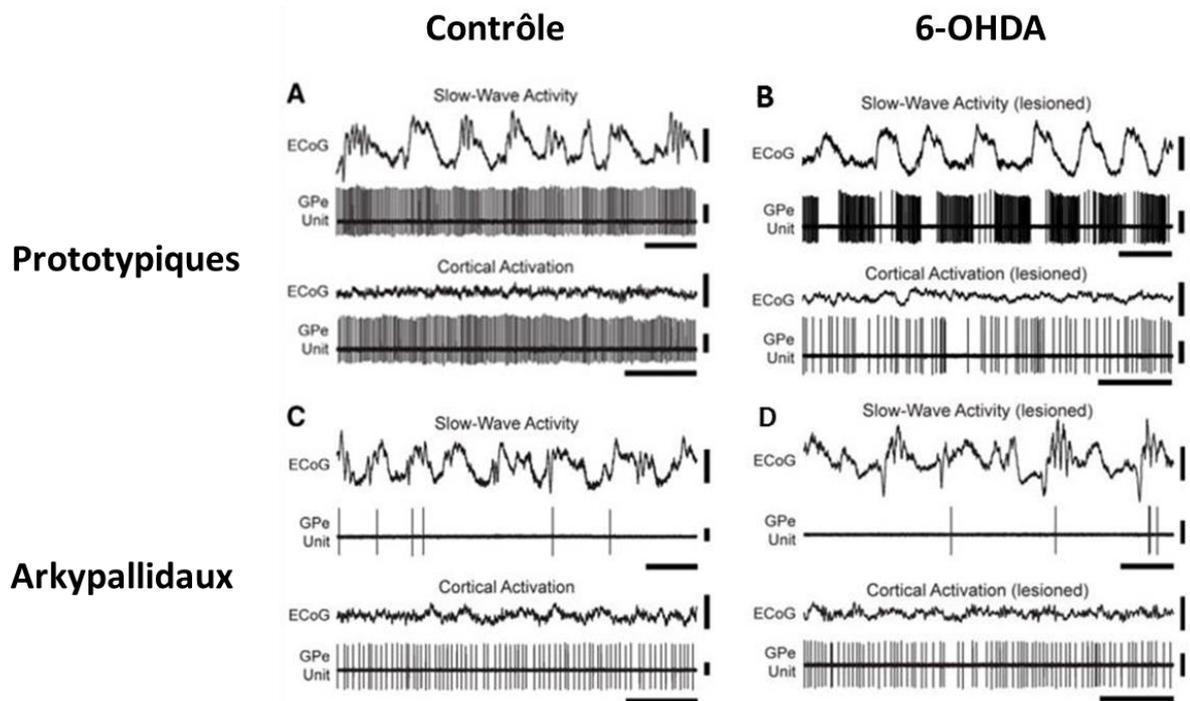


Figure 16 : Activité de décharge spontanée *in vivo* de neurones prototypiques et arkpallidaux identifiés par leur profil moléculaire spécifique chez les rats témoins et 6-OHDA. A. Activité typique d'un neurone prototypique du GPe enregistré chez un rat témoin pendant l'enregistrement simultané de l'électrocorticogramme (ECoG). Le même neurone a été enregistré pendant une activité corticale à ondes lentes (SWA) et une activation corticale. B. Même description qu'en A mais chez un rat 6-OHDA. C. Même description qu'en A mais sur un neurone arkpallidal du GPe. D. Même description qu'en C mais chez un rat 6-OHDA. (Abdi et al, 2015).

4. Fonctions du globus pallidus externe

A. Fonction du globus pallidus externe dans le mouvement

A1 En conditions physiologiques

C'est DeLong (DeLong, 1971) qui a pour la première fois montré que l'activité électrique des neurones du GPe était associée au mouvement. Chez le primate non humain, les neurones

du GPe déchargent en bouffées de PA avec des pauses qui se callent en phase avec le mouvement. Les neurones du GPe déchargent plutôt après le mouvement, ce qui va dans le sens d'un rôle dans la régulation de l'action plutôt que dans son initiation (DeLong, 1971). Également, à partir d'enregistrements extracellulaires obtenus chez le rat, il a été montré que l'activité de décharge des neurones du GPe est en association avec le mouvement lors d'une tâche comportementale apprise. En effet, les neurones changent leur fréquence de décharge en association avec des mouvements de la tête qui sont déclenchés par l'émission d'un son (Gardiner & Kitai, 1992). De plus, cette étude montre que l'activité de décharge de ces neurones est également différente suivant l'orientation du mouvement et qu'elle est dépendante du contexte dans lequel est déclenché ce mouvement. En effet, une proportion des neurones sont actifs lors de l'écoute du son alors que d'autres le sont lors du mouvement à proprement parler. Ces données sont en accord avec l'hypothèse que l'activité des neurones dans les GB pendant le mouvement est hautement dépendante du contexte dans lequel est associée l'initiation du mouvement. De manière intéressante, une inhibition pharmacologique unilatérale de l'activité du GPe induite par une potentialisation de la transmission GABAergique synaptique par le zolpidem au niveau de ce noyau provoque un comportement rotatoire chez le rat (Chen et al, 2004b). Ces expériences suggèrent qu'une hypoactivité du GPe entraîne un syndrome hypokinétique. À l'inverse, le blocage de la transmission GABAergique par infusion de bicuculline au niveau du GPe chez le singe produit des dyskinésies sévères (Matsumura et al, 1995). L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle primordial des neurones pallidaires durant plusieurs étapes du mouvement telles que l'initiation et la réalisation proprement dite. Plus récemment, le groupe du Dr Peter Magill s'est intéressé aux différents rôles fonctionnels que pourraient avoir les neurones prototypiques et les neurones arkypallidaires dans le contrôle du mouvement volontaire. Il a ainsi été mis en évidence que les neurones prototypiques du GPe, qui déchargent à haute fréquence quand l'animal est éveillé au repos, changent d'activité de manière hétérogène pendant le mouvement, avec une majorité de ces neurones (51.15%) diminuant leur activité de décharge. Contrairement aux neurones prototypiques, les neurones arkypallidaires déchargent à basse fréquence au repos et augmentent fortement leur activité de décharge électrique pendant le mouvement. Ces données suggèrent que les neurones prototypiques et arkypallidaires participent de manière différentielle à l'encodage du comportement moteur (**Figure 17**) (Dodson et al, 2015).

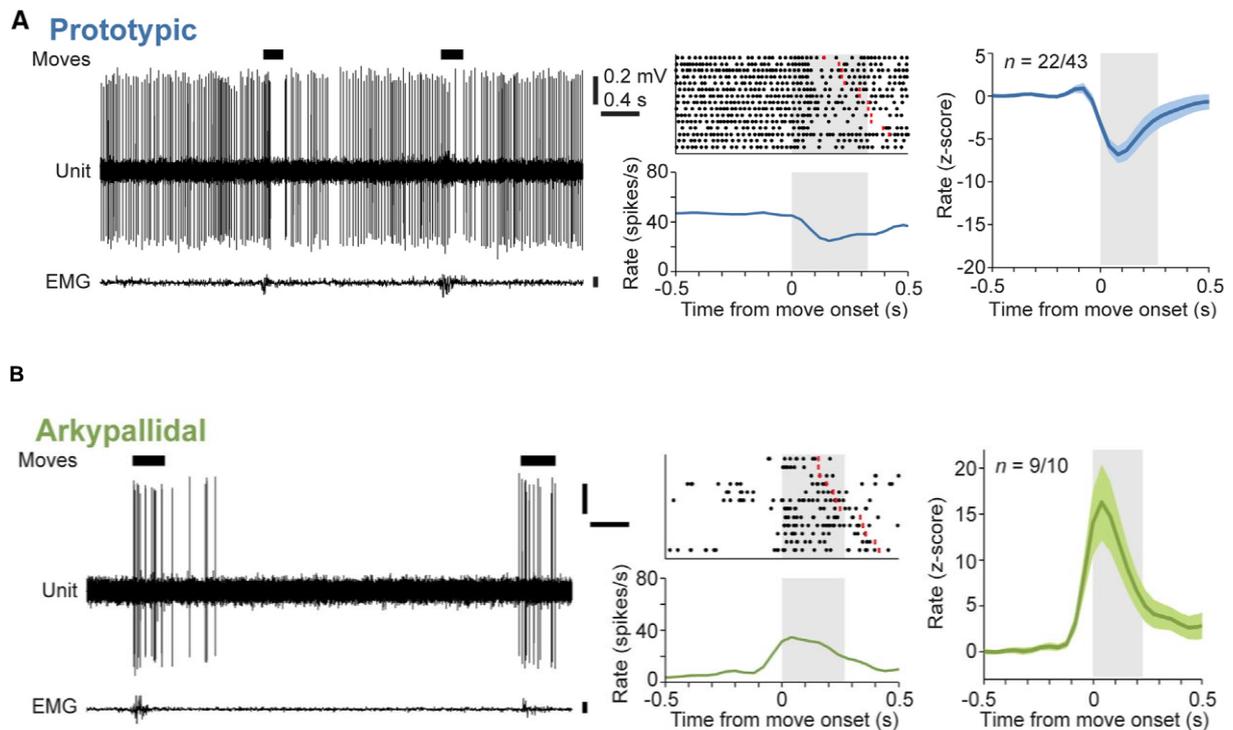


Figure 17: Exemples de traces électrophysiologiques représentant les différents changements d'activité des neurones prototypiques (A) et arkypallidaux (B) du GPe pendant un mouvement spontané chez la souris. Le mouvement est représenté par les barres épaisses noires au dessus des traces électrophysiologiques. EMG: électromyogramme. Au centre de l'illustration, nous pouvons voir le rasterplot de l'activité de décharge des neurones prototypiques en (A) et arkypallidaux en (B). Le mouvement est représenté par le rectangle gris. A droite de l'image est représenté la moyenne de décharge de l'ensemble des neurones prototypiques (A) et arkypallidaux (B) enregistrés durant le mouvement (zone grise) (Dodson et al, 2015).

A.2 En conditions parkinsoniennes

La stimulation chronique à haute fréquence dans le NST de patients parkinsoniens est connue depuis de nombreuses années pour améliorer les symptômes moteurs. Bien que l'augmentation de l'activité neuronale du NST et du GPi soit considérée comme l'élément fondamental de la pathologie de la MP, le rôle précis du GPe dans l'induction de ces changements reste posé. Comprendre le rôle du GPe dans les GB est un élément essentiel dans le développement de futures avancées médicamenteuses et chirurgicales pour le traitement de la MP. Plusieurs études se sont donc intéressées à l'impact d'une telle stimulation dans le GPe. Comme il a été montré, chez des patients parkinsoniens, une stimulation électrique à haute fréquence (SHF, >100Hz) autant dans le GPi que le GPe améliore les symptômes parkinsoniens moteurs (Vitek et al, 2004). Malheureusement des mouvements dyskinétiques peuvent apparaître de manière plus prononcée si la SHF est appliquée au niveau du GPe par rapport au GPi (20% vs. 9%). D'autres recherches ont

impliqué directement le GPe dans la physiopathologie de la MP. En effet, des données montrent que la lésion du GPe exacerbe les symptômes moteurs chez le singe MPTP, modifie l'activité du GPi et réduit les effets thérapeutiques de l'apomorphine (agoniste dopaminergique non spécifique) (Zhang et al, 2006). De plus, il a été montré que la déplétion dopaminergique chez le rat 6-OHDA et le singe MPTP entraîne une mort neuronale spécifique des neurones PV+ du GPe (Fernandez-Suarez et al, 2012). Ces neurones appartiennent au groupe de neurones prototypiques du GPe qui projettent massivement sur le NST et le GPi. Leur dégénérescence pourrait entraîner un déficit d'inhibition au niveau du NST et du GPi et ainsi participer aux modifications d'activité observées dans ces deux noyaux lors de la MP.

B. Autres fonctions du globus pallidus externe

B.1. Cycles veille/sommeil

Bien que le réseau des GB ne soit pas directement associé au contrôle du cycle veille-sommeil, il a été montré que ce réseau et en particulier le GPe joue un rôle non négligeable dans la régulation de cette fonction. En effet, des épisodes d'insomnies ont été observés chez des rats ayant subi une lésion du GPe conduisant à une forte augmentation (environ 45%) de l'éveil total et d'une fragmentation des cycles veille/sommeil (Qiu et al, 2010). Cependant, ces cycles veille/sommeil ne sont pas affectés par la lésion des neurones du NST ou de ceux du GPi (Gerashchenko et al, 2006; Qiu et al, 2010), ce qui suggère un rôle prédominant du GPe. De manière intéressante, l'apparition d'ondes corticales lentes pendant l'éveil a été observée chez le rat avec des lésions du STR, du noyau accumbens et du GPe. Une projection GABAergique pallido-corticale a récemment été mise en évidence (Chen et al, 2015b; Saunders et al, 2015b), suggérant l'existence d'une boucle cortico-striato-pallido-corticale régulant les cycles veilles/sommeil. Les changements de cycles veille-sommeil impliqueraient ainsi cette voie pallido-corticale dont la mise en jeu aurait pour effet d'inhiber les cellules pyramidales corticales et donc de promouvoir le sommeil (Qiu et al, 2010). Ce mécanisme reste pour le moment hypothétique et nécessite d'être vérifié.

B.2. Apprentissage

De manière générale, les GB sont impliqués dans l'exécution de différents processus cognitifs et mnésiques. Des données obtenues à partir de modèles computationnels prédisent que non seulement le STR mais également le GPe ont un rôle majeur dans les processus d'apprentissage. Le GPe serait notamment impliqué dans le comportement d'exploration lié à l'association d'un stimulus à une récompense (Schroll et al, 2015b). Ce modèle a été conforté par l'enregistrement des potentiels de champs locaux dans le GPe

montrant une augmentation d'activité de ces neurones durant une telle tâche d'apprentissage chez l'Homme (Schroll et al, 2015b). Ce rôle dans un tel processus cognitif pourrait expliquer les déficits apparaissant chez les patients atteints de la MH lors de la dégénérescence des MSNs striataux. En effet, un modèle computationnel suggère que la lésion des voies directe et indirecte des GB est la majeure source de déficits d'apprentissage apparaissant chez ces patients alors que la diminution des niveaux cérébraux de dopamine ne semble pas être impliquée dans ces déficits (Schroll et al, 2015a).

B.3. Stress et anxiété

La corticotropine ou CRF (Corticotropin-releasing factor), est un facteur neuroendocrinien d'origine hypothalamique de réponse au stress (Spiess et al, 1981). Il a été montré qu'une activation chronique du système CRF produit une anxiété sévère et des états dépressifs (Holsboer, 1999). Le CRF exerce ses actions physiologiques *via* le récepteur CRF de type 1 (CRFR1) qui est largement exprimé à travers le cerveau et l'hypophyse des mammifères. De manière intéressante, le CRFR1 est hautement exprimé dans les régions cérébrales principalement impliquées dans les fonctions motrices et sensorielles dont le GPe (Van Pett et al, 2000). Des études ont suggéré un possible rôle du CRF dans le GPe dans la réponse au stress. En effet, dans des modèles animaux ayant une surexpression cérébrale du facteur CRF, l'expression des mRNA du CRFR1 est réduite dans le GPe (Korosi et al, 2006; Sztainberg et al, 2011) alors que la concentration de CRF est augmentée dans le STR (la principale afférence du GPe) de rats en situation de stress général (Fadda & Fratta, 1997). Cependant, contrairement à ce qui est connu sur les effets anxiolytiques de l'ablation de CRFR1, Sztainberg et collègues ont montré, qu'une sous-expression des ARNm de CRFR1 dans le GPe avait pour effet d'augmenter significativement l'état anxieux des animaux (Sztainberg et al, 2011). De surcroît, il a été montré que le CRF favorise la libération de GABA et d'enképhaline (un opioïde endogène anxiolytique) dans le GPe de rats (Sirinathsinghji & Heavens, 1989 ; Sirinathsinghji et al, 1989) ce qui est confirmé par la diminution d'expression d'enképhaline dans le GPe de souris CRFR1 knock-out (KO). Le CRFR1 étant exprimé par les neurones du GPe, il serait possible de suspecter un mécanisme par lequel le CRF modulerait la libération d'enképhaline striatale (Sztainberg et al, 2011) pouvant expliquer son rôle dans l'état anxieux. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le GPe peut avoir un rôle important dans le comportement émotionnel et la réponse au stress dû à l'action du CRF.

IV. La transmission GABAergique

1. Métabolisme du GABA

L'acide gamma-aminobutyrique ou GABA est synthétisé à partir de la décarboxylation du glutamate (acide aminé exciteur) grâce à une enzyme, la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase ou Glutamate Decarboxylase) présente dans le cytosol des terminaisons axonales GABAergiques. Cette enzyme a pour cofacteur le pyridoxal phosphate (PLP - ou vitamine B6) sans qui, elle ne peut pas fonctionner (Mathews & Diamond, 2003). Il existe deux isoformes de la GAD: GAD65 et GAD 67. Ces deux isoformes ont le même site actif mais elles diffèrent par leur localisation cellulaire et leur mode de fonctionnement vis à vis de leur cofacteur, le PLP. La GAD 65 est préférentiellement présente dans les terminaisons axonales et n'est pas saturée en PLP. Son activité peut être augmentée par l'élévation du taux de PLP dans les terminaisons. Ce mécanisme permettrait la production accrue et rapide de GABA alors que la GAD 67, plutôt somato-dendritique, est saturée *in vivo* par le PLP, ce qui sous-tend probablement une production et une libération tonique de GABA par les neurones qui l'expriment (Mathews & Diamond, 2003). A la surface des neurones pré-synaptiques GABAergiques, est présent le transporteur du glutamate EAAT3 (Excitatory amino-acid transporter 3) qui est responsable de la recapture de glutamate de l'espace extracellulaire servant à la synthèse de GABA (Rowley et al, 2012). La GAD65 est étroitement liée aux transporteurs vésiculaires de GABA (VGAT) situés sur les vésicules de libération (Wu et al, 2007) ce qui permet au glutamate, dès sa recapture, d'être converti en GABA et ainsi d'être rapidement stocké dans les vésicules de libération synaptiques (Jin et al, 2003). Les astrocytes participent aussi à la synthèse du GABA puisque la glutamine qui est également un précurseur du GABA, est uniquement synthétisée dans les cellules gliales à partir du glutamate capté de la fente synaptique. Cette réaction est catalysée par la glutamine synthétase, enzyme exclusivement localisée dans les cellules gliales. La glutamine est ensuite libérée dans l'espace extracellulaire et captée par les terminaisons axonales inhibitrices pour être transformée en GABA. Il a également été montré que les astrocytes possèdent les différentes isoformes de GAD ce qui suggère qu'ils ont la capacité de synthétiser directement du GABA (Lee et al, 2011a). En outre, très récemment, une nouvelle voie de synthèse de GABA dépendante de la MAOB, une enzyme mitochondriale a été mise en évidence dans les astrocytes (Yoon et al, 2014) (Jo et al, 2014). Après sa libération dans la fente synaptique, le GABA est rapidement capté de l'espace extracellulaire par des transporteurs (GATs) dans les neurones et les cellules gliales. Ce mécanisme

régulateur détermine une transmission inhibitrice adéquate, maintient l'homéostasie GABAergique en évitant une activation excessive des récepteurs et régule aussi le débordement du neurotransmetteur vers les synapses voisines. A l'heure actuelle, 4 types de transporteurs au GABA ont été mis en évidence et clonés (GAT-1, GAT-2, GAT-3 et GAT-4) (Rowley et al, 2012). Une fois recapté par les neurones, le GABA est recyclé ou dégradé en succinate par l'intervention successive de deux enzymes : la GABA transaminase mitochondriale (GABA-T), dont le cofacteur est le PLP, qui transforme le GABA en acide succinique semi-aldéhyde puis, la semi-succinique aldéhyde déshydrogénase (SSA-D), dont le cofacteur est le NAD-H⁺, qui transforme l'acide succinique semi-aldéhyde en succinate, voie d'entrée dans le cycle de Krebs (**Figure 18**) (Rowley et al, 2012).

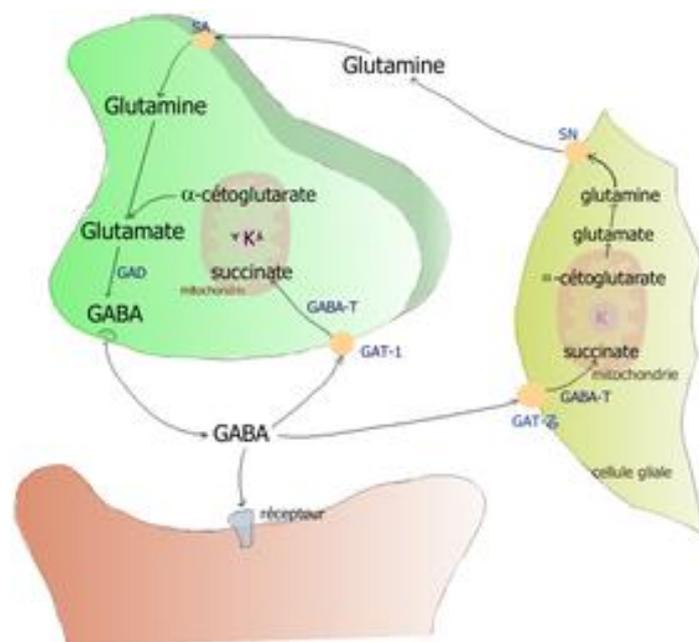


Figure 18 : Métabolisme du GABA. Schéma caractérisant la libération, le transport et la synthèse de GABA dans une synapse GABAergique. Le neurone pré-synaptique est en vert, le neurone post-synaptique en orange et la glie en jaune. GAD: Glutamate Decarboxylase ; GABA-T : GABA transaminase mitochondriale ; GAT-1 : transporteur neuronal du GABA ; GAT-3 : transporteur glial du GABA, SN : Système N, transporteur glial de la glutamine ; SA : Système A, transporteur neuronal de la glutamine

2. Les récepteurs GABAergiques

Le GABA exerce ses effets inhibiteurs dans le système nerveux central des Vertébrés par l'intermédiaire d'au moins trois types de récepteurs : le récepteur GABA_A, le plus connu, le récepteur GABA_B et le récepteur GABA_C. Les récepteurs GABA_A et GABA_C sont des récepteurs ionotropes qui augmentent la perméabilité membranaire aux ions chlorures et

bicarbonates alors que le récepteur GABA_B est un récepteur métabotrope qui module l'ouverture des canaux calciques et potassiques grâce à des seconds messagers impliquant une protéine G.

A. Les récepteurs GABA_B

Les récepteurs GABA_B sont les récepteurs métabotropiques du GABA. Ils sont associés à une protéine G (protéines liant le GTP). La protéine G_o peut être couplée à un canal calcique (Ca²⁺) ou à un canal potassique (K⁺). Quand ils sont situés en pré-synaptique, les récepteurs GABA_B semblent essentiellement couplés aux canaux calciques (blocage de l'entrée de calcium) et régulent l'exocytose des neurotransmetteurs présents dans les terminaisons nerveuses (Pinard et al, 2010). L'inhibition des canaux calciques passe par les protéines G_{i/o} couplées au récepteur alors que l'inhibition de l'exocytose passe par un blocage de la machinerie de fusion membranaire (Pinard, 2010). La protéine G_i inhibe l'adénylate cyclase (AC). Ce faisant, elle provoque une réduction intracellulaire d'AMP cyclique, ce qui peut conduire à une inhibition de la libération de neurotransmetteurs (Chen et al, 2002). La population post-synaptique de récepteurs GABA_B semble préférentiellement couplée aux canaux GIRK (courant potassique rectifiant activé par les protéines G) (Jones et al, 1998), entraînant une augmentation de conductance aux ions K⁺ et donc, une hyperpolarisation des neurones post-synaptiques. Ces récepteurs sont hétérodimériques. Ils sont constitués de deux sous-unités, GABA_{B1} (GB1) qui présente deux isoformes (GB1a et GB1b) et GABA_{B2} (GB2). Lorsque GB2 et GB1 sont co-exprimés, cela permet alors la formation d'un récepteur fonctionnel présentant toutes les propriétés d'un récepteur GABA_B neuronal (Galvez et al, 2000). Ces données supportent donc l'hypothèse d'une trans-activation allostérique du récepteur GABA_B. En effet, l'interaction des deux sous-unités au niveau de leur extrémité C-terminale permet l'adressage à la surface cellulaire d'un hétérodimère fonctionnel capable de lier le GABA via GABA_{B1} ce qui conduirait à l'adoption par GB2 d'une conformation favorable à un couplage aux protéines G (Duthey et al, 2002; Galvez et al, 2000). Cette interaction GB1/GB2 semble très spécifique. Cependant, les deux sous-unités généralement colocalisées dans la plupart des régions du cerveau (Jones et al, 1998) se retrouvent parfois exprimées dans des régions distinctes. Par conséquent, il n'est pas exclu que ces sous-unités peuvent avoir des fonctions indépendantes qui ne sont encore déterminées à ce jour.

Dans le GPe chez le singe, des récepteurs GABA_{B1} et GABA_{B2} ont été identifiés en pré-synaptique sur les synapses striato-pallidales et en post-synaptique sur les neurones pallidaux (Charara et al, 2005; Chen et al, 2004a ; Smith et al, 2000). Leur présence est également retrouvée au niveau pré-synaptique dans les synapses asymétriques. Occasionnellement, des récepteurs GABA_{B1} sont également sur les corps cellulaires et les

prolongements astrocytaires (Smith et al, 2000). Les études de microscopie électronique révèlent que les récepteurs GABA_B sont principalement localisés sur le soma et les dendrites des neurones du GPe mais au niveau extra-synaptique (Smith et al, 2000). Bien que le rôle exact des récepteurs GABA_B ne soit pas bien connu dans le GPe, ils régulent l'efficacité de la transmission GABAergique au niveau de ce noyau (Kita et al, 2006). Au niveau électrophysiologique, chez le singe, l'injection de CGP55845, un antagoniste spécifique des récepteurs GABA_B provoque une augmentation du taux de décharge spontanée des neurones du GPe et augmente également leur régularité (Kita et al, 2006) montrant qu'ils jouent un rôle dans le contrôle l'activité électrique spontanée des neurones pallidiaux. Cependant l'activation de ces récepteurs nécessite des stimulations répétées du STR ou du GPe ce qui suggère que leur activation nécessite une libération prolongée de GABA (Kita et al, 2006). Ces observations suggèrent que les récepteurs GABA_B peuvent être activés quand les concentrations de GABA ambiant sont élevées dans le GPe notamment durant des activités en bouffées des neurones du GPe.

B. Les récepteurs GABA_C

Les récepteurs de type GABA_C peuvent être considérés comme une sous-classe de récepteurs GABA_A, (décrite de manière exhaustive dans le paragraphe suivant) c'est-à-dire des récepteurs canaux laissant entrer des ions chlorures lorsqu'ils sont activés. Mais contrairement aux réponses rapides et transitoires obtenues par les récepteurs GABA_A, les récepteurs GABA_C ont des réponses lentes et soutenues qui sont dues à leur différente composition en sous-unités (Feigenspan & Bormann, 1994; Lukasiewicz, 1996). Pharmacologiquement, les récepteurs GABA_C sont peu sensibles à la bicuculline et au baclofen, et ne sont pas sensibles à beaucoup de modulateurs des récepteurs GABA_A (comme les benzodiazépines, les barbituriques et les stéroïdes) (Shimada et al, 1992). Les récepteurs GABA_C sont activés soit directement par le GABA ou le muscimol mais aussi par son précurseur le « Cis-aminocrotonic acid » (CACA), ce qui n'est pas le cas des deux autres familles de récepteurs GABAergiques (Feigenspan & Bormann, 1994). Ils sont également plus sensibles au GABA que les récepteurs GABA_A et GABA_B (Feigenspan & Bormann, 1994). Comme d'autres canaux-ligands, ce récepteur est constitué par cinq sous-unités rho « ρ1-3 » disposées autour d'un pore central. Comme pour le canal GABA_A, quand le pore est ouvert, il est perméable aux ions chlorures, bien que sa conductance soit plus faible que celle des récepteurs GABA_A (Feigenspan & Bormann, 1994; Lukasiewicz, 1996).

C. Les récepteurs GABA_A

Sous la dénomination de récepteur GABA_A, on désigne un récepteur hétéropentamérique transmembranaire formé de 5 sous-unités de stœchiométrie 2 α , 2 β et 1 sous-unité variable disposées autour d'un pore central, perméable préférentiellement aux ions chlorures (Cl⁻) mais aussi aux ions bicarbonates (HCO₃⁻). 19 isoformes de sous-unités ont été identifiées (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , π), chacune produite par un gène différent mais avec une grande homologie entre elles. De manière générale, une sous-unité de récepteur GABA_A est composée de 4 domaines transmembranaires (TM). Le TM2 forme le pore du récepteur-canal, et les deux domaines C- et N-terminal sont localisés dans le milieu extracellulaire (**Figure 19**). Le grand nombre de sous-unités permet une importante variété de sous-types de récepteurs GABA_A mais seulement une douzaine d'assemblages existe dans les neurones. Leur composition en sous-unité détermine leurs propriétés physiologiques et pharmacologiques ainsi que leur localisation (**voir Figure 24**). Les récepteurs GABA_A sont membres de la famille des canaux ioniques à boucle cystéine déclenchés par un ligand (Cys-loop), c'est à dire que l'ouverture de ce récepteur-canal est commandée directement par la fixation de deux molécules de GABA entraînant la pénétration des ions. Les deux sites de liaison au GABA seraient situés à l'interface entre les sous unités α et β (Ernst et al, 2003). En plus des sites de fixation primaire au GABA, ce complexe comporte d'autres sites de fixation secondaire pour des modulateurs allostériques tels que les benzodiazépines, barbituriques, convulsivants, stéroïdes ou encore l'alcool. Ces agents modulateurs changent l'efficacité du GABA en induisant une modification de l'architecture du canal GABA_A, ce qui modifie sa perméabilité aux ions Cl⁻. Ce dernier étant chargé négativement, son entrée dans le milieu intracellulaire produit une hyperpolarisation du potentiel membranaire et une inhibition de l'activité neuronale. Des études ont montré que les récepteurs GABA_A peuvent rapidement être internalisés ou sortir à la surface membranaire et également bouger par diffusion latérale sur la membrane. Ces capacités dynamiques permettent non seulement des changements rapides du nombre de récepteurs mais pourraient aussi induire des changements de leur propriété permettant de répondre au mieux aux modifications de l'environnement neuronal (Jacob et al, 2008). De plus, à travers leurs interactions avec de nombreuses protéines cytosoliques, ils peuvent se regrouper aux sites synaptiques et extra-synaptiques et être responsables de différents types d'inhibitions. En effet, le GABA exerce son action sur les récepteurs GABA_A selon deux modes distincts relatifs à la localisation de ces récepteurs à la surface neuronale.

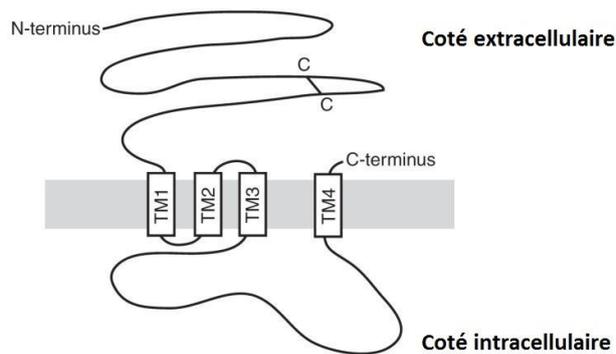


Figure 19: Schéma de la topographie classique d'une sous-unité de récepteur GABA_A. Le pont disulfure-cystéine dans la partie N-terminale est indiqué par la barre noire possédant un symbole « C » à chacune de ses extrémités. Les domaines transmembranaires sont représentés dans les rectangles blancs marqués TM1-4 (Goetz et al, 2007).

C1. Les récepteurs GABA_A synaptiques

Le récepteur GABA_A le plus abondamment exprimé dans le cerveau est composé de $\alpha\beta\gamma 2$ (**Figure 20**). La sous unité γ permet l'adressage synaptique des récepteurs notamment par son interaction avec la protéine gephyrin (Essrich et al, 1998). L'hétérogénéité moléculaire des récepteurs GABA_A a d'importantes conséquences fonctionnelles puisque d'elle dépend les propriétés d'adressage et de sensibilité de ces récepteurs pour le GABA (Bohme et al, 2004 ; Brown et al, 2002). Le GABA est libéré par les vésicules de libération pré-synaptiques dans la fente synaptique. Chaque vésicule libère plusieurs milliers de molécules de GABA créant un pic de concentration de l'ordre du « millimolaire » dans la fente synaptique (Mody et al, 1994). Les récepteurs GABA_A sont regroupés sur la membrane du neurone post-synaptique immédiatement sous les sites de libération du neurotransmetteur. Lorsque les récepteurs GABA_A synaptiques sont exposés à de brèves et hautes concentrations de GABA, cela conduit dans les neurones matures à des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) rapides, dont la durée est de l'ordre de quelques millisecondes (Jones & Westbrook, 1995). Ce phénomène est nommé « inhibition phasique ». Le temps et la durée d'exposition des récepteurs GABA_A sont des points essentiels au mode d'activation phasique. L'inhibition phasique dépend de plusieurs paramètres. Elle est liée à la libération du neurotransmetteur c'est à dire que les concentrations et la durée d'exposition peuvent varier en fonction notamment de la géométrie de la synapse, de la taille des vésicules synaptiques, de leur contenance ainsi que de la proximité des systèmes de recapture. Elle dépend également des propriétés biophysiques des récepteurs GABA_A synaptiques qui, de par leur composition en sous-unités, sont caractérisés par une désensibilisation rapide et soutenue ainsi qu'une faible affinité pour le GABA (de l'ordre du mM) (Ferando & Mody, 2014 ; Jones & Westbrook, 1995 ; Mortensen et al, 2011).

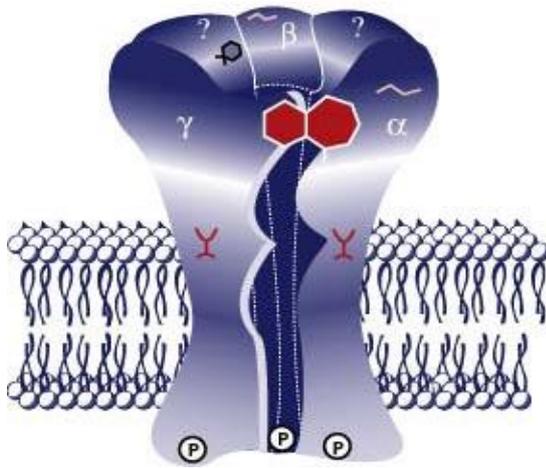


Figure 20: Structure générale d'un récepteur GABA_A pentamérique.

Le récepteur est représenté avec une sous-unité α , β , γ et deux sous-unités variables symbolisées par les points d'interrogation. Les symboles « P » entourés d'un cercle noir représentent les sites de phosphorylation du récepteur.

- Localisation des récepteurs GABA_A synaptiques dans le globus pallidus externe

Des études réalisées chez le rat ont montré que les récepteurs GABA_A induisent des potentiels post-synaptiques inhibiteurs rapides (PPSI) dans les neurones du GPe, (Kita, 2001 ; Kita & Kitai, 1991). Des expériences d'électrophysiologie et d'immunofluorescence ont permis d'identifier la présence de la sous-unité $\alpha 1$ au niveau de l'ensemble des synapses pallidales alors que les niveaux d'expression des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ semblent non uniformes. En effet, les sous-unités $\alpha 1$ sont à la fois sur les synapses striato-pallidales et pallido-pallidales distribuées sur le soma et les dendrites des neurones, et notamment co-localisées avec la parvalbumine, l'enkephaline, et la gephyrin (Gross et al, 2011). L'ensemble des études sur la sous-unité $\alpha 1$ suggère qu'elle est la plus exprimée dans le GPe. L'immunofluorescence de la sous-unité $\gamma 2$ avec celle de $\alpha 3$ indiquent leur présence dans les synapses péri-somatiques, une région principalement ciblée par les collatérales d'axones du GPe. Alors que les sous-unités $\alpha 2$ des récepteurs GABA_A synaptiques sont observées dans le compartiment dendritique ou sont préférentiellement localisées dans les synapses striatales (**Figure 21**).

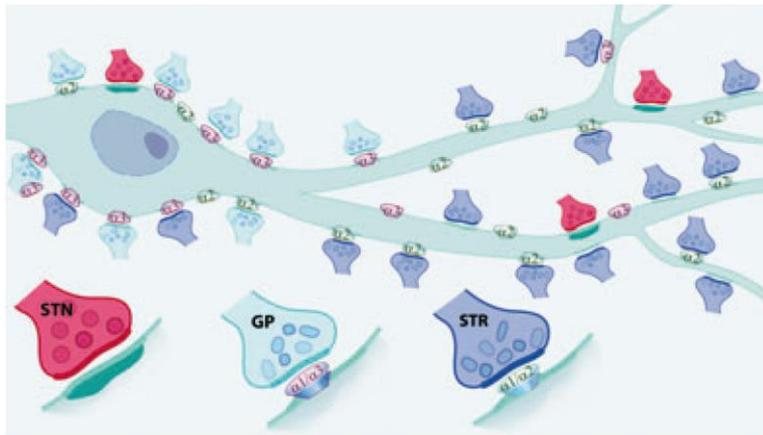


Figure 21. Localisation des sous-unités GABA_A en fonction des synapses STR-GPe et GPe-GPe.

Les synapses STR-GPe sont localisées sur les dendrites des neurones du GPe et sont enrichies en sous-unités $\alpha 2$ alors que les synapses GPe-GPe sont situées préférentiellement sur le soma des neurones et sont composées de récepteurs contenant exclusivement des sous-unités $\alpha 1$

Une étude d'hybridation *in situ* couplée à des expériences d'immunohistochimie s'est intéressée à la localisation des sous-unités des récepteurs GABA_A dans le GPe de souris (Hortnagl et al, 2013). Cette étude révèle que la sous-unité $\alpha 1$ est la plus exprimée dans le GPe. Ils notent également la présence des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Un faible marquage de $\alpha 5$ en immunohistochimie est à signaler. Cependant son éventuelle expression n'est pas corroborée par les expériences d'hybridation *in situ* (Hortnagl et al, 2013). Les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ sont également présentes avec une expression majoritaire de $\beta 2$ et $\gamma 1$ (Hortnagl et al, 2013). Une étude de microscopie électronique combinée à l'immunohistochimie réalisées chez le singe identifie la présence de récepteurs GABA_A contenant les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 2/3$ au niveau des synapses symétriques striato-pallidales et pallido-pallidales (Charara et al, 2005). Une proportion significative de ces récepteurs GABA_A est également présente au niveau extra-synaptique. De manière surprenante, une étude suggère que la sous unité δ n'est pas détectée dans le GPe de souris par immunohistochimie et hybridation *in situ* (Hortnagl et al, 2013) alors que son expression est largement connue pour être indispensable à la médiation adéquate de la transmission GABAergique extra-synaptique dans beaucoup de structure cérébrale. Cependant cette étude est controversée et d'autres données révèlent la présence de la sous unité δ dans le GPe (**Figure 22**) (Waldvogel & Faull, 2015). Cette controverse peut être la conséquence du niveau d'expression de la sous unité δ ainsi que de la puissance des anticorps utilisés pour le marquage. Quelle que soit leur localisation, synaptique ou extra-synaptique, ces récepteurs sont toujours post-synaptiques (Charara et al, 2005). Bien que la présence majoritaire des récepteurs GABA_A synaptiques dans les synapses symétriques du GPe est cohérente avec leur rôle dans la transmission synaptique inhibitrice rapide, la distribution de ces récepteurs au niveau extra-synaptique suggère qu'ils peuvent avoir une implication dans des processus complexes liés au débordement du GABA de la fente synaptique comme cela a été montré dans d'autres régions cérébrales (Isaacson et al, 1993).

Region	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	β_1	β_2	β_3	γ_1	γ_2	δ
Striatum	++	++++	++	++++	+	+	+	++++	-	++	++
GPe	+++	+	++	+	+	+	++++	+	++	++	++
GPi	++	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++
SNc	+	+	+++	+	+	++	+	++	-	+++	+
SNr	++++	++	+++	+	+	+	++++	+++	+	++	+

++++, intense immunoreactivity (IR); +++, high IR; ++, moderate IR; +, weak IR; -, no detectable IR; results from human, rat, and primate studies.

Figure 22: Tableau récapitulatif de la localisation des sous-unités de récepteurs GABA_A détectées dans plusieurs régions des GB. Résultats issus d'études chez le rat, le singe et l'homme (Waldvogel & Faull, 2015).

- **Rôle de l'inhibition phasique**

L'activation phasique des récepteurs GABA_A synaptiques (**Figure 23**) est fondamentale pour le processus de transfert d'information dans le système nerveux central. Elle évite notamment l'hyperexcitabilité neuronale et module d'autres conductances ioniques. La rapidité de son action et sa localisation spatiale somatique ou dendritique permettent une intégration synaptique adéquate. Elle est importante pour une intégration locale temporelle précise de l'information.

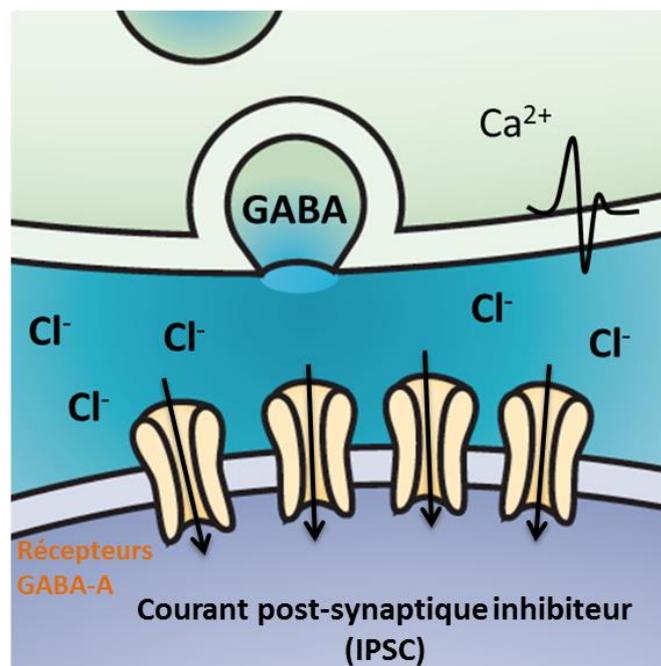


Figure 23: Exemple schématisant une synapse inhibitrice et un courant post-synaptique inhibiteur (IPSC) dû à la libération massive et rapide de GABA dans la fente synaptique. D'après (Farrant & Nusser, 2005).

Une fonction importante de l'inhibition phasique est la génération d'activité rythmique dans les réseaux neuronaux. Par exemple dans le cortex et l'hippocampe, l'inhibition phasique des interneurons GABAergiques sur les cellules pyramidales a un rôle essentiel dans la génération et le maintien des oscillations neuronales theta et gamma (Farrant & Nusser, 2005). De manière générale, l'inhibition phasique gouverne le patron de décharge des neurones puisqu'elle permet, avec l'ensemble des entrées synaptiques intégrées par le neurone, de réguler le taux et la propagation adéquate des potentiels d'action (PA) dans le temps. Dans le GPe, les IPSCs en provenance du striatum et des collatérales d'axones des neurones du GPe, modulent la fréquence de décharge des neurones pallidiaux. Malgré la connectivité éparsée des neurones pallidiaux entre eux (10% de synapses GPe-GPe en regard des synapses STR-GPe qui représentent 80-90% (Kita, 1994 ; Sadek et al, 2007), il a été montré que les IPSCs en provenance de ces collatérales GPe-GPe étaient capables de changer le taux de décharge des neurones du GPe (Bugaysen et al, 2013). De surcroit, une transmission phasique GABAergique mal adaptée est probablement un facteur clé de l'activité électrique pathologique des neurones du GPe observée après une déplétion dopaminergique (Miguelé et al, 2012).

C2. Les récepteurs GABA_A extra-synaptiques

De petites quantités de GABA, de l'ordre du μM , peuvent également s'échapper de la fente synaptique et activer des récepteurs GABA_A péri-synaptiques et extra-synaptiques donnant lieu à une inhibition persistante, de l'ordre de la seconde, nommée « inhibition tonique ». L'inhibition phasique et l'inhibition tonique mettent en jeu des récepteurs qui n'ont pas la même composition en sous-unité ce qui leur confère des propriétés biophysiques différentes (Farrant & Nusser, 2005). Ainsi, les récepteurs extra-synaptiques ont la particularité de pouvoir détecter de faibles concentrations de GABA grâce à une forte affinité pour le GABA (EC₅₀ entre 0.3–0.7 μM) et une désensibilisation lente et peu marquée. Mais selon les structures cérébrales, les récepteurs extra-synaptiques n'ont pas non plus la même composition en sous-unité. Il est cependant clairement établi que les récepteurs extra-synaptiques contiennent majoritairement la sous unité δ (Arslan et al, 2014; Pirker et al, 2000).

- **Composition des récepteurs GABA_A extra-synaptiques**

Toutes les sous-unités composant les récepteurs GABA_A sont retrouvées au niveau synaptique et extra-synaptique. Seule la sous-unité δ est purement extra-synaptique. Elle forme des récepteurs spécifiquement avec les sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 2/3$ dans le cervelet, avec les sous-unités $\alpha 4$ et βx dans le striatum, dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et

dans le thalamus (Barnard et al, 1998); et avec la sous-unité $\alpha 1$ spécifiquement dans les interneurons de l'hippocampe (Glykys et al, 2008) pour produire une inhibition tonique. La localisation de ces récepteurs extra-synaptiques provient probablement de l'absence de sous-unité γ dans leur composition. Il est clair que la sous-unité $\gamma 2$ a un rôle central dans l'adressage et l'ancrage des récepteurs GABA_A à la synapse notamment par leur interaction avec la protéine gephyrin (Essrich et al, 1998). Cependant dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum, certains récepteurs extra-synaptiques capables de produire une inhibition tonique ne contiennent pas de sous-unité δ mais plutôt la sous-unité $\alpha 5$ combinée à $\gamma 2$. Ceci est appuyé par les études d'immunohistochimie multi-marquages montrant une absence de co-localisation entre ces récepteurs probablement de forme $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ et la géphyrin dans l'hippocampe (Brunig et al, 2002). Le striatum et l'hippocampe possèdent également des récepteurs extra-synaptiques de composition $\alpha 4\beta x\delta$ capables d'entraîner un courant tonique. De manière générale, les récepteurs contenant la sous-unité $\gamma 2$ en association avec les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ sont des récepteurs préférentiellement localisés au niveau synaptique pour médier une inhibition phasique. A l'inverse, les récepteurs contenant les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$ ou $\alpha 6$ sont généralement extra-synaptiques notamment s'ils contiennent également la sous-unité δ (**Figure 24**).

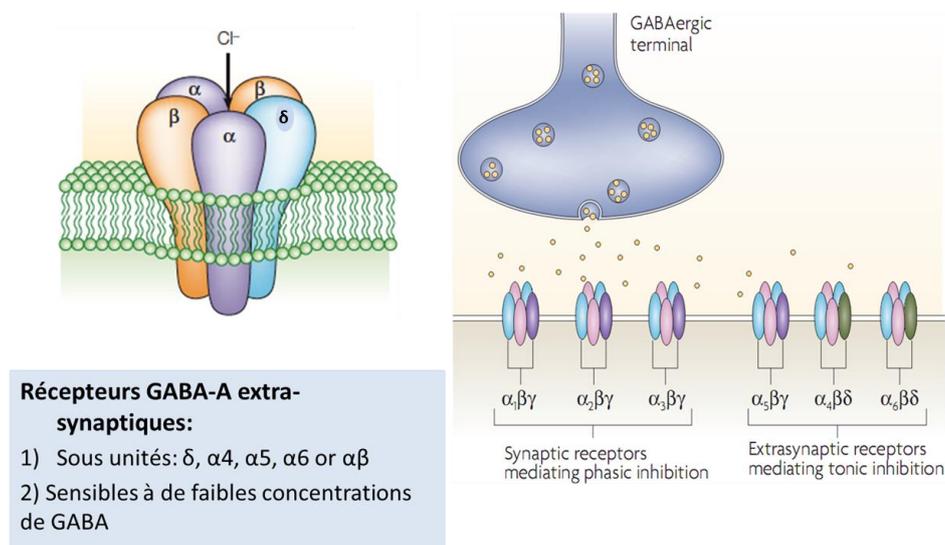


Figure 24: Exemple de récepteurs GABA_A extra-synaptiques. Il est à noter que leur composition en sous-unités détermine leurs propriétés physiologiques et pharmacologiques ainsi que leur localisation (Farrant & Nusser, 2005).

Chez la souris, il a été montré que la délétion de la sous-unité δ produisait une perte concomitante de l'expression de la sous-unité $\alpha 4$ (Peng et al, 2002) et une réduction du courant tonique (Porcello et al, 2003). Il est aussi difficile de caractériser la composition en sous-unité des récepteurs extra-synaptiques car leur nature peut changer en fonction de l'âge et du type de neurones dans une même structure. Par exemple, comme il l'a été

montré dans les MSNs striataux chez les jeunes souris (P16-P25), le courant tonique GABAergique est plus grand dans les D2-MSNs que dans les D1-MSNs (Luo et al, 2013). Avec l'âge (souris âgées de 30 jours et plus), l'amplitude du courant tonique augmente dans les D1-MSNs alors qu'il diminue dans les D2-MSNs. Ceci provient du différentiel de nombre et du type de récepteurs extra-synaptiques présents sur les différentes populations de MSNs qui évolue avec l'âge de l'animal (Luo et al, 2013). En effet, chez les souris adultes, les récepteurs extra-synaptiques responsables du courant tonique dans le striatum sont composés des sous-unités $\alpha 4$ et δ , alors que chez les souris plus jeunes, le courant tonique est préférentiellement dû aux récepteurs extra-synaptiques contenant les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 3$. Le nombre de récepteurs GABA_A extra-synaptiques de composition $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ est plus important dans les neurones D2-MSNs que D1-MSNs alors que le nombre de récepteurs δ -GABA_A extra-synaptiques est identique entre les deux populations chez les jeunes souris. Avec l'âge, l'expression de la sous-unité δ augmente alors que celle de la $\alpha 5$ diminue. Ces changements d'expression étant responsables de modifications d'amplitude de courant tonique dans les deux types de MSNs (Santhakumar et al, 2010). De plus, la sous-unité $\beta 3$ n'est plus présente dans les récepteurs extra-synaptiques chez la souris adulte alors que son implication dans le courant tonique chez les jeunes souris a été démontrée (P16-P25) (Janssen et al, 2011). Cependant, la délétion de cette sous-unité dans les neurones D2-MSNs du striatum de souris adultes supprime les IPSCs spontanés suggérant son déplacement dans le pool de récepteurs synaptiques responsables de l'inhibition phasique (Luo et al, 2013).

- **Description et rôle physiologique de l'inhibition tonique**

Les concentrations de GABA extra-synaptiques sont estimées à environ 160 nM (Santhakumar et al, 2006) alors que les concentrations de GABA synaptiques sont autour de 3 mM (Mozrzymas et al, 2003) ce qui montre l'importance des propriétés des récepteurs extra-synaptiques dans ce mode de transmission. L'activation tonique des récepteurs GABA_A est importante précocement dans le développement pour la mise en place des synapses (Owens et al, 1999 ; Valeyev et al, 1993). Mais dans les neurones matures, le rôle de l'activation tonique des récepteurs GABA_A est plus controversé. Il a été décrit pour la première fois par des enregistrements en configuration « voltage imposé » dans les cellules granulaires du cervelet chez le rat (Kaneda et al, 1995). Dans cette étude, les antagonistes des récepteurs GABA_A (la bicuculline et la GABAzine) non seulement bloquent la transmission phasique correspondant aux IPSCs, mais diminuent aussi le courant de maintien requis pour maintenir le neurone au potentiel de membrane fixé (**Figure 25**).

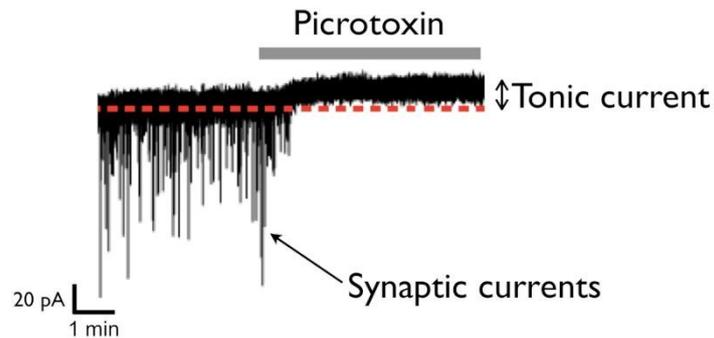


Figure 25: Exemple d'un enregistrement électrophysiologique obtenu sur une cellule granulaire du gyrus denté de l'hippocampe.

Les courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSCs) sont représentés par les déflexions noires. Ils sont inhibés par l'utilisation de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA_A. La picrotoxine bloque aussi le courant tonique alors visualisable par la modification du courant de maintien du neurone (flèche).

Ce mode d'inhibition a ensuite été décrit dans différentes régions cérébrales comprenant l'hippocampe, le thalamus (Cope et al, 2005), le cortex (Duguid et al, 2012) ainsi que le striatum (Ade et al, 2008). Cette présence de GABA dans l'espace extra-synaptique reflète l'activité et le nombre des éléments qui libèrent le GABA mais aussi l'action des transporteurs du GABA censés évacuer le neurotransmetteur de l'espace extracellulaire. Plusieurs groupes ont étudié comment l'inhibition tonique (IT) pouvait moduler l'excitabilité neuronale. Dans les cellules granulaires du cervelet, le blocage de l'IT par des antagonistes GABA_A diminue le courant nécessaire pour déclencher la décharge de PA montrant son implication dans l'excitabilité neuronale (Farrant & Nusser, 2005). L'IT dans le cortex cérébral pourrait aussi limiter les oscillations qui sont engendrées par l'inhibition phasique (Semyanov et al, 2003). De même dans l'hippocampe, la contribution des interneurons à la genèse d'oscillations neuronales pourrait aussi être affectée par l'inhibition tonique (Semyanov, 2003) puisque, en condition normale, la présence d'un courant tonique est observée dans les interneurons de l'hippocampe mais pas dans les cellules pyramidales. En effet, bien que l'IT soit présente dans les cellules pyramidales immatures, elle n'est généralement pas observée chez les animaux adultes. En condition contrôle, dans l'hippocampe, le blocage pharmacologique de l'IT par la picrotoxine augmente l'excitabilité des interneurons et conduit à une augmentation de fréquence des IPSCs dans les cellules pyramidales (Semyanov, 2003), ce qui suggère que la présence d'une IT dans les interneurons contribue à la régulation de l'inhibition phasique des cellules pyramidales (Semyanov, 2003). Il semble aussi que le GABA qui est libéré par les vésicules synaptiques peut contribuer à produire une inhibition tonique. Des changements d'activité pré-synaptique ou de libération peuvent donc modifier l'amplitude du courant tonique. Il a été montré dans

l'hippocampe que la stimulation des interneurons par le glutamate augmente l'IT GABAergique et celle des cellules pyramidales (Frerking et al, 1999; Kullmann & Semyanov, 2002). D'autre part, dans le cervelet, la facilitation de libération de GABA par l'acétylcholine augmente la conductance tonique. De plus, le blocage de l'activité neuronale par la tétrodotoxine (TTX, toxine bloquant les canaux Na⁺ voltage-dépendant) réduit la conductance tonique dans des neurones en culture (Petrini et al, 2004) suggérant que la libération de GABA neuronale participe de manière importante à l'inhibition tonique dans certaines structures. En adéquation avec ces résultats, il a été montré que le courant tonique des D2-MSNs est aboli par l'application de TTX (Ade et al, 2008). Les auteurs ont ainsi montré que ce courant tonique modulait l'excitabilité neuronale des MSNs puisque son inhibition augmente l'activité de décharge électrique des neurones de manière proportionnelle à son amplitude. Mais une autre source de GABA en provenance des cellules gliales a également été mise en évidence pour être responsable d'une IT (insensible à l'application de TTX) dans les cellules granulaires du cervelet et les MSNs striataux (Lee & Maguire, 2014). Selon certaines études, l'inhibition tonique semble avoir une grande importance dans la survie des neurones confrontés à un épisode d'excitotoxicité après une exposition au « NMDA ». En effet dans le striatum, les MSNs de souris où la sous-unité δ a été invalidée (souris *Gabrd^{-/-}*) montrent une réduction du courant tonique et une survie neuronale moins importante quand elles sont confrontées à un phénomène d'excitotoxicité en comparaison avec les souris contrôles. De plus, dans les souris contrôles, la potentialisation du courant tonique par le muscimol (agoniste des récepteurs GABA_A), semble protéger les neurones suite à un choc excitotoxique chez les souris contrôles comparées aux souris *Gabrd^{-/-}* qui présentent plus de mort neuronale. Ces données suggèrent que l'IT médiée par les récepteurs GABA contenant la sous-unité δ a un rôle neuroprotecteur dans le striatum de souris adulte (Santhakumar et al, 2010). Pour conclure sur l'ensemble de ces données, nous pouvons dire qu'alors que l'inhibition phasique inhibe les neurones sur une courte durée, l'inhibition tonique a un effet inhibiteur beaucoup plus persistant, qui diminue l'excitabilité globale des neurones à long terme.

- **Inhibition tonique et pathologie**

Une dérégulation de l'inhibition tonique a été identifiée dans beaucoup de pathologies comme le traumatisme crânien (Clarkson et al, 2010), l'épilepsie (Cope et al, 2009 ; Pirttimaki et al, 2013), l'anxiété (Botta et al, 2015) et la dépression (Liu et al, 2007b), les troubles du sommeil, la schizophrénie (Costa et al, 2005; Guidotti et al, 2005), le syndrome du X fragile, l'autisme (Pizzarelli & Cherubini, 2011) ou encore la maladie d'Alzheimer (Jo et al, 2014 ; Wu et al, 2014). De plus, l'alcool, en potentialisant les récepteurs GABA_A extra-

synaptiques augmente le courant tonique dans le cervelet et altère le comportement moteur (Hancher et al, 2005). L'ensemble de ces données insiste sur l'importance de l'IT GABAergique dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. D'autre part, l'activation tonique des récepteurs GABA_A précède l'activation phasique dans les états précoces du développement cérébral donc il est possible que l'IT soit nécessaire à la mise en place des réseaux neuronaux (Demarque et al, 2002 ; Liu et al, 2007a). En effet, plusieurs études ont montré que la potentialisation de l'IT chez les animaux immatures a des effets délétères sur la migration, la survie neuronale (Stratmann et al, 2009a) et la neurogénèse (Stratmann et al, 2009b) entraînant des effets néfastes sur les fonctions cérébrales (Satomoto et al, 2009) ; (Jevtovic-Todorovic et al, 2003; Loepke et al, 2009) ; (Stratmann et al, 2009a; Stratmann et al, 2009b). Dans ce système, les transporteurs du GABA jouent un rôle central dans la régulation du courant tonique. Des expériences *in vivo* montrent que dans l'hippocampe chez le rat, le transporteur neuronal GAT-1, préférentiellement localisé sur les terminaisons pré-synaptiques, joue un rôle majeur dans la recapture de GABA en condition contrôle alors que la recapture de GABA par le transporteur astrocytaire GAT-3 intervient seulement pendant la dépolarisation membranaire (Kersante et al, 2013). En revanche, dans le thalamus, GAT-1 et GAT-3 sont exclusivement localisés sur la glie et non sur les terminaisons pré-synaptiques (Kersante et al, 2013). Ainsi, selon les régions cérébrales, les mécanismes de régulation de la concentration de GABA ambiant peuvent différer et l'importance de chacun de ces transporteurs dans le maintien de ces concentrations extracellulaires également. Récemment, le dysfonctionnement des GATs, associé avec une augmentation de l'IT, a été impliqué dans plusieurs pathologies comprenant l'épilepsie de type absence (Cope et al, 2009) et la capacité de récupération fonctionnelle après un traumatisme crânien (Clarkson et al, 2010). Des dérégulations d'IT dues à une défaillance des transporteurs peuvent donc entraîner des dysfonctions cérébrales sévères.

➤ **L'inhibition tonique dans les épilepsies**

Concernant l'épilepsie en particulier, des modifications d'activité des récepteurs GABA_A synaptiques et extra-synaptiques ont été mises en évidence. En effet, l'augmentation de la signalisation GABAergique tonique a clairement été identifiée dans l'épilepsie de type absence (Cope et al, 2009 ; Pirrtimaki et al, 2013) et à l'inverse, sa diminution est quant à elle impliquée dans les épilepsies du lobe temporal (Pavlov & Walker, 2013). En effet, des mutations sur le gène *GABRD*, codant pour la sous-unité δ , provoquent une diminution de l'amplitude des courants GABA_A corrélée à une augmentation de l'activité neuronale globale ce qui est associé avec des formes génétiques d'épilepsies temporales humaines (Dibbens et al, 2004 ; Mulley et al, 2005). Concernant l'épilepsie de type absence, il a été montré chez plusieurs modèles rongeurs, qu'il se produit une augmentation du courant tonique dans les

neurones du thalamus qui a pour origine une altération de la recapture de GABA par les transporteurs. Plusieurs expériences ont permis d'aboutir à cette conclusion. Tout d'abord, il a été montré que l'activation sélective des récepteurs δ -GABA_A extra-synaptiques est suffisante pour induire un comportement assimilable à des crises d'absence chez les rats normaux (Cope et al, 2009). Puis, le dysfonctionnement des GATs a été suggéré comme étant la cause de l'IT grâce à des expériences de blocage pharmacologique des transporteurs (Cope et al, 2009). Cette hypothèse a finalement été vérifiée grâce à l'enregistrement des courants ioniques générés par la recapture du GABA par les transporteurs astrocytaires GAT-1 et GAT-3 chez le modèle génétique de rats GAERS (Pirttimaki et al, 2013). Cette étude a permis pour la première fois la mise en évidence directe d'une diminution de recapture de GABA par GAT-1 dans le thalamus en condition épileptique. Connaissant l'importance du maintien des niveaux d'IT dans le contrôle de l'activité des réseaux neuronaux (Vida et al, 2006), il n'est pas surprenant que cibler les transporteurs ou les récepteurs δ -GABA_AR puisse être bénéfique pour ce type de pathologie.

➤ **L'inhibition tonique et traumatisme crânien**

En se basant sur des résultats obtenus sur le cortex sensorimoteur chez l'homme, il a été montré qu'après une atteinte cérébrale, il se produit une profonde réorganisation qui apparaît rapidement (moins d'une heure) après la lésion. La plasticité cérébrale apparaissant après le traumatisme est particulièrement importante car elle peut faciliter ou entraver la récupération fonctionnelle. Cette plasticité apparaît après un traumatisme crânien particulièrement en périphérie de la zone lésée (Murphy & Corbett, 2009). Cette réorganisation corticale semble être corrélée avec une diminution du niveau de GABA dans la région lésée. De ce fait, il a été suggéré que la réduction de libération de GABA est un mécanisme intervenant dans la régulation d'une plasticité corticale rapide et donc, que la récupération fonctionnelle après une atteinte cérébrale pouvait être sous le contrôle de l'inhibition GABAergique (Levy et al, 2002). Des résultats allant dans le même sens ont été trouvés dans un modèle murin de traumatisme crânien, où l'augmentation de la taille de la lésion corticale était proportionnelle à l'amplitude du courant tonique. Cette étude montre que l'augmentation de l'IT, causée par une diminution de fonction des transporteurs (GAT-3/GAT-4) suite à un traumatisme crânien, peut jouer en défaveur de la plasticité cérébrale (Clarkson et al, 2010). Ainsi, le blocage pharmacologique des récepteurs GABA_A extra-synaptiques corticaux aide à la récupération de la fonction motrice de manière rapide et soutenue. Ces résultats indiquent l'existence d'un mécanisme reliant le niveau d'IT à la capacité de plasticité cérébrale. Cette capacité de plasticité cérébrale est importante pour une récupération fonctionnelle après une lésion cérébrale mais également dans des fonctions physiologiques cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire. L'ensemble de ces données suggère que cibler les récepteurs

GABA_A extra-synaptiques responsables de l'IT pourrait aider à la récupération fonctionnelle après une lésion cérébrale.

➤ L'inhibition tonique dans la maladie d'Alzheimer

Dans la maladie d'Alzheimer, des études ont montré une altération de la transmission GABAergique. Des marquages immunohistochimiques révèlent une réduction significative des synapses GABAergiques dans plusieurs régions cérébrales de patients incluant le cortex temporal, l'hippocampe et le putamen (Schwab et al, 2013). Il est également observé une diminution des entrées GABAergiques dues à une perte d'excitabilité des interneurons PV chez les modèles animaux conduisant à une hyperactivité globale des réseaux neuronaux (Verret et al, 2012). Cependant, chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer, l'administration d'antagonistes de récepteurs GABA_A améliore la mémoire et la potentialisation à long terme dans l'hippocampe (Yoshiike et al, 2008) suggérant à l'inverse une augmentation de transmission GABAergique qui pourrait être responsable des déficits mnésiques et cognitifs dans cette pathologie. Depuis, deux études ont également appuyé cette hypothèse. La première, réalisée chez des souris « 5xFAD », modèles de la maladie Alzheimer, a montré que les astrocytes réactifs sont très riches en GABA et possèdent plus de transporteurs gliaux GAT3/4 que les souris normales (**Figure 26**) (Wu et al, 2014).

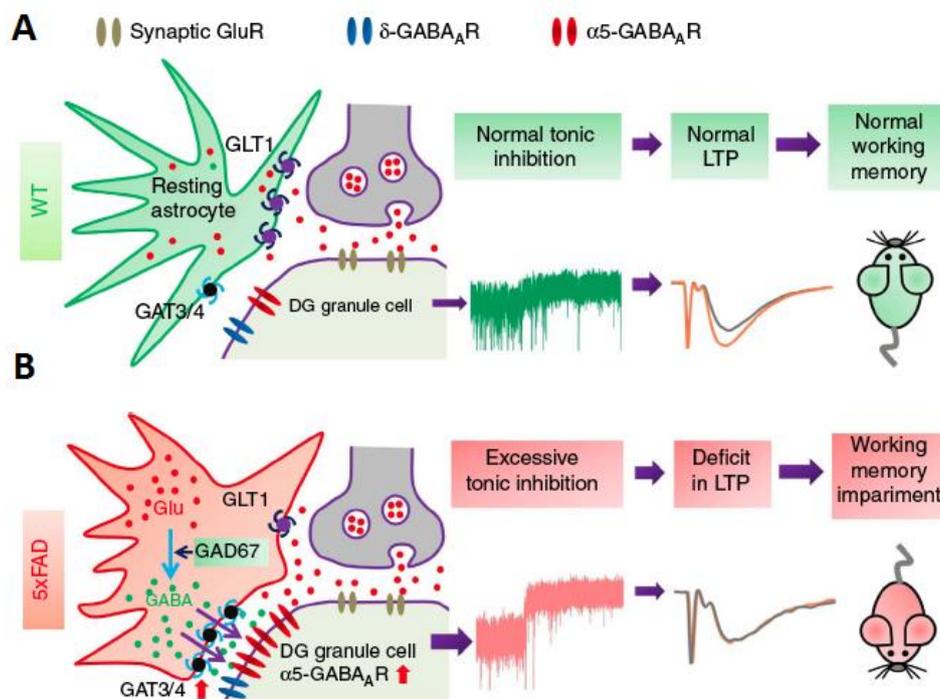


Figure 26: Altération de la synapse tripartite au niveau des cellules granulaires du gyrus denté chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (5xFAD). A. Les cellules granulaires du gyrus denté (DG) de l'hippocampe de souris témoins (WT) présentent une inhibition tonique modérée, la capacité de produire une LTP, des transporteurs GAT-3/4 gliaux et des récepteurs δ-GABA_A et α5-GABA_A. Les animaux ont des performances cognitives normales. B. Les souris "5xFAD" affichent quant à elles des taux anormalement élevés de glutamate et de GABA

extracellulaires, une sur-expression des récepteurs δ -GABA_A et $\alpha 5$ -GABA_A et du nombre de transporteurs GAT3/4 gliaux sur des astrocytes réactifs. L'inhibition tonique est significativement augmentée, la LTP supprimée et les animaux présentent des déficits mnésiques et d'apprentissage (Wu et al, 2014).

Ces résultats ont aussi été confirmés dans les astrocytes d'hippocampe de patients. Chez les modèles animaux, il en résulte une augmentation de l'IT dans l'hippocampe en condition pathologique alors que cette libération gliale est très faiblement observée dans l'hippocampe en condition normale (Yoon et al, 2011). Cette augmentation de GABA extracellulaire est reliée à l'apparition de déficits mnésiques. D'après cette étude, le GABA, responsable de l'IT aberrante en conditions pathologiques, est libéré par le fonctionnement inversé des transporteurs GAT3/4 car leur blocage réduit le courant tonique et rétablit la mémoire et la potentialisation à long terme dans l'hippocampe des souris (Wu et al, 2014). Ces données suggèrent que l'IT aberrante observée dans l'hippocampe lors de la maladie d'Alzheimer participe de manière prédominante aux déficits mnésiques (Wu et al, 2014). La deuxième étude a mis en évidence une voie de synthèse du GABA atypique dans les astrocytes puisqu'elle implique entre autre la MAOB (Jo et al, 2014). Il a aussi été montré en post-mortem chez les patients Alzheimer une surexpression de GABA et de MAOB astrocytaire au niveau de l'hippocampe. De la même manière que dans l'étude précédente, le blocage de la synthèse de GABA astrocytaire, par des inhibiteurs de MAOB, rétablit les déficits observés dans cette pathologie incluant l'activité électrique neuronale, la plasticité synaptique et la capacité d'apprentissage et de mémorisation chez les souris. En revanche, contrairement aux travaux de Wu et collègues, les auteurs suggèrent que le GABA serait libéré par les canaux bestrophine 1 dans l'hippocampe lors de la maladie d'Alzheimer. Ces études s'accordent sur le fait qu'une augmentation de l'IT dans l'hippocampe, due à une libération de GABA astrocytaire, est responsable du moins en partie de la symptomatologie de la maladie d'Alzheimer.

C3. Pharmacologie des récepteurs GABA_A

- **Agonistes**

La sensibilité des récepteurs GABA_A aux substances pharmacologiques dépend de leur composition en sous-unités (**Figure 27**). L'exemple de plus probant est le rôle de la sous-unité α dans l'affinité des récepteurs aux benzodiazepines (largement utilisées comme modulateurs allostériques positifs des récepteurs GABA_A pour leurs effets sédatifs et anxiolytiques). En effets, les récepteurs composés des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 5$ avec 2 sous-unités βx et 1 $\gamma 2$ ont une haute affinité pour le « diazepam » et en général les

récepteurs contenant la sous-unité $\alpha 1$ sont très sensibles au « zolpidem » (apparenté benzodiazepines). Les récepteurs possédant les sous-unités $\alpha 4$ ou $\alpha 6$ sont eux insensibles aux benzodiazepines, comme ceux possédant la sous-unité δ à la place de $\gamma 2$ (Barnard et al, 1998). Dans les neurones de l'hippocampe, le zolpidem module les paramètres cinétiques des IPSCs mais n'a pas d'effets sur le courant tonique (Nusser & Mody, 2002) alors que le midazolam (benzodiazepines) augmente le courant tonique ce qui est en accord avec la présence de récepteurs $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ (Caraiscos et al, 2004). Cependant, le courant tonique dans les interneurones CA1 est également augmenté par le zolpidem ce qui contraste avec la présence de $\alpha 5$ dans les récepteurs extra-synaptiques. Mais l'augmentation de l'IT avec des modulateurs allostériques est difficile à interpréter dans la mesure où ces drogues qui augmentent l'affinité des récepteurs pour leur substrat peuvent agir sur différentes populations de récepteurs comme les récepteurs synaptiques qui ne sont pas normalement activés par de faibles concentrations de GABA.

Peu d'agonistes des récepteurs $GABA_A$ montrent une claire sélectivité pour l'une ou l'autre des sous-unités. Le seul agoniste qui montre un profil d'action bien différent pour la sous-unité δ et qui permet ainsi de différencier les populations de récepteurs synaptiques et extra-synaptiques est le « 4,5,6,7-tetrahydroisothiazolo-[5,4-c]pyridin-3-ol » appelé « THIP » ou « Gaboxadol » par son nom générique. Dans des neurones du cervelet et des interneurones corticaux, des expériences ont montré que le THIP était très sélectif pour la sous-unité δ à des concentrations inférieures ou égales à $1\mu M$ (Meera et al, 2011). Ce composé est un agoniste partiel des récepteurs $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ mais est un « super » agoniste des récepteurs $\alpha 4\beta 3\delta$, qui produit une réponse supérieure à celle produite par le GABA (Brown et al, 2002). L'inhibition tonique s'est également révélée être hautement sensible aux stéroïdes neuroactifs endogènes (Brown et al, 2002 ; Wohlfarth et al, 2002), aux anesthésiques intraveineux ou volatiles tels que l'isoflurane, à certains agents neurotrophiques tels que le « Brain derivate neurotropic factor » (BDNF) (Vaz et al, 2008) et à l'alcool (Sundstrom-Poromaa et al, 2002). En adéquation avec la sélectivité des récepteurs $GABA_A$ contenant la sous-unité δ aux neurostéroïdes, l'application du neurostéroïde « allotetrahydrodeoxycorticosterone » (THDOC), utilisé à des concentrations physiologiques *in vivo*, augmente significativement le courant tonique qui est médié par des récepteurs extra-synaptiques $GABA_A$ composés de la sous-unité δ dans les cellules granulaires du gyrus denté et du cervelet sans aucune modification sur la transmission phasique (Stell et al, 2003). De manière similaire, l'éthanol augmente la conductance tonique dans les cellules granulaires du gyrus denté par une action sélective sur la sous-unité δ (Wei et al, 2004). Cependant, une étude intéressante a aussi montré que la consommation d'alcool pouvait altérer la coordination motrice à cause d'une augmentation de l'IT médiée par des récepteurs

$\alpha 6\beta 3\delta$ dans les cellules granulaires du cervelet. Ces anomalies sont causées par une mutation représentant un polymorphisme de la sous unité $\alpha 6$ qui rend les récepteurs $\alpha 6$ -GABA_A plus sensibles à la potentialisation par l'éthanol et donc les rats intolérants à l'alcool (Hanchar et al, 2005).

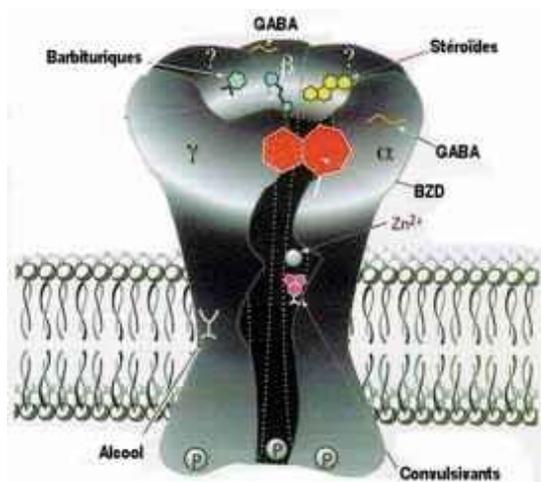


Figure 27: Représentation schématique d'un récepteur GABA_A avec ses différents sites allostériques sur lesquels agissent les substances pharmacologiques. Zn^{2+} : Zinc ; BZD : benzodiazépines. Les symboles « P » entourés d'un cercle noir représentent les sites de phosphorylation du récepteur.

- **Antagonistes**

Pour l'étude de la transmission GABAergique, de multiples antagonistes compétitifs et non compétitifs ont été développés. Tous les récepteurs GABA_A sont bloqués par de hautes concentrations de bicuculline, de picrotoxine et de GABAzine (SR-95531). Cependant des concentrations de GABAzine inférieures au μM bloquent sélectivement la transmission phasique (Semyanov et al, 2003; Stell & Mody, 2002) ce qui est en accord avec le fait que ces récepteurs synaptiques ont une plus faible affinité pour le GABA que les récepteurs extra-synaptiques (Stell & Mody, 2002). Il est important de noter que les différents antagonistes ont des mécanismes d'actions différents qui présentent certains avantages et inconvénients. Par exemple, la bicuculline n'est pas un bloqueur spécifique des récepteurs GABA_A puisqu'elle peut aussi bloquer certains canaux K^+ activés par le Ca^{2+} à des concentrations similaires que celles utilisées pour le blocage des récepteurs GABA_A (Seutin & Johnson, 1999). La picrotoxine (PTX) est un antagoniste spécifique non compétitif puisqu'elle se fixe sur un site situé dans le canal ionique et donc encombre le passage des ions au travers du pore (Erkkila et al, 2008; Inoue & Akaike, 1988; Sedelnikova et al, 2006; Takeuchi & Takeuchi, 1969). Cependant plusieurs études ont montré que la PTX bloque le canal chlore des récepteurs GABA_A et le stabilise dans un état fermé ou désensibilisé non conducteur (Korshoej et al, 2010; Krishek et al, 1996; Newland & Cull-Candy, 1992; Smart & Constanti, 1986) alors que la bicuculline et la GABAzine sont des antagonistes compétitifs qui empêchent le GABA de se fixer sur son site de liaison et donc préviennent l'activation

des récepteurs GABA_A (Akaike et al, 1987). De plus, ces deux drogues agissent comme des inhibiteurs allostériques négatifs de l'ouverture du canal, inhibant l'activation des récepteurs GABA_A par les agents anesthésiques. La bicuculline étant la plus efficace sur cet aspect (Ueno et al, 1997). Cette capacité supérieure d'inhibition est susceptible d'expliquer la capacité de la bicuculline, contrairement à la gabazine, de bloquer l'ouverture spontanée du canal GABA_A dans les neurones de l'hippocampe (Bai et al, 2001; McCartney et al, 2007; Mtchedlishvili & Kapur, 2006; Wlodarczyk et al, 2013). Le zinc (Zn²⁺) a été un outil pharmacologique particulièrement utile pour identifier les récepteurs responsables de l'IT puisqu'il bloque les récepteurs αβ et αβδ avec une affinité nettement plus élevée (IC₅₀ respectif de 88 nM et de 6-16 μM) que celle pour les récepteurs contenant la sous-unité γ2 (IC₅₀ de 300 μM) (Hosie et al, 2003; Krishek et al, 1998). L'application de Zn²⁺ a été utilisée pour détecter l'implication des récepteurs ne contenant pas la sous-unité γ2 dans la génération de courant tonique au niveau du thalamus (Jia et al, 2005; Nani et al, 2013). Connaissant la sensibilité des récepteurs GABA_A au Zn²⁺, il n'est pas surprenant que le Cu²⁺, qui partage de nombreuses caractéristiques avec le Zn²⁺ et qui est connu pour inhiber les récepteurs GABAergiques chez les invertébrés, inhibe également les récepteurs GABA_A impliqués dans l'IT (McGee et al, 2013). Le cation trivalent lanthanum (La³⁺), est également un inhibiteur sélectif de certains récepteurs GABA_A extra-synaptiques, montrant une inhibition puissante sur les récepteurs α4/α6βδ et une potentialisation du GABA sur les récepteurs α1βδ/γ2 (Brown et al, 2002; Im et al, 1992; Kaur et al, 1997; Storustovu & Ebert, 2006). Cependant, le La³⁺ n'a été utilisé que rarement dans les études de conductances toniques, probablement en raison de sa faible efficacité d'inhibition (Storustovu & Ebert, 2006).

C4. Interactions entre les systèmes Dopaminergique et GABAergique

De plus en plus de données montrent que des interactions peuvent exister entre les systèmes dopaminergique et GABAergique dans le cerveau vraisemblablement attribuables à des interactions fonctionnelles entre leurs récepteurs respectifs (Liu et al, 2000a). Ces interactions peuvent être médiées par les cascades de signalisation que l'activation de ces récepteurs entraîne ou par une interaction directe entre eux. En effet, une interaction protéine-protéine entre la partie c-term du récepteur dopaminergique D5 et la seconde boucle intracellulaire des récepteurs GABA_Aγ2 a été identifiée (Liu et al, 2000a). Le couplage mutuel direct entre D5R-GABA_AR inhibe l'activité de ces deux récepteurs. En d'autres mots, l'activation du récepteur GABA_Aγ2 inhibe la capacité qu'a le récepteur D5 à activer l'AC alors que l'activation du récepteur D5 diminue l'inhibition médiée par le récepteur GABA_Aγ2 (Liu et

al, 2000a). Cette étude est la seule à ce jour à avoir montré une interaction directe protéine-protéine entre les récepteurs GABA_A et ceux à la dopamine. Néanmoins, il a été montré que les récepteurs D1 et D2 des MSNs striataux modulent le courant tonique GABAergique chez les souris par une cascade de signalisation intracellulaire (Janssen et al, 2009). L'activation des récepteurs D2 diminue le courant tonique dans les D2-MSNs de la voie indirecte alors que l'activation des récepteurs D1 augmente le courant tonique dans les D1-MSNs (Janssen et al, 2009). Cette modulation dopaminergique du courant tonique est liée à des changements d'états de phosphorylation des récepteurs GABA_A extra-synaptiques. Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ sont des substrats de phosphorylation par la PKA (protéine kinase A) (Janssen et al, 2009). De manière surprenante, la dopamine et l'application intracellulaire de PKA n'altère pas les courants synaptiques GABA_A dans le striatum (Janssen et al, 2009) bien qu'il est connu dans d'autres régions que les récepteurs GABA_A synaptiques soient les cibles de cette voie de signalisation (McDonald et al, 1998 ; Nusser et al, 1999). En conclusion, la dopamine module la transmission GABAergique tonique mais pas la transmission phasique dans le striatum. Une autre étude réalisée sur des neurones striataux en cultures, révèle à travers des enregistrements électrophysiologiques que la dopamine peut directement activer ou inhiber des récepteurs GABA_A en fonction de leur composition en sous-unités. La modulation dopaminergique des récepteurs GABA_A nécessite obligatoirement la présence des sous-unités β et γ mais nul besoin de la sous unité α (Hoerbelt et al, 2015). Il faut noter néanmoins que dans cette étude les concentrations de dopamine nécessaires pour activer les récepteurs est de l'ordre du millimolaire.

Dans le thalamus, au niveau du noyau ventrobasal (VB) de rats en condition normale, l'IT provoquée par l'activation des récepteurs GABA_A extra-synaptiques est modulée par l'action de la DA (Yague et al, 2013). En effet, la dopamine ainsi que le quinpirole (agoniste des récepteurs D2) et le PD-168,077 (agoniste sélectif des récepteurs D4) diminuent l'amplitude du courant tonique dans les neurones du VB alors que le SKF39383 (agoniste des récepteurs D1-Like) n'a pas d'effet probant sur le courant tonique. D'autre part, l'activation des récepteurs D1/D2 ne modifie pas la fréquence des IPSCs spontanés (Yague et al, 2013). Ce résultat suggère que l'effet de la dopamine sur le courant tonique n'est pas lié à une action pré-synaptique qui provoquerait une diminution de libération de GABA vésiculaire puisque elle ne modifie pas la transmission synaptique phasique.

3. Les transporteurs du GABA

A. Définition

Les transporteurs du GABA font partie de la famille des transporteurs SLC6 (The solute carrier 6). Les transporteurs SLC6 utilisent un gradient de Na^+ ou un co-transport de Na^+/Cl^- , pour coupler un « symport » de neurotransmetteurs et d'ions (Pramod et al, 2013). Selon le substrat qu'ils transportent, ils peuvent être divisés en 4 groupes : 1) les transporteurs aux neurotransmetteurs qui comprennent ceux du GABA (GAT), de la glycine (GLY) et des monoamines (dopamine (DAT), sérotonine (SERT) et norepinephrine (NET)), 2) les transporteurs des acides aminés qui incluent les transporteurs de la proline (PROT, IMINO) et ceux des aminoacides cationiques et neutres, 3) les transporteurs osmolytes qui sont ceux de la Bétaine (BGT1), de la taurine (TauT) et de la créatine (CT) et enfin 4) un transporteur orphelin.

Le transport du GABA est lui dépendant des ions sodium (Na^+) et chlore (Cl^-). L'ion Cl^- se fixe sur un site proche du site de fixation du GABA et augmente l'affinité du transporteur pour son substrat. Le gradient Na^+ est nécessaire au transport du GABA dans la cellule, 2 ions Na^+ étant transportés dans la cellule avec le GABA, le symport est électrogénique ($2 \text{Na}^+ / 1 \text{Cl}^- / 1 \text{GABA}$) (Pramod et al, 2013). L'inversion du gradient Na^+ provoque une libération de GABA à partir des neurones ou des cellules gliales ce qui peut être à l'origine de processus pathologiques. Un dysfonctionnement des transporteurs SLC6 a été relié à un certain nombre d'affections comprenant en outre l'hyperactivité (Mazei-Robison et al, 2008), l'épilepsie de type absence (Cope et al, 2009), les troubles de l'humeur, l'anxiété ou encore la dépression (Hahn et al, 2008). L'importance des transporteurs du GABA (GATs) est bien connue dans le contrôle de la dynamique des niveaux de GABA extracellulaires (Richerson & Wu, 2003). L'activité des GATs peut dépendre du potentiel de membrane des cellules, des concentrations de GABA extracellulaires et des gradients transmembranaires pour le transport du GABA. Ils peuvent également représenter une potentielle source de GABA en inversant leur fonctionnement lors de certaines conditions pathologiques ou de modulations pharmacologiques qui augmentent les concentrations de GABA intracellulaires (Richerson & Wu, 2003 ; Wu et al, 2003). Il est aussi connu que les transporteurs peuvent rapidement se redistribuer entre le compartiment intracellulaire et la surface membranaire et que leur activité peut être modulée par certaines kinases et notamment la PKA et la PKC (Corey et al, 1994). Ainsi, cette redistribution des GATs à la membrane pourrait, sans changement dans la libération de GABA, moduler localement la recapture du GABA entraînant des variations de concentrations extracellulaires de GABA qui affecteraient l'inhibition tonique et phasique.

B. Structure

Les transporteurs SLC6 ont 12 domaines trans-membranaire (TM), de longues parties N-terminale et C-terminale intracellulaires médiant une large signalisation intracellulaire et une boucle extracellulaire entre les TM 3 et 4 (Foster & Vaughan, 2011). Bien que les transporteurs des procaryotes n'aient pas la même constitution que ceux des eucaryotes, ils présentent plus de 50% d'homologie entre eux, notamment concernant leur partie centrale « LeuT » où est situé leur domaine de liaison au substrat. La cristallisation des transporteurs chez la bactérie a permis d'établir la structure architecturale des transporteurs SLC6. Les transporteurs SLC6 ont une architecture de 5 + 5 hélices, où TMs 1–5 et TMs 6–10, qui forment deux pentahélices, sont alignées de manière antiparallèle et symétrique (**Figure 28**). Les TMs 1 et 6 forment avec les TMs 3 et 8 le site de liaison du substrat (S1) qui est localisé centralement à travers la membrane plasmique. Ce motif est très conservé parmi les espèces eucaryotes et procaryotes (Yamashita et al, 2005). Deux ions Na⁺ lient le substrat de manière proximale sur les sites Na1 et Na2 et le site de liaison pour le Cl⁻ se trouverait localisé près du site Na1. Il s'agit d'un mécanisme de portes impliquant deux paires de résidus chargés, positionnés en dessus et en dessous de S1 qui s'ouvrent et se ferment (Krishnamurthy et al, 2009). Des données suggèrent l'existence d'un deuxième site de fixation au substrat (S2) qui serait cytoplasmique (Reyes & Tavoulari, 2011) mais ceci n'est pas précisément déterminé à l'heure actuelle car une autre étude suggère la présence de S1 uniquement (Piscitelli et al, 2010). Bien que ces transporteurs soient considérés comme des monomères, des études ont montré qu'ils pouvaient s'associer en oligomères. Cette structure conformationnelle des transporteurs aurait un impact sur leur interaction avec des protéines intracellulaires, modulerait leur trafic à la surface membranaire ainsi que leur mode de fonctionnement (Sitte et al, 2004). En effet, les parties N et C-terminales de ces transporteurs sont connues pour interagir avec de nombreuses protéines de signalisation et certaines kinases (notamment la PKC) régulant leur expression, leur activité et leur dégradation (Pramod et al, 2013).

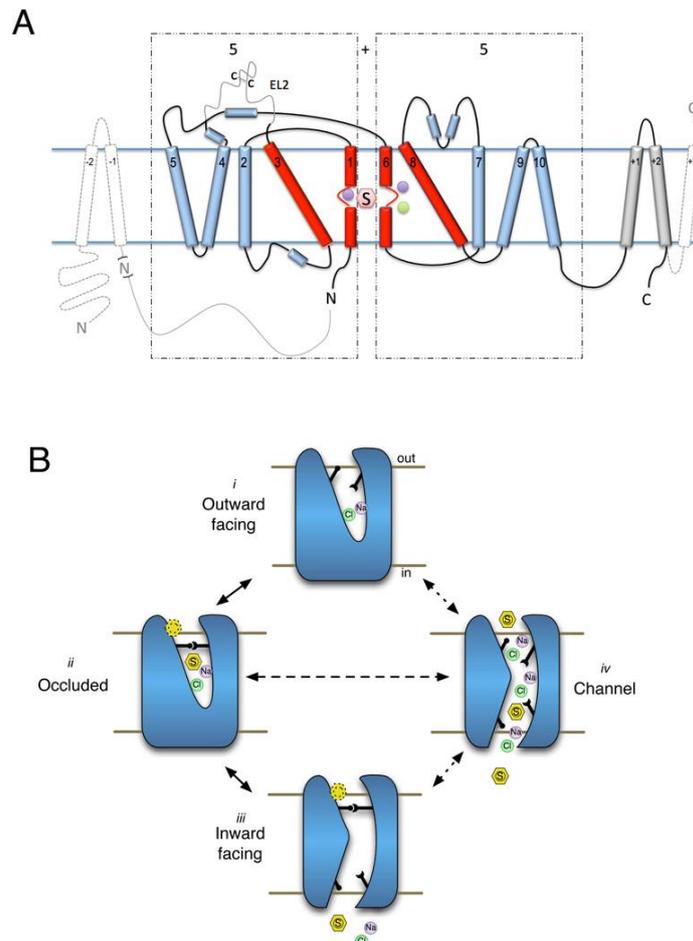


Figure 28: Structure typique d'un transporteur de la famille SLC6. A. Architecture hélicoïdale des transporteurs où les domaines transmembranaires TM 1, 3, 6, 8 forme le site de liaison du substrat (cylindres rouges) combinés avec les TM 2, 4, 5 et 7, 9, 10 (cylindres bleus) formant les domaines hélicoïdaux anti-parallèles. TM 11 et 12 (cylindres gris) sont localisés en périphérie du motif 5+5 (leur partie centrale « LeuT »). S : Substrat; Na^+ : sphères violettes; Cl^- : sphères vertes. B. Illustration des différents états des transporteurs. Les branches noires représentent les portes d'accès dans les transporteurs qui peuvent être ouvertes ou fermées. Le transport de neurotransmetteurs peut donc se faire quand les portes d'accès sont simultanément ouvertes. S : Substrat; Na^+ : sphères violettes; Cl^- : sphères vertes.

C. Sous-types de transporteurs GABAergiques

A l'heure actuelle, 4 types différents de transporteurs au GABA ont été décrits : GAT-1, GAT-2, GAT-3, et le transporteur bêtaïne/GABA type 1 (BGT-1). Leur séquence en acides aminés est relativement similaire entre les différentes espèces de mammifères (Borden, 1996).

GAT 1 (codé par le gène SLC6A1) est le principal transporteur de GABA dans le cerveau. Il est principalement localisé sur les neurones (Song et al, 2013) même si l'on retrouve, dans certaines structures cérébrales, sa présence sur les corps astrocytaires. De par son contrôle des concentrations extracellulaires de GABA, il a un rôle prépondérant dans la régulation de la signalisation GABAergique (Razik et al, 2013).

GAT-3 (codé par le gène *SLC6A11*) est principalement exprimé sur les cellules gliales mais peut être aussi présent sur les synapses GABAergiques ce qui suggère qu'il participe activement à la régulation de la signalisation GABAergique. Tout comme GAT-1, GAT3 est la cible des médicaments anticonvulsivants.

GAT-2 (*SLC6A13*), affiche un haut niveau d'homologie avec GAT-3 (67% d'acides aminés en commun), cependant il n'est pas exprimé sur les synapses GABAergiques bien qu'il soit présent dans le cerveau, les méninges et la rétine ainsi que dans le foie et les reins.

Contrairement aux autres transporteurs, BGT-1 utilise à la fois le GABA et la bêtaïne comme substrat. BGT-1 dont la localisation est similaire à celle de GAT-2, affiche 68% et 65% d'homologie avec GAT-2 et GAT-3, respectivement.

D. Les transporteurs du GABA dans le GPe

D.1 Localisation des transporteurs GAT-1/GAT-3 dans le GPe

Les transporteurs GAT-1 et GAT-3 sont les seuls transporteurs GABAergiques identifiés (et largement exprimés) dans les différents noyaux composant les GB. Dans le GPe de rat, les ARNm des transporteurs GAT-1 et GAT-3 sont fortement exprimés (Durkin et al, 1995 ; Yasumi et al, 1997). On retrouve également un fort immunomarquage pour ces deux transporteurs dans le GPe chez le rat et le singe (**Figure 29**) (Galvan et al, 2005 ; Jin et al, 2011b). Les études de microscopie électronique révèlent que GAT-1 est principalement présent sur les axones non myélinisés mais une faible proportion est également retrouvée sur les prolongements astrocytaires chez le singe (Jin et al, 2011b). Contrairement à GAT-1, GAT-3 est exclusivement exprimé sur les prolongements astrocytaires (Jin et al, 2011b) étroitement apposés sur les synapses GABAergiques ou entourant les complexes axo-dendritiques des neurones pallidiaux (Jin et al, 2011b). La forte expression de ces transporteurs dans le GPe de rats et de singes suggère un rôle de ces transporteurs dans le contrôle des concentrations de GABA extracellulaires (Jin et al, 2011b). En effet, il a été montré que le blocage pharmacologique des transporteurs GAT-1 et GAT-3 dans le GPe de primates non-humain et de rats, produit une augmentation des concentrations de GABA extracellulaires, ce qui réduit l'activité électrique des neurones pallidiaux (Jin et al, 2011a; Jin et al, 2011b). Ces données suggèrent que dans le GPe toute dysfonction de ces transporteurs pourrait produire une transmission GABAergique aberrante. Toutefois, malgré une augmentation des concentrations de GABA extracellulaires dans le GPe (Ochi et al, 2000) et l'hypoactivité des neurones pallidiaux connues dans la MP (Ingham et al, 1997, Kita, 2011 #3221; Mallet et al, 2006) il n'y a pas de changement significatif de la localisation

de ces transporteurs chez le singe MPTP (Galvan et al, 2010) ce qui ne veut pas dire que leur taux d'expression n'est pas altéré pour autant. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle majeur des systèmes de recapture du GABA dans le fonctionnement normal et pathologique du GPe et font d'eux des candidats très attrayants en terme de cible thérapeutique notamment dans la MP où les concentrations et la transmission GABAergique sont largement dérégulées.

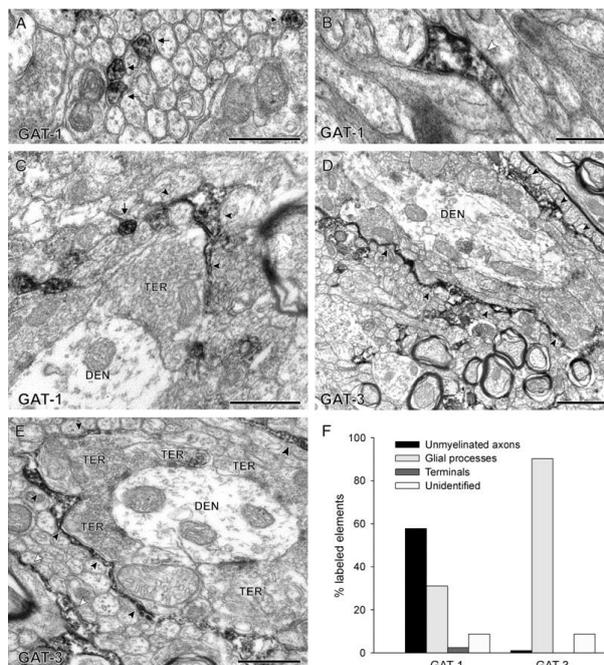


Figure 29: Localisation des transporteurs GAT-1 et GAT-3 dans le GPe chez le singe.

A: le marquage de GAT-1 est indiqué par une flèche noire sur un axone non myélinisé. B: marquage de GAT-1 sur les prolongements astrocytaires (flèche blanche). C: Marquage de GAT-1 sur un prolongement astrocytaire entourant une terminaison axonale (TER) à proximité d'une dendrite (DEN). Dans le même champ, nous pouvons voir le marquage de GAT-1 sur un axone non myélinisé (flèches noires) D et E: Marquage de GAT-3 sur les prolongements astrocytaires (flèches noires) entourant un complexe axo-dendritique. En E nous pouvons voir des prolongements astrocytaires qui ne sont pas associés avec des terminaisons GABAergiques (flèches blanches). F: Distribution graphique du marquage de GAT-1 et GAT-3 sur les différents éléments cérébraux. Les données sont exprimées en pourcentage des éléments immunomarqués, le 100% étant le nombre total d'éléments examinés. Barre d'échelle : A, C, et E, 0.5 μ m; B, 0.2 μ m; D, 1 μ m. (Galvan et al, 2005)

D.2 Rôle fonctionnel des transporteurs du GABA dans le GPe

Chez le singe et le rat en condition contrôle, l'injection intrapallidale d'un antagoniste des transporteurs GAT-1, la tiagabine, augmente les concentrations de GABA extracellulaires (Fink-Jensen et al, 1992 ; Galvan et al, 2005). Ces expériences ont également révélé que cette manipulation des transporteurs réduisait la fréquence de décharge des neurones pallidiaux chez le singe (Galvan et al, 2005; Jin et al, 2011b). De manière intéressante, les mêmes expériences réalisées chez le singe MPTP révèlent une forte diminution de la décharge des neurones GPi alors que cela a peu d'effets sur les neurones du GPe (Galvan et al, 2010).

En accord avec les données obtenues chez le singe, l'application de ce même antagoniste de GAT-1 sur des tranches aigues de cerveau de rat, modifie la transmission synaptique.

Notamment, les cinétiques et la fréquence des IPSCs spontanés et miniatures (Jin et al, 2011b) sont modifiées, mais sans modifications de l'amplitude de ces courants. Cette action passe donc probablement par des récepteurs GABA_B pré-synaptiques. De plus, cette manipulation de GAT-1 induit l'apparition d'un courant tonique médié par les récepteurs GABA_A extra-synaptiques dans le GPe (Jin et al, 2011b). Ces résultats suggèrent que GAT-1 régule les concentrations de GABA extracellulaires de par son action de recapture de GABA extracellulaire ainsi que la libération de GABA striato-pallidale par une action sur les récepteurs GABA_B pré-synaptiques (Galvan et al, 2006). D'un point de vue comportemental, il a été montré que le blocage unilatéral de GAT-1 produisait des rotations ipsilatérales chez le rat (Chen & Yung, 2003). Etant donné les altérations de la transmission GABAergique dans le GPe dans la MP, il serait intéressant d'étudier le rôle des GATs dans la physiopathologie de cette maladie.

Concernant GAT-3 et connaissant son fort niveau d'expression dans le GPe chez le singe et le rat, son rôle dans le contrôle de la transmission GABAergique doit être primordial. Il a été montré que le blocage de GAT-3 par infusion locale d'antagoniste *in vivo* dans le GPe, augmente la concentration de GABA extracellulaire et inhibe l'activité pallidale chez le singe (Jin et al, 2011a). De plus, *in vitro*, son blocage modifie les cinétiques de transmission synaptique GABAergique dans le GPe chez le rat et induit un courant tonique (Jin et al, 2011b). GAT-3 peut également réduire la transmission glutamatergique en permettant l'activation des récepteurs GABA_B situés sur les synapses asymétriques subthalamo-pallidales (Jin et al, 2011a). Contrairement au GPe, le blocage de GAT-3 dans le STR est largement masqué par l'action de GAT-1 (Kirmse et al, 2009), ce qui est cohérent avec son faible niveau d'expression dans ce noyau. L'ensemble de ces données suggère que les transporteurs GATs jouent un rôle important dans la régulation de la transmission GABAergique dans le GPe.

E. Modulation de l'activité des transporteurs du GABA par les neuromodulateurs

Une interaction entre les transporteurs GATs et d'autres systèmes impliqués également dans la MP a été établie. La recapture du GABA peut être augmentée par l'activation des récepteurs CB1 (cannabinoïdes 1) dans le GPe chez le rat (Venderova et al, 2005), ce qui pourrait être utilisé pour compenser l'hyperactivité de la transmission GABAergique striato-pallidale dans la MP. Mais le mécanisme le plus renseigné et le plus prometteur dans le

traitement de la MP à l'heure actuelle concerne la modulation de la transmission GABAergique dans les GB par l'adénosine. En effet, une étude a montré que l'adénosine, par une action sur ses récepteurs A2A, inhibe la recapture de GABA par GAT-1 dans le GPe (Gonzalez et al, 2006). Cet effet a également été montré dans d'autres structures et notamment dans le cortex (Cristovao-Ferreira et al, 2011). De manière cohérente, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs A2A a de bons effets antiparkinsoniens, qui pourraient être dus en partie à une action présynaptique sur la voie striato-pallidale de désinhibition de l'activité de GAT-1. Ce mécanisme de modulation de l'activité de GAT-1 pourrait expliquer les effets antiparkinsoniens de l'adénosine mais d'autres hypothèses ont également été envisagées.

La production d'adénosine dans le cerveau est due à la synthèse/dégradation de l'AMP/ATP. Les récepteurs A1A et A3A de l'adénosine sont négativement couplés à l'adenylate cyclase (AC) alors que les récepteurs A2A et A2B y sont couplés positivement (Pinna et al, 2005). Les récepteurs A2A sont fortement exprimés dans les GB et en particulier sur les MSNs de la voie indirecte qui projettent sur le GPe mais on en retrouve également beaucoup sur les astrocytes. Pour ces raisons, le rôle de l'adénosine dans la modulation de la libération de GABA a été grandement étudié notamment lors de la MP. Des expériences d'électrophysiologie et de neurochimie ont montré que la stimulation des récepteurs A2A augmente la libération de GABA dans le GPe notamment par une action excitatrice sur les neurones striato-pallidaux de la voie indirecte où ils sont exprimés spécifiquement (Fink et al, 1992 ; Sebastiao & Ribeiro, 1996). Etrangement aucun de ces récepteurs n'est retrouvé sur les MSNs de la voie directe possédant le récepteurs D1 (Fink et al, 1992). L'effet stimulateur des récepteurs A2A sur la transmission GABAergique striato-pallidale a ensuite été confirmé par les expériences de microdialyse montrant que l'injection systémique intrapallidale d'agonistes des récepteurs A2A (le CGS21680) produisait une augmentation des concentrations de GABA extracellulaires dans le GPe chez le rat, un effet pouvant être reversé par l'injection d'antagonistes spécifiques (le KW- 6002) pour ces mêmes récepteurs A2A (Ochi et al, 2000). Chez les rats 6-OHDA, l'injection des antagonistes A2A diminue partiellement l'augmentation de la concentration de GABA extracellulaire dans le GPe alors qu'aucun changement n'est observé en réalisant la même injection chez des animaux contrôles (Ochi et al, 2000). Ceci suggère que l'augmentation de GABA observée dans le GPe lors de la MP est en partie due à un mécanisme dépendant de l'effet de l'adénosine sur les récepteurs A2A. De plus, concernant la recapture du GABA, les récepteurs A2A inhibent l'action de GAT-1 dans le GPe par un processus impliquant la voie de signalisation AC/PKA. Ce mécanisme n'est pas clairement défini mais il ne dépend pas de mécanismes de phosphorylation de ces transporteurs car le site de phosphorylation de GAT-1 est

extracellulaire (Gonzalez et al, 2006). Cependant des expériences réalisées sur des astrocytes corticaux en culture, montrent que l'adénosine a l'effet inverse sur la recapture de GABA que ceux observés dans le GPe (Cristovao-Ferreira et al, 2013). Elle module la capacité de transport totale de neurotransmetteur par les transporteurs GAT-1 et GAT-3, mais son action sur les récepteurs A1A inhibe la recapture alors que celui sur A2A la facilite. Ce résultat peut s'expliquer par l'oligomérisation des récepteurs. Dans le cortex, les récepteurs A1A-A2A forment des hétéromères dont l'activation respective joue sur l'internalisation de l'ensemble du complexe A1A-A2A. Pour l'instant, l'hétérodimérisation des récepteurs A1A et A2A n'a pas été montrée dans le GPe. De plus, il se pourrait que les récepteurs astrocytaires aient un fonctionnement différent que ceux neuronaux. D'autre part, d'un point de vue comportemental, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs A2A augmente les rotations contralatérales induites par les agonistes DA après une lésion unilatérale à la 6-OHDA (Morelli et al, 1994) et réduit les tremblements parkinsoniens chez les rats stimulés par la tacrine (Simola et al, 2004). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs A2A dans la MP est très attractif puisque leur utilisation améliore les symptômes moteurs chez les animaux modèles de la MP sans induire de dyskinésies (Kanda et al, 1998). De plus, ils pourraient partiellement ralentir la progression de la maladie par des effets de neuroprotection comme cela a été montré avec la caféine (Chen et al, 2001; Xu et al, 2010).

IV. Gliotransmission

1. Généralités

Les cellules gliales dans le système nerveux central sont de différents types. Elles comprennent les oligodendrocytes, la microglie et les astrocytes. Les oligodendrocytes et les cellules microgliales sont connus depuis longtemps pour assurer des fonctions particulières telles que la myélinisation et la réponse immunitaire, respectivement.

Les astrocytes assurent quant à eux de nombreuses fonctions centrées sur le support et la protection des neurones. Ces cellules participent au maintien de la barrière hémato-encéphalique, régulent le flux sanguin, assurent l'approvisionnement en nutriments et le métabolisme énergétique du système nerveux, participent à la neurotransmission et au maintien de la balance ionique du milieu extracellulaire (Broux et al, 2015 ; Otsu et al, 2015 ; Walz, 2002). Les astrocytes jouent également un rôle dans la défense immunitaire, la réparation et la cicatrisation du cerveau ou de la moelle épinière après une lésion. Il a également été montré que certaines sous-populations d'astrocytes ont des propriétés de cellules souches neurales et sont à la source du mécanisme de neurogénèse adulte (Nolte

et al, 2001). La morphologie caractéristique des astrocytes que l'on peut comparer à une forme d'étoile a été mise en évidence avec un marquage immunohistologique de la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP), une protéine des filaments intermédiaires astrocytaires, classiquement utilisée pour leur identification. Cependant, le remplissage des astrocytes de l'hippocampe par un composé fluorescent révèle que les astrocytes forment des prolongements très fins dépourvus de GFAP qui s'étendent bien plus loin que les faisceaux de GFAP (qui ne représentent que 15% du volume total de l'astrocyte (Bushong et al, 2002)) entourant l'entière surface des vaisseaux sanguins cérébraux. Les astrocytes sont aussi en contact avec les synapses qu'ils entourent de leurs prolongements (Spacek, 1985). C'est de cette proximité avec les synapses qu'est venu le concept de synapse tripartite (neurone pré-synaptique - neurone post-synaptique - astrocyte). Même si des études réalisées sur des souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP ont confirmé que la population astrocytaire est hétérogène, (Nolte et al, 2001 ; Wallraff et al, 2004), des caractéristiques typiques de ces cellules peuvent être dégagées: une forte expression en GFAP, un corps cellulaire irrégulier avec des prolongements étendus, une faible résistance entrée, un potentiel de membrane très négatif, l'absence de canaux potentiel-dépendants ainsi que la présence sur leur membrane plasmique de systèmes de recapture de neurotransmetteurs. Une caractéristique intéressante des astrocytes est qu'ils sont couplés entre eux par des jonctions GAP et forment un réseau étendu. Les jonctions GAP sont principalement composées de connexines 43 (Dermietzel et al, 1991). Ces jonctions laissent passer des petites molécules comme des ions (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ,...), des seconds messagers (ATP, IP_3 , ...) et même des métabolites comme le glucose ou le glutamate. Le niveau d'expression et la perméabilité des jonctions GAP sont variables (Wallraff et al, 2004) et peuvent être modulés par différents agents (neurotransmetteurs, Ca^{2+} ...) entraînant des changements de propriétés du réseau astrocytaire (Giaume & McCarthy, 1996). L'ensemble de ces données laisse à penser que les astrocytes ne sont pas de simples éléments de soutien pour les neurones mais des cellules cérébrales qui participent activement à la communication et au transfert de l'information au sein des réseaux neuronaux. De nombreuses études sur les astrocytes ont permis de mettre en évidence des interactions fonctionnelles entre les neurones et les astrocytes et de clarifier leur rôle dans le fonctionnement cérébral et notamment dans la modulation des systèmes de neurotransmetteurs.

2. Excitabilité astrocytaire

Les astrocytes sont capables d'assurer une forme de communication, reposant sur des vagues intracellulaires de Ca^{2+} , et peuvent également libérer certains neurotransmetteurs (appelés gliotransmetteurs). En effet, les astrocytes sont maintenant considérés comme des cellules activables, puisque activés par des messagers intracellulaires ou extracellulaires, ils sont capables de libérer des substances permettant une communication avec les cellules voisines (Bezzi & Volterra, 2001). Cependant les astrocytes ne sont pas capables de générer des potentiels d'actions. L'activation des astrocytes peut provenir des signaux neuronaux et est donc dépendante de neurotransmetteurs ou peut être spontanée et par conséquent indépendante des impulsions neuronales. Observée en premier lieu dans l'hippocampe et le cervelet (Bezzi & Volterra, 2001), il est bien connu maintenant que les astrocytes possèdent sur leur membrane un large nombre de récepteurs et en particulier ceux au glutamate qui ont largement été étudiés (Steinhauser & Gallo, 1996). Les astrocytes peuvent donc être activés par plusieurs neurotransmetteurs tels que le glutamate, le GABA, la dopamine, l'acétylcholine, l'ATP et l'adénosine en autres (Araque et al, 2002 ; Brambilla et al, 2003; Cristovao-Ferreira et al, 2013 ; Khan et al, 2001 ; Zhang et al, 2003). Une étude a montré que le glutamate pouvait évoquer une augmentation des concentrations de calcium intracellulaires dans des astrocytes en culture qui se propagent à l'intérieur de la cellule et même dans le réseau d'astrocytes interconnectés (Cornell-Bell et al, 1990). Il a également été montré que l'ATP libéré par les astrocytes eux-mêmes pouvait activer des récepteurs P2Y1 et déclencher des vagues calciques se propageant dans le syncytium astrocytaire jusqu'à environ 100-200 μm en environ 15s en partant du point d'initiation de la vague calcique (Bowser & Khakh, 2007). De plus, d'autres études ont montré qu'une augmentation de calcium intracellulaire dans les astrocytes en culture pouvait également entraîner des augmentations de la concentration en calcium dans les neurones voisins (Nedergaard, 1994; Parpura & Zorec, 2010) suggérant une influence bidirectionnelle entre ces deux types cellulaires. Le transfert d'information entre les neurones et les astrocytes est principalement dû à une communication directe par le débordement des neurotransmetteurs de la fente synaptique qui vont aller activer les astrocytes à proximité. L'excitation spontanée des astrocytes, c'est-à-dire leur capacité à générer des vagues calciques indépendamment de l'activité neuronale, est une de leurs propriétés qui a été observée à la fois dans des tranches aiguës de cerveau (Parri & Crunelli, 2001) ; (Nett et al, 2002) et *in vivo* (Hirase et al, 2004). Cette excitation qui provient de la libération du calcium des stocks intracellulaires, est très courante pendant le développement cérébral et semble diminuer quand la formation des circuits neuronaux apparaît (Aguado et al, 2002; Nett et al, 2002 ; Parri & Crunelli, 2001). De manière importante, il a été montré que l'augmentation de calcium intracellulaire astrocytaire

est responsable de la libération de gliotransmetteurs comme le glutamate qui produit une excitation neuronale (Parri & Crunelli, 2001). Ces données changent l'idée commune selon laquelle l'information est générée par les neurones et se propage à travers les circuits neuronaux avant d'atteindre la glie. Les influx calciques à la fois dans les neurones et les astrocytes seraient des sources d'excitation et d'inhibition qui pourraient opérer ensemble pour coordonner les réseaux neuronaux (Aguado et al, 2002). Malgré tout, les événements biochimiques associés à l'excitation astrocytaire et à la propagation du signal sont probablement plus complexes. Dans des astrocytes en culture, il a été montré que l'ATP pouvait déclencher des vagues calciques qui sont accompagnées de vagues métaboliques, c'est-à-dire de vagues sodiques intracellulaires dues à la recapture de glutamate et qui entraîne une augmentation accrue de l'utilisation du glucose (Bernardinelli et al, 2004). Ceci pourrait suggérer une coordination spatiale et temporelle de l'apport de substrats énergétiques aux neurones en réponse à une activité synaptique localisée ce qui complexifie encore le fonctionnement des astrocytes. D'autre part, peu de choses sont connues concernant l'influence de facteurs environnementaux sur l'activation des astrocytes hormis en culture où il est connu que l'ajout de facteurs de croissance ou de cytokines peuvent induire d'importants changements dans la nature et la propagation des signaux calciques intracellulaires (John et al, 1999; Morita et al, 2003). La connaissance de l'impact environnemental sur l'activité astrocytaire pourrait avoir de nombreuses conséquences sur notre vision du rôle probablement très complexe des astrocytes dans le cerveau.

3. Gliotransmission :

Supportant l'idée que les astrocytes participent au traitement de l'information, des études ont montré que ces cellules possèdent des molécules requises pour l'exocytose de neurotransmetteurs (Hepp et al, 1999; Parpura et al, 1995). En effet, les astrocytes sont capables de percevoir et surtout d'intervenir directement dans la transmission synaptique en libérant de nombreuses molécules en réponse à une stimulation physiologique. Ces gliotransmetteurs synthétisés et/ou stockés par les astrocytes, induisent des réponses rapides (de l'ordre de la milliseconde à la seconde) chez les cellules voisines et participent à des processus physiologiques (Volterra et Meldolesi, 2005). Parmi les différents types de gliotransmetteurs libérés, beaucoup sont excitateurs comme le glutamate, l'ATP et la D-serine (Bowser & Khakh, 2007; Kozlov et al, 2006; Oliet & Mothet, 2009), pour revue: (Fiacco & McCarthy, 2006). Cependant les molécules inhibitrices classiques sont aussi libérées par les astrocytes et peuvent moduler l'excitabilité neuronale. Certaines études ont suggéré que la glycine et la taurine sont libérées par la glie et agissent comme des molécules

neuroactives (Barakat et al, 2002). D'autres expériences ont également révélé une accumulation de GABA et la présence de la GAD67 dans le soma et les prolongements des astrocytes entourant les neurones et les vaisseaux sanguins dans des conditions physiologiques (Blomqvist & Broman, 1988 ; Lee et al, 2011a; Martinez-Rodriguez et al, 1993) suggérant la possible libération de ces molécules inhibitrices par les astrocytes. De manière intéressante, des données montrent que les quantités de GABA et de GAD astrocytaires sont régulées dynamiquement et évoluent au cours du développement (Barres et al, 1990; Ochi et al, 1993). De manière générale, ces résultats suggèrent qu'il existe un lien étroit entre le système GABAergique astrocytaire et le développement cérébral.

Plus récemment, des études sur des cultures astrocytaires et sur des tranches aiguës de cerveaux ont démontré une libération de GABA par les cellules gliales dans plusieurs régions cérébrales incluant le cervelet, le thalamus, le striatum et l'hippocampe (Jimenez-Gonzalez et al, 2011; Lee et al, 2010 ; Yoon & Lee, 2014). Il a été montré que cette libération de GABA d'origine gliale était responsable d'un courant GABAergique tonique dans les neurones (Jimenez-Gonzalez et al, 2011; Lee et al, 2010). Dans le thalamus, ce courant tonique semble être dû à une action sur les récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ (Jimenez-Gonzalez et al, 2011). Il a aussi été montré que les quantités de GABA astrocytaires sont variables en fonction des régions cérébrales et sont potentiellement corrélées avec l'amplitude du courant tonique enregistrée dans les neurones. Par exemple, les fortes quantités de GABA astrocytaires dans le cervelet sont corrélées avec un fort courant tonique alors que dans l'hippocampe où les quantités sont plus faibles, les neurones pyramidaux affichent un courant tonique moins important (Yoon et al, 2011). Alors que classiquement le GABA est connu pour être synthétisé à partir du glutamate par l'enzyme décarboxylase de l'acide glutamique (GAD), il a récemment été identifié une nouvelle voie de biosynthèse de GABA dans les astrocytes liée à la dégradation des putrescines par l'activité enzymatique de la Monoamine oxidase B (MAOB) (**Figure 30**). Cette étude a montré que l'inhibition de cette enzyme élimine le courant tonique enregistré dans les neurones du cervelet et les MSNs du striatum. La récupération de l'activité de la MAOB s'accompagne d'une restitution totale du courant tonique (Yoon et al, 2014).

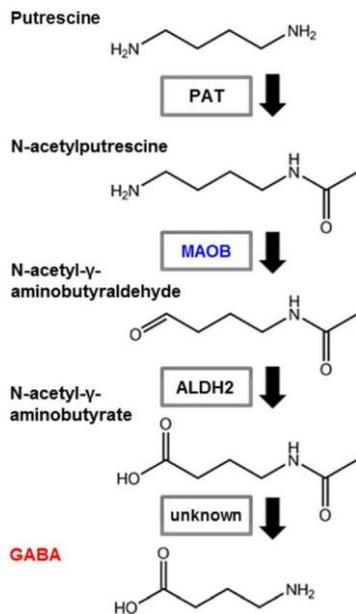


Figure 30: Voie de synthèse de GABA à partir des putrescines. Les astrocytes peuvent synthétiser du GABA à partir des putrescines via la monoamine oxydase dans le striatum et le cervelet. PAT: putrescine acetyltransferase; MAOB: monoamine oxydase B; ALDH2: aldehyde deshydrogénase 2. (Yoon & Lee, 2014)

L'ensemble de ces données suggèrent un rôle majeur du GABA d'origine gliale dans l'établissement d'un courant tonique. De manière intéressante, une altération de l'IT est retrouvée dans un certain nombre de pathologies incluant l'épilepsie de type absence, le traumatisme crânien et la maladie de Huntington (Clarkson et al, 2010 ; Pirttimaki et al, 2013 ; Wojtowicz et al, 2013). Il serait capital d'établir un lien entre des changements de courant tonique et des modifications de libération du GABA d'origine gliale dans différentes pathologies où le système GABAergique est dérégulé. Dans cette optique, il est important de noter qu'il se produit une augmentation de GABA libéré par des astrocytes réactifs dans l'hippocampe dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer ce qui a été mis en lien avec des déficits mnésiques (Wu et al, 2014). D'après ces données, nous pouvons aisément en conclure que le GABA d'origine gliale module l'activité neuronale et a une fonction physiologique très importante.

4. Systèmes de libération de gliotransmetteurs

A. La libération vésiculaire

Plusieurs modes de libération de gliotransmetteurs ont été identifiés. Le mode de libération peut être vésiculaire (Parpura & Zorec, 2010), dépendant du complexe protéique membranaire SNARE et régulé par une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire dans les astrocytes. Contrairement aux neurones, une faible élévation des concentrations de calcium est capable d'induire la fusion vésiculaire et donc la libération de certains gliotransmetteurs

comme cela a clairement été montré pour le glutamate (Parpura & Haydon, 2000). Il a également été identifié sur des astrocytes en culture que les vésicules d'exocytose responsables de la libération de glutamate contenaient le transporteur VGLUT2 et la synaptobrevine 2, une protéine de fusion membranaire appartenant au complexe membranaire SNARE (Crippa et al, 2006 ; Deak et al, 2006). Ces vésicules sont fortement mobiles et fusionnent à la membrane plasmique préférentiellement au niveau des prolongements astrocytaires (Crippa et al, 2006) prouvant distinctement l'existence d'un mode de libération vésiculaire dans les astrocytes.

La libération de neurotransmetteurs peut aussi être non-vésiculaire à travers des canaux spécifiques ou à travers le fonctionnement inverse des transporteurs. En effet, il a été montré qu'il pouvait exister une libération non-vésiculaire par des hémicanaux formés par des connexines (Ye et al, 2003), par le système de transport cystine/glutamate (Warr et al, 1999), par des canaux sensibles au volume cellulaire (volume-regulated anion channel, VRAC) (Kimelberg et al, 1990) ou par des récepteurs purinergiques P2X qui dans certaines conditions deviennent perméables à des molécules de plus grosse taille (Duan et al, 2003).

B. Libération de GABA par les transporteurs

L'exocytose de GABA a été mise en évidence dans les cellules granulaires du cervelet pendant le développement chez le rat, mais à l'âge adulte, la libération de GABA astrocytaire semble se faire de manière non-vésiculaire (Rossi et al, 2003). En effet, Barakat et Bordey ont montré grâce à des enregistrements électrophysiologiques en configuration « cellule entière » que les astrocytes présents dans le cervelet possèdent des transporteurs GAT-1 (Barakat & Bordey, 2002) capables d'inverser leur fonctionnement et d'entraîner une libération de GABA suffisante pour activer des récepteurs GABA_A à proximité (Barakat & Bordey, 2002). De plus, il a été montré au niveau du réseau hippocampique que, en réponse à une recapture de glutamate, les transporteurs astrocytaires GAT-2/3 changent leur mode de fonctionnement et libèrent du GABA durant une augmentation de l'activité des cellules pyramidales (Heja et al, 2012). Ceci suggère que les astrocytes sont capables d'induire une inhibition afin de prévenir une sur-activation du réseau neuronal. Une autre étude menée sur une lignée transgénique de souris modèle de la maladie de MH, a permis de montrer une libération de GABA en provenance du transporteur GAT-3 astrocytaire dans le striatum. Cette étude identifie une diminution de la capacité des astrocytes à se dépolariser, provoquant une diminution de la probabilité de libération de GABA par GAT-3 en condition pathologique, ce qui a de lourdes conséquences sur la transmission GABAergique tonique (Wojtowicz et al, 2013). A l'inverse, il a également été montré dans l'hippocampe lors de la

maladie d'Alzheimer (Wu et al, 2014) que les transporteurs gliaux GAT-1 et GAT-3/4 ont un mode d'activité inversé ce qui a pour conséquence une libération de GABA. Cette libération de GABA d'origine gliale en condition pathologique a été liée à la symptomatologie de cette maladie.

C. Canaux perméables au GABA: Les Bestrophines

La glie peut également libérer du GABA par des canaux spécifiques. Ceci a été montré pour la première fois dans les cellules du cervelet (Lee et al, 2010) où une libération de GABA gliale par une nouvelle catégorie de canaux ioniques, nommés Bestrophines I a été observée. Ces canaux sont responsables de la libération constitutive de GABA, indépendante de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules gliales de Bergmann du cervelet. Les auteurs suggèrent que l'IT observée dans le cervelet en condition physiologique n'est pas majoritairement due à l'activité neuronale mais plutôt à cette source de GABA d'origine gliale qui participe à environ 50-70% au courant tonique (Lee et al, 2010). Ces résultats sont en adéquation avec plusieurs autres études qui supportent une libération de GABA non-vésiculaire, indépendante de l'activité neuronale et de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Brickley et al, 1996 ; Demarque et al, 2002). De récentes études menées sur les astrocytes de l'hippocampe supportent un rôle des Bestrophines I dans la libération de GABA non seulement en condition physiologique (Lee et al, 2010 ; Yoon et al, 2011) mais également en situation pathologique pendant la maladie d'Alzheimer (Jo et al, 2014).

5. Gliotransmission et excitabilité neuronale

Une étude d'électrophysiologie *in vitro* a révélé que l'ATP augmente la libération de glutamate par les cellules gliales du noyau du faisceau solitaire (NTS) ce qui a pour conséquence d'augmenter la transmission synaptique excitatrice des neurones (Accorsi-Mendonca et al, 2013). L'utilisation du fluoroacétate (FAC) (un inhibiteur du métabolisme glial) a permis aux auteurs de prouver le rôle de l'ATP sur les récepteurs P2X astrocytaires et la conséquence de leur activation dans la promotion de l'excitation neuronale à travers la libération de glutamate. Ces données suggèrent que les gliotransmetteurs astrocytaires sont capables d'intervenir et de moduler à la fois la transmission phasique et tonique des neurones. D'autre part, concernant en particulier la transmission inhibitrice, il est connu que la libération de GABA par les cellules gliales a un rôle important au cours du développement cérébral où son action est dépolarisante (Liu et al, 2000b). Dans les cellules matures, avec

les changements d'équilibre ionique, le GABA devient hyperpolarisant mais son rôle reste tout aussi important. Par exemple, il a été montré dans l'hippocampe que la recapture de glutamate extracellulaire entraîne une libération gliale de GABA par le fonctionnement inverse des transporteurs. Ceci a un impact direct sur l'excitabilité des cellules pyramidales puisque cette voie de libération contribue à l'IT de ces neurones. En effet, *in vivo*, l'augmentation de libération de GABA module les oscillations γ dans la région CA1 de l'hippocampe suggérant un rôle fonctionnel en conditions physiologiques (Heja et al, 2012).. Dans plusieurs régions cérébrales incluant le cervelet (Lee et al, 2010; Rossi et al, 2003), l'hippocampe ou encore le striatum (Wojtowicz et al, 2013), le GABA libéré par la glie dans l'espace extracellulaire active les récepteurs GABA_A et entraîne un courant tonique produisant une inhibition persistante dans ces régions ce qui rend les neurones moins facilement excitables. Le GABA glial peut également agir sur les récepteurs GABA_B pré-synaptiques et de fait, diminuer la probabilité de libération de neurotransmetteurs et moduler l'IT (Kaneda & Kita, 2005). Cependant, il a été montré qu'à l'inverse, l'activation de récepteurs GABA_B post-synaptiques augmentent le courant tonique médié par des récepteurs δ -GABA_A dans les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe (Tao et al, 2013).

6. Rôle des astrocytes dans la régulation de l'équilibre ionique

Une des fonctions astrocytaires est la régulation de la concentration extracellulaire de différents ions. Cette propriété est d'autant plus importante que les transporteurs des neurotransmetteurs, présents à la surface astrocytaire sont dépendants de cet équilibre ionique. Les astrocytes ont une forte capacité à tamponner le potassium. Les astrocytes capturent le potassium extracellulaire par des canaux potassiques, des pompes Na/K/ATPases et des cotransporteurs Na⁺/K⁺/Cl⁻. Les astrocytes participent aussi à la régulation des ions H⁺ et HCO₃⁻ et par conséquent à la régulation du pH. De nombreux transporteurs tels que l'antiport Na⁺/H⁺, les cotransporteurs Na⁺/HCO₃⁻ et Cl⁻/HCO₃⁻ sont exprimés par les astrocytes. Enfin, les astrocytes participent à la régulation du niveau extracellulaire de Na⁺ et du Cl⁻ (Simard & Nedergaard, 2004) ce qui a un rôle primordial dans le fonctionnement des transporteurs de la famille SLC6. Le contrôle des ions Cl⁻ par les astrocytes est aussi impliqué dans la régulation du volume cellulaire et de l'osmolarité (Walz, 2002).

7. Les transporteurs gliaux

Les synapses sont entourées par les astrocytes qui délimitent la fente synaptique et empêchent la diffusion des neurotransmetteurs (Araque et al, 1999)(Araque et al, 1999). Cette organisation en synapse 'tripartite' permet une recapture efficace des neurotransmetteurs par des transporteurs du glutamate, du GABA ou de la glycine, qui sont situés sur les prolongements astrocytaires (Masson et al, 1999). Ce mécanisme de recapture permet d'optimiser la neurotransmission (réduction du temps de stimulation des éléments neuronaux, restriction spatiale de la stimulation). Il permet également le recyclage des neurotransmetteurs et donc d'éviter leur accumulation dans l'espace extracellulaire, ce qui dans le cas du glutamate peut avoir des effets excitotoxiques (Huang et al, 2004). De plus, les prolongements astrocytaires autour des synapses sont mobiles et dynamiques (Grass et al, 2004) ce qui peut induire des changements dans les propriétés de la neurotransmission. Par exemple, la réduction de la couverture astrocytaire des synapses dans l'hypothalamus en période de lactation entraîne une inhibition rétrograde de la libération de glutamate via la stimulation des récepteurs pré-synaptiques au glutamate mGluR (Oliet et al, 2001). De manière intéressante, une étude récente (Shigetomi et al, 2012) a montré que les processus d'endocytose/exocytose de GAT-3 à la surface astrocytaire étaient dépendants d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire due à l'activation de récepteurs TRPA1, sigle en anglais pour « transient receptors potential cation channel, member A1 » à la surface gliale (**Figure 31**). Le blocage pharmacologique de ces récepteurs-canaux produit une diminution de recapture de GABA et par conséquent une réduction de l'amplitude des courants synaptiques inhibiteurs dans les interneurons de l'hippocampe. Ainsi, l'activité des canaux TRPA1 astrocytaires en altérant le système de recapture gliale peut modifier le traitement optimal de l'information en jouant sur la balance excitation-inhibition dans le cerveau.

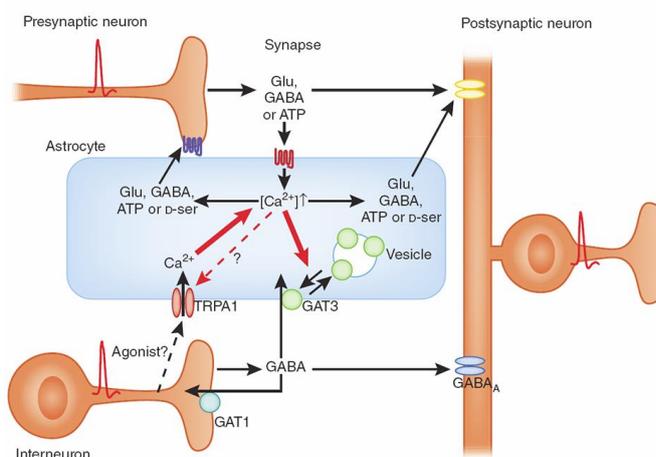


Figure 31: Représentation des voies de transduction dépendantes des canaux TRPA1. L'ouverture des canaux TRPA1 sur les astrocytes contribue à l'élévation des $[Ca^{2+}]_i$ (flèches rouges) responsable d'une modulation de l'exocytose du transporteur GABAergique GAT-3 à la surface astrocytaire. Cette régulation participe conjointement avec GAT-1 au contrôle des concentrations de GABA extracellulaires. Il n'est cependant pas connu si l'activité des canaux TRPA1 peut être modulée par la libération de neurotransmetteurs ou d'autres substances agonistes libérées par les neurones (Clarke & Attwell, 2012).

8. Astrocytes et physiopathologie

Les astrocytes ont pour caractéristique de s'activer en réponse à des situations pathologiques extrêmement diverses comme l'ischémie, le traumatisme cérébral, les infections virales, l'épilepsie et les maladies neurodégénératives. Ainsi, indépendamment du type d'atteinte et de la région cérébrale affectée, les astrocytes deviennent réactifs, c'est-à-dire qu'ils augmentent en terme de taille, ont des prolongements cytoplasmiques élargis et ils surexpriment la GFAP (Anderson et al, 2014; Gomide & Chadi, 2005; Hoke & Silver, 1994 ; Sukhorukova et al, 2015). Cette réponse est appelée astrogliose, réaction gliale ou encore activation astrocytaire. Mais il se pourrait également qu'une réaction astrocytaire modérée soit nécessaire dans des processus physiologiques tels que la plasticité synaptique pour l'apprentissage et la mémoire (Jones et al, 1996).

Dans différentes études, l'immunomarquage dirigé contre la GFAP est classiquement utilisé comme index de l'état astrocytaire. Il est alors possible de voir qu'après une atteinte cérébrale telle qu'un épisode ischémique ou après une crise d'épilepsie, il se produit une réaction astrocytaire caractérisée par une hypertrophie et une prolifération des astrocytes (Charron et al, 2014; Eng et al, 2000). Le nombre d'astrocytes visibles dans la structure réactive semble augmenter mais la quantification du nombre de cellules en division montre en réalité que la prolifération des astrocytes est souvent très limitée, environ 2% de la population d'astrocytes. En réalité, il est possible que l'impression d'une augmentation du nombre d'astrocytes soit liée à une augmentation de l'immunoréactivité pour la GFAP. Dans la maladie d'Alzheimer, des astrocytes réactifs entourent les plaques amyloïdes (Nagele et al, 2004), qui sont des agrégats de différentes protéines cérébrales, une atteinte très caractéristique de cette pathologie. De même dans la MP, une augmentation du nombre et de la surface astrocytaire est également observée dans le striatum et le GPe chez plusieurs modèles animaux et les patients parkinsoniens (Charron et al, 2014). Ces observations renforcent l'idée que la réaction astrocytaire survenant lors d'un état pathologique, est probablement un élément protecteur. Un autre point important concernant la fonction des astrocytes est leur capacité à contrôler les concentrations extracellulaires de neurotransmetteurs et notamment celle du glutamate. En effet, en raison de son caractère excitotoxique, l'homéostasie du glutamate est primordiale. Des souris qui ont été invalidées pour GLT-1, le principal transporteur astrocytaire de glutamate, développent des crises d'épilepsies spontanées qui sont létales probablement en raison d'une neurotoxicité très importante (Tanaka et al, 1997). La dérégulation de la gliotransmission glutamatergique a été la plus étudiée dans diverses conditions pathologiques et notamment l'épilepsie et la schizophrénie. En effet, il a notamment été montré qu'une augmentation de la

gliotransmission excitatrice conduit à une activité épileptique du cerveau alors que sa réduction et notamment la diminution de libération de D-serine par les astrocytes est associée à la schizophrénie. En adéquation avec ces données, l'expression de GFAP est augmentée dans le tissu épileptique (Cohen-Gadol et al, 2004) alors qu'elle est diminuée chez les patients schizophrènes (Rajkowska et al, 2002; Webster et al, 2005). En regard des données précédentes, il a également été montré que dans le tissu épileptique, il se produit une augmentation de l'excitabilité des astrocytes par augmentation des vagues calciques intracellulaires (Manning & Sontheimer, 1997). Il est donc possible que chez les patients schizophrènes, une diminution de Ca^{2+} intracellulaire astrocytaire et donc une réduction de l'excitabilité de ces cellules conduise à la diminution de libération de D-sérine observée dans cette pathologie (Tsai & Coyle, 2002). En ce qui concerne la gliotransmission GABAergique, plusieurs études montrent que la libération de GABA d'origine gliale peut être directement associée à certaines conditions pathologiques. Par exemple, chez des souris modèles de la maladie de Huntington, il est observé une réduction du courant tonique dans les neurones striataux en raison d'une diminution de libération de GABA par GAT-3 (Wojtowicz et al, 2013). Une autre étude révèle une action anti-inflammatoire du GABA glial par la modulation de l'activité de la microglie dans des cultures d'astrocytes humains (Lee et al, 2011b). Deux autres études de groupes indépendants ont aussi montré que les astrocytes réactifs dans la maladie d'Alzheimer libèrent du GABA ce qui engendrerait des déficits mnésiques (Jo et al, 2014 ; Wu et al, 2014).

A. Maladie de Huntington (MH)

Les lésions neuropathologiques caractéristiques de la MH sont une profonde mort neuronale des MSNs striataux et une astrogliose. En effet, des études post-mortem sur le striatum de patients atteints de la MH révèlent une augmentation du marquage des connexines 43 et de la GFAP (Vis et al, 1998) révélant la présence d'une astrogliose dans cette région. Il a également été montré que la protéine Huntingine (HTT) co-localise avec les astrocytes réactifs dans le striatum (Singhrao et al, 1998). La neurotoxicité du glutamate due à une diminution de la fonction des astrocytes et leur incapacité à maintenir un environnement neuronal adéquat a été une hypothèse suggérée pour expliquer la mort neuronale. En faveur de cette hypothèse, dans les modèles animaux, il a été observé que le niveau d'expression des ARNm de GLT1, dans le cortex et le striatum est drastiquement réduit ce qui s'accompagne par une diminution de la recapture du glutamate (Lievens et al, 2001). Ce phénomène apparaît avant la dégénérescence neuronale ce qui suggère que la sous-

expression de GLUT1, en induisant une excitotoxicité glutamatergique, pourrait en partie être impliquée dans la mort neuronale. La protéine HTT mutante est connue pour former des agrégats cytoplasmiques dans les neurones. Cette même aggrégation de HTT est retrouvée dans le noyau des astrocytes. Cette accumulation de HTT mutée dans les astrocytes a été corrélée avec la diminution de l'expression des transporteurs glutaminergiques gliaux et par conséquent la diminution de recapture de glutamate (Shin et al, 2005). Ces mêmes expériences réalisées sur des cultures combinées de neurones et d'astrocytes montrent qu'alors que la glie d'animaux sains protège les neurones contre la neurotoxicité, la glie exprimant de la HTT mutée augmente la vulnérabilité neuronale (Shin et al, 2005). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la HTT mutée dans les cellules gliales contribue à leur dysfonctionnement et à l'excitotoxicité observée dans la MH.

B. Maladie de Parkinson (MP)

Dans le tissu post-mortem de patients ainsi que chez plusieurs modèles animaux de la MP, une augmentation du nombre et de la surface astrocytaire, visualisable par une augmentation du marquage de la GFAP et de S100 β (caractéristique des astrocytes réactifs) a été détectée dans plusieurs régions cérébrales, notamment le striatum et le GPe (**Figure 32**) (Charron et al, 2014). Chez les animaux modèles MPTP, il semble que l'astrogliose apparaît après la mort des neurones dopaminergiques, et cette réponse reste élevée même après la dégénérescence de la majorité de ces neurones (Teismann & Schulz, 2004). De plus, il est à noter qu'il se produit une augmentation de densité des connexines 30 et 43 constituant les jonctions GAP entre astrocytes dans le striatum. Une telle observation n'a pas été faite dans le GPe. Cette augmentation de connexines dans le striatum n'est pas associée avec une augmentation du couplage entre astrocytes mais pourrait être due à une augmentation du couplage métabolique puisqu'elle apparaît autour des vaisseaux sanguins. L'augmentation du couplage métabolique n'a cependant pas été testée dans ces conditions (Charron et al, 2014).

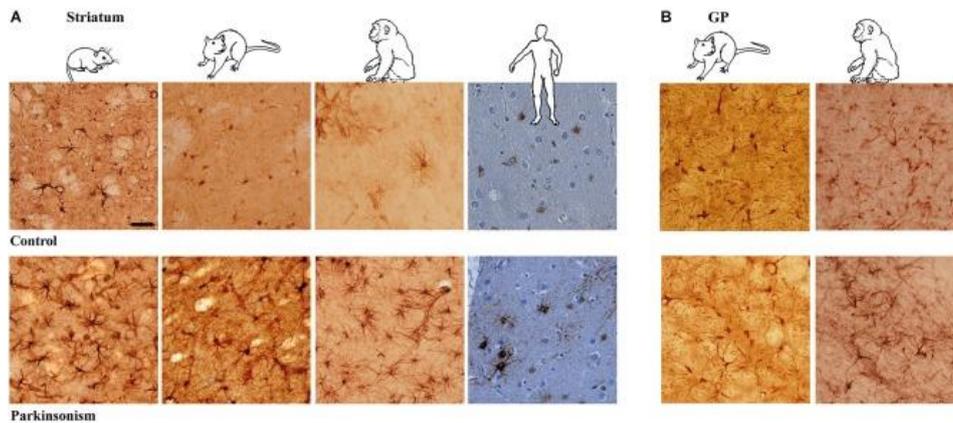


Figure 32: Réaction astrocytaire dans le striatum et le GPe (GP) d'animaux modèles et de patients atteints de la MP. La déplétion dopaminergique augmente l'immunomarquage GFAP-S100 β dans le Striatum (A) et le GPe (B) de souris traitées à la réserpine, de rats lésés à la 6-OHDA, de primates non-humains MPTP et de patients atteints de la MP (échelle = 30 μ m) (Charron et al, 2014).

En accord avec les études précédentes, une réduction significative du nombre de synapses asymétriques dans le striatum de rats 6-OHDA a aussi été rapportée. Cependant, le nombre de synapses asymétriques entourées par des prolongements astrocytaires est clairement augmenté alors que le nombre de synapses qui ne le sont pas est significativement diminué (Charron et al, 2014). Ces données suggèrent un rôle primordial des astrocytes dans la prévention de cette dégénérescence synaptique. En effet, les astrocytes réactifs peuvent produire divers facteurs neurotrophiques, synthétiser des substrats extracellulaires pour la croissance axonale, éliminer les neurotransmetteurs en excès et donc avoir des effets neuroprotecteurs (Chen et al, 2005b). La libération de glutathion représente une voie par laquelle les astrocytes pourraient exercer leurs effets neuroprotecteurs durant la MP. La production de glutathion d'origine gliale est augmentée suite à l'exposition des astrocytes à l'oxyde nitrique ce qui rendrait les neurones moins sensibles aux radicaux libres. Ceci est en accord avec les observations obtenues chez les patients MP où les cellules contenant du glutathion sont localisées dans des régions où les neurones DA ont été préservés (Heales et al, 2004). D'autres part, il est connu que les astrocytes possèdent à leur surface beaucoup de types de récepteurs aux neurotransmetteurs incluant ceux de la dopamine (Miyazaki et al, 2004) ainsi que les récepteurs A2A de l'adénosine (Brambilla et al, 2003) qui ont largement été impliqués dans la prévention de la MP. Dans le striatum, ces récepteurs A2A ont été identifiés pour jouer un rôle dans la prévention de l'astrogliose suite à une lésion cérébrale (Brambilla et al, 2003) ce qui suggère que l'effet bénéfique de leur blocage dans la MP pourrait être dû en partie à une action sur les astrocytes. Concernant la dopamine, il est concevable que la diminution de ce neurotransmetteur dans la MP puisse avoir des effets délétères. En effet, il est connu que la dopamine diminue la probabilité de libération de GABA astrocytaire. Ceci implique, qu'en son absence, la glie pourrait libérer plus de GABA.

Il se peut donc qu'une élévation des concentrations extracellulaires de GABA produise une activation des récepteurs GABA_A extra-synaptiques altérant la transmission GABAergique, qui est connue pour être largement perturbée dans les GB durant la MP.

V. Modulation GABAergique du GPe

1. Afférences GABAergiques

Le GPe reçoit ses principales afférences inhibitrices des neurones de projection striataux et des neurones du GPe. L'inhibition réciproque des neurones GPe-GPe provient de leurs collatérales d'axones qui représentent 10% des synapses inhibitrices pallidales. Les projections STR-GPe viennent principalement des MSNs striataux de la voie indirecte, c'est à dire les neurones possédant à leur surface le récepteurs dopaminergique D2 bien qu'il ait été montré chez les rongeurs, que des collatérales de la voie directe, précisément 60% des D1-MSN de la voie directe, projettent également sur le GPe. (Fujiyama et al, 2011 ; Kawaguchi et al, 1990 ; Wu et al, 2000) ;(Cazorla et al, 2014). Concernant précisément la caractérisation de la transmission inhibitrice GABAergique dans le GPe, des injections locales d'antagonistes des récepteurs GABA_A, à proximité des neurones pallidaux ont été réalisées *in vivo* (Kita & Kitai, 1994). Pendant ces expériences, les auteurs ont montré que la GABAzine augmente fortement le taux de décharge et la régularité de la plupart des neurones enregistrés. Ces données indiquent que les neurones du GPe sont sous un tonus inhibiteur GABAergique constant médié par des récepteurs GABA_A. De plus, des expériences réalisées sur le singe éveillé montrent que l'injection localisée de bicuculline, un autre antagoniste spécifique des récepteurs GABA_A, dans le GPe, augmente l'activité électrique des neurones au niveau du site d'injection alors que les neurones situés à distance, voient leur activité diminuée (Matsumura et al, 1995). Ces données suggèrent que l'origine de l'inhibition à la périphérie du site d'injection est due à l'inhibition que chaque neurone pallidal exerce sur les cellules voisines. D'autre part, comparées aux synapses GPe-GPe, les synapses STR-GPe ont un plus grand ratio lors de stimulations paires (PPR) indiquant une plus faible probabilité initiale de libération de neurotransmetteur (Sims et al, 2008). Bien que le fonctionnement des projections striatales soit discret en conditions normales (Kita & Kita, 2011), le nombre de projections striatales est très important dans le GPe puisqu'elles représentent entre 80-90% des synapses GABAergiques du GPe donc il est possible que l'activation occasionnelle en conditions physiologiques des synapses striato-pallidales puisse aussi contribuer au tonus inhibiteur exercé sur les neurones pallidaux. De nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation des synapses

inhibitrices dans le GPe ainsi qu'à la modification de la transmission GABAergique pallidale en condition parkinsonienne. La voie STR-GPe a bien été décrite *in vitro* et montre que les synapses STR-GPe sont caractérisées par une facilitation à court terme (Chuhma et al, 2011; Cooper & Stanford, 2001 ; Sims et al, 2008). De plus, une étude récente utilisant l'optogénétique pour caractériser ce mode de transmission a établi avec certitude que les synapses STR-GPe sont des synapses facilitatrices (Migueliz et al, 2012) alors que les synapses GPe-GPe sont caractérisées par une dépression à court terme. Ce mode de transmission semble être une caractéristique commune à toutes les synapses striato-fugales (Connelly et al, 2010) alors que les synapses GPe-GPe sont des synapses caractérisées par une dépression à court terme, tout comme les synapses GPe-NST et GPe-SNr (Baufreton & Bevan, 2008 ; Connelly et al, 2010). Les études de microdialyses suggèrent que les niveaux de GABA dans le GPe sont élevés, environ 0.5 μ M (Robertson et al, 1991) ce qui suggère une possible activation des récepteurs extra-synaptiques dont l'affinité pour le GABA est inférieur au μ M. Cette activation des récepteurs extra-synaptiques a été montrée par le blocage pharmacologique des transporteurs GAT-1 et/ou GAT-3 dans le GPe de rat. Ces résultats suggèrent que la recapture de GABA à travers GAT-1 et GAT-3 régule l'IT médiée par les récepteurs GABA extra-synaptiques dans le GPe en condition physiologique (Jin et al, 2011b). Cependant un tel phénomène n'a pour l'instant pas été montré dans le GPe en condition pathologique. Un défaut de recapture de GABA pourrait avoir des effets sur la transmission GABAergique classique et expliquer certaines altérations de l'activité pallidale observées en conditions pathologiques.

2. Modulation GABAergique de l'activité électrophysiologique pallidale en condition contrôlée

Une caractéristique électrophysiologique des neurones du GPe est la capacité à générer des pauses *in vivo*. Chez le singe, ces pauses sont d'une durée de 300 ms (DeLong, 1971 ; Elias et al, 2007), alors que chez le rat, elles sont d'une durée inférieure à 200 ms (Gardiner & Kitai, 1992). Après l'injection locale de GABAzine, les pauses spontanées des neurones du GPe disparaissent dans certains neurones alors qu'elles deviennent plus persistantes d'en d'autres, suggérant qu'au moins une partie d'entre elles ne sont pas dépendantes des récepteurs GABA_A ce qui a poussé certains auteurs à étudier l'implication des récepteurs GABA_B dans ce système. L'application locale de CGP55845, qui va bloquer les récepteurs GABA_B, ne modifie pas le mode d'activité des neurones du GPe bien que la durée des

pauses soient plus réduite et que la fréquence de décharge soit augmentée (Galvan et al, 2005; Kita et al, 2006). De plus, le blocage des récepteurs GABA_B dans le GPe n'affecte pas l'arrêt de l'activité des neurones pallidiaux engendré par l'inhibition pharmacologique du NST. Il est connu que les neurones du GPe en tranches sont capables de générer des pauses alternativement entrecoupées de phases d'activité robustes (une activité en bouffées de PAs) quand les entrées synaptiques en provenance du NST sont bloquées (Hashimoto & Kita, 2006). Donc les entrées GABAergiques inhibitrices et glutamatergiques excitatrices simultanées peuvent créer des conditions dans le GPe telles que les neurones basculent d'états hyperpolarisés à dépolarisés et réciproquement (Hashimoto & Kita, 2006). De plus, des activations répétées des neurones striataux en tranches peuvent induire une longue période d'inhibition des neurones du GPe (Kaneda & Kita, 2005) et une simple stimulation striatale associée avec l'inhibition pharmacologique du NST par le muscimol induit également une inhibition dans le GPe chez le singe (Kita et al, 2005). D'autre part, l'application simultanée de NBQX (bloqueur des récepteurs AMPA) et de GABAzine modifie la décharge et provoque une activité synchronisée des neurones du GPe chez le primate éveillé (Kita et al, 2005). Ces résultats amènent à penser que l'activité conjointe des systèmes glutamatergique et GABAergique contribuent à la génération de l'activité électrique irrégulière et non synchronisée observée dans le GPe en conditions physiologiques (Kita et al, 2005). Chez les animaux parkinsoniens, les neurones du GPe sont hypoactifs et affichent de fortes modifications de leur patron de décharge. En effet, il se produit une augmentation des bouffées de PAs (Filion & Tremblay, 1991) accompagnée d'une augmentation de la synchronisation entre ces neurones (Nini et al, 1995). De plus, la déplétion dopaminergique crée un certain nombre de modifications de la transmission GABAergique dans le GPe telles qu'une élévation des concentrations extracellulaires de GABA, un élargissement des synapses STR-GPe (Ingham et al, 1997) et une augmentation de décharge des neurones STR-GPe (Kita & Kita, 2011) suggérant une hyperactivité de la voie indirecte dans la MP pouvant sous-tendre les modifications de l'activité de décharge et l'hypoactivité pallidale.

3. Altérations GABAergiques dans le GPe pendant la MP

Certaines études se sont portées sur les altérations de l'activité des neurones du GPe d'un point de vue moléculaire durant la MP. Les enzymes « *acide glutamique décarboxylase* » GAD65 et GAD67 sont requises pour la synthèse de GABA. Ces deux isoformes sont présentes dans les efférences striatales ainsi que dans le GPe. La GAD65 est localisée dans les terminaisons axonale du neurone pré-synaptique attachée aux vésicules de libération du

neurotransmetteur alors que la GAD67 est uniformément distribuée à travers le cytosol des neurones pré-synaptiques et post-synaptiques (Kaufman et al, 1991). Les différents taux d'expression de ces deux isoformes reflètent les différents états de fonctionnement des neurones GABAergiques. Plusieurs études ont examiné l'expression des ARNm des GAD dans le GPe d'animaux rendus parkinsoniens. Les niveaux d'expression d'ARNm de GAD67 sont augmentés dans les neurones GABAergiques du GPe de primates et de rats après une déplétion dopaminergique (Herrero et al, 1996 ; Kincaid et al, 1992 ; Soghomonian & Chesselet, 1992) alors que les niveaux d'ARNm de GAD65 ne sont pas modifiés dans ce même noyau (Soghomonian & Chesselet, 1992). Chez le chat lésé au MPTP, seule une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de la GAD67 est également retrouvée dans le GPe (Schroeder & Schneider, 2001). De manière intéressante, l'augmentation de l'expression des GAD65/67 dans le GPi correspond à l'apparition des signes moteurs de la MP, suggérant une importance de ces enzymes dans la physiopathologie de la MP principalement au niveau du GPi. Ces résultats suggèrent que les deux formes de GAD sont essentielles au fonctionnement de la transmission GABAergique dans les GB et qu'en condition parkinsonnienne, l'augmentation des niveaux de GAD67 pourrait suggérer une augmentation de la libération de GABA.

A. Augmentation des concentrations extracellulaires de GABA dans le globus pallidus dans la MP:

Chez des animaux modèles de la MP, plusieurs études ont montré une augmentation des niveaux de GABA extracellulaires dans le GPe. En effet, dans le GPe et le striatum de rats lésés à la 6-OHDA, des données obtenues par des expériences de microdialyse montrent que les concentrations extracellulaires de GABA sont deux fois plus importantes que chez les animaux contrôles (**Figure 33**) (Galeffi et al, 2003; Ochi et al, 2000). De manière surprenante, la stimulation à haute fréquence des neurones du NST de rats hémiparkinsoniens ne modifie pas le niveau déjà élevé de glutamate mais entraîne une forte augmentation des niveaux de GABA (Windels et al, 2005). Le fait que les concentrations de glutamate soient élevées dans le GPe après une lésion de la SNc (16 fois supérieures aux valeurs contrôles) (Windels et al, 2005) reflète certainement l'hyperactivité des neurones du NST connue dans la MP. Une étude électrophysiologique *in vivo* sur des rats contrôles montre également une augmentation de la transmission GABAergique par une stimulation à haute fréquence dans le NST (Maurice et al, 2003) posant la question du rôle du NST dans le contrôle des niveaux de GABA dans le GPe. D'autre part, et de façon tout à fait intéressante, il a été montré chez le primate que l'augmentation des concentrations de

GABA extracellulaires dans le GPe pouvait être mimée par le blocage pharmacologique des transporteurs du GABA (GATs) (Galvan et al, 2005). Ces données indiquent que GAT-1 et GAT-3 jouent un rôle important dans la régulation des niveaux extra-synaptiques de GABA dans le GPe.

B. Modification de la voie striato-pallidale dans la maladie de Parkinson

B1. Augmentation d'activité des neurones striato-pallidaux

Le modèle d'organisation anatomo-fonctionnel des GB décrit par Alexander et Crutcher dans les années 1990 (Alexander & Crutcher, 1990) suggère une hyperactivité de la voie STR-GPe en conditions parkinsoniennes conduisant à une augmentation de la transmission GABAergique entre ces deux noyaux et une hypoactivité du GPe. Des enregistrements intracellulaires suggèrent que, chez le rat 6-OHDA, l'activité électrique des neurones STR-GPe augmente (**Figure 33**) (Mallet et al, 2006), et que les neurones du GPe changent leur patron d'activité avec l'apparition de plus nombreuses bouffées de PAs (Filion et al, 1991 ; Ni et al, 2000 ; Pan & Walters, 1988 ; Wichmann & DeLong, 2006). Ces résultats suggèrent une forte influence du striatum sur le GPe notamment quand le système est dérégulé. De plus, d'autres expériences d'électrophysiologie réalisées *in vivo*, montrent que les neurones du GPe des rats 6-OHDA anesthésiés à l'isoflurane déchargent plus fréquemment avec une activité en bouffées interrompues par des pauses comparés aux animaux contrôles (Kita & Kita, 2011). L'injection de muscimol dans le striatum de rats 6-OHDA augmente le taux de décharge et réduit fortement les pauses des neurones du GPe. Les enregistrements dans le STR montrent que les MSNs de rats contrôles ont une activité spontanée très basse alors que les MSNs striataux de rats 6-OHDA affichent une forte activité en bouffées de PAs et une haute fréquence de décharge. L'injection de L-DOPA dans le STR de rats 6-OHDA augmente significativement le taux de décharge et réduit les pauses des neurones du GPe (Kita & Kita, 2011). Ces données valident l'hypothèse que la déplétion dopaminergique augmente l'activité en bouffées de PAs des neurones STR projetant sur le GPe et que l'augmentation de la transmission STR-GPe peut jouer un rôle dans la génération des pauses et de l'activité en bouffées de PAs des neurones du GPe. Ces résultats suggèrent que les traitements visant à réduire l'inhibition GABAergique aberrante STR-GPe peuvent aider à restaurer les déficits moteurs observés dans la MP.

B2. Elargissement des synapses striato-pallidales

Un élargissement des synapses STR-GPe a été décrit chez les animaux modèles de la MP (**Figure 33**) (Ingham et al, 1997). En effet, des marquages immunohistochimiques antérogrades dirigés contre l'enképhaline et le GABA (les deux principaux marqueurs des synapses STR-GPe), ainsi que des expériences de microcopie électronique ont permis de caractériser les modifications anatomiques des terminaisons striato-pallidales après une déplétion dopaminergique. Elles révèlent que les boutons synaptiques striato-pallidaux sont en moyenne 64% plus larges après une déplétion dopaminergique. L'analyse de leur forme montre que les synapses sont plus irrégulières et leur spécialisation synaptique est plus complexe. Ceci semble être spécifique aux terminaisons synaptiques STR-GPe puisque les autres synapses GABAergiques dans le GPe, qui présentent uniquement un marquage GABA et donc correspondent aux synapses GPe-GPe, ne montrent pas de différences en terme de taille entre les animaux contrôles et ceux déplétés en dopamine. Ces changements morphologiques des synapses STR-GPe laissent à penser que ces synapses sont plus actives après une déplétion dopaminergique ce qui soutient l'hypothèse de l'hyperactivité STR-GPe dans la MP (Ingham et al, 1997).

C. Modifications d'origine pallidale

C1. Perte d'excitabilité neuronale des neurones du GPe

Des études chez le rongeur *in vitro* ont révélé un rôle primordial des canaux sodiques persistants (INaP) et HCN dans l'activité de décharge autonome des neurones du GPe (Chan et al, 2004). En particulier, leurs expériences ont montré que le blocage pharmacologique de canaux HCN réduit la fréquence des PAs et diminue la régularité des neurones du GPe. De surcroît, ces canaux sont connus pour supporter l'activité autonome de nombreuses cellules excitables (Maccaferri & McBain, 1996 ; McCormick & Pape, 1990 ; Neuhoff et al, 2002). Comme ils sont principalement localisés sur le compartiment dendritique, ils sont idéalement positionnés pour sculpter les réponses synaptiques (Lorincz et al, 2002). En effet, les données obtenues montrent que ces canaux déterminent le taux et la régularité de l'activité de décharge autonome des neurones du GPe et sculptent les réponses des neurones aux entrées inhibitrices striatales (Chan et al, 2004). Dans leurs travaux suivants, l'équipe du Dr Chan a montré que la déplétion en dopamine produisait une perte progressive de l'activité autonome des neurones du GPe attribuable à une diminution de l'expression des canaux HCN (Chan et al, 2011). Cependant la restauration de l'activité

physiologique des neurones pallidaux par surexpression des canaux HCN ne permet pas de réduire les symptômes moteurs survenus après la déplétion dopaminergique.

C2. Modification morphologiques et fonctionnelles des synapses pallido-pallidales

Peu d'études se sont intéressées aux propriétés des collatérales d'axones entre les neurones pallidaux, en raison de la difficulté d'activer ces dernières de manière spécifique. Une étude réalisée dans l'équipe a néanmoins montré que la transmission synaptique inhibitrice GPe-GPe est augmentée dans le modèle de rat 6-OHDA, conduisant à une augmentation des rebonds post-inhibiteurs déclenchés suite à l'activation répétée des collatérales pallidales (Miguel et al, 2012). De manière surprenante, le fonctionnement des synapses STR-GPe n'est pas impacté alors qu'il a été reporté un fort élargissement de la taille de ces synapses (**Figure 33**) (Ingham et al, 1997). Cependant, l'origine de cette modification de transmission pallido-pallidale après une déplétion dopaminergique n'est pas encore connue. Une explication possible serait une augmentation du nombre de connections synaptiques entre les neurones du GPe comme c'est le cas au niveau de la voie pallido-subthalamique (GPe-NST) après une déplétion dopaminergique (Fan et al, 2012). Une augmentation du nombre de synapses inhibitrices dans le GPe après une déplétion dopaminergique pourrait produire un déséquilibre entre les entrées excitatrices et inhibitrices ce qui pourrait contribuer à l'altération de l'activité électrique de ces neurones et amplifier les oscillations β observées dans la MP (Baufreton et al, 2005b ; Mallet et al, 2008a). En effet, il a été suggéré que l'équilibre entre l'inhibition STR-GPe et GPe-GPe est essentiel pour le traitement optimal de l'information à travers les GB et dans la prévention du développement des oscillations pathologiques observées dans le réseau GPe-NST pendant la MP (Magill et al, 2000 ; Terman et al, 2002).

La **figure 33** ci-dessous résume l'ensemble des altérations GABAergiques citées précédemment dans le GPe lors de la MP.

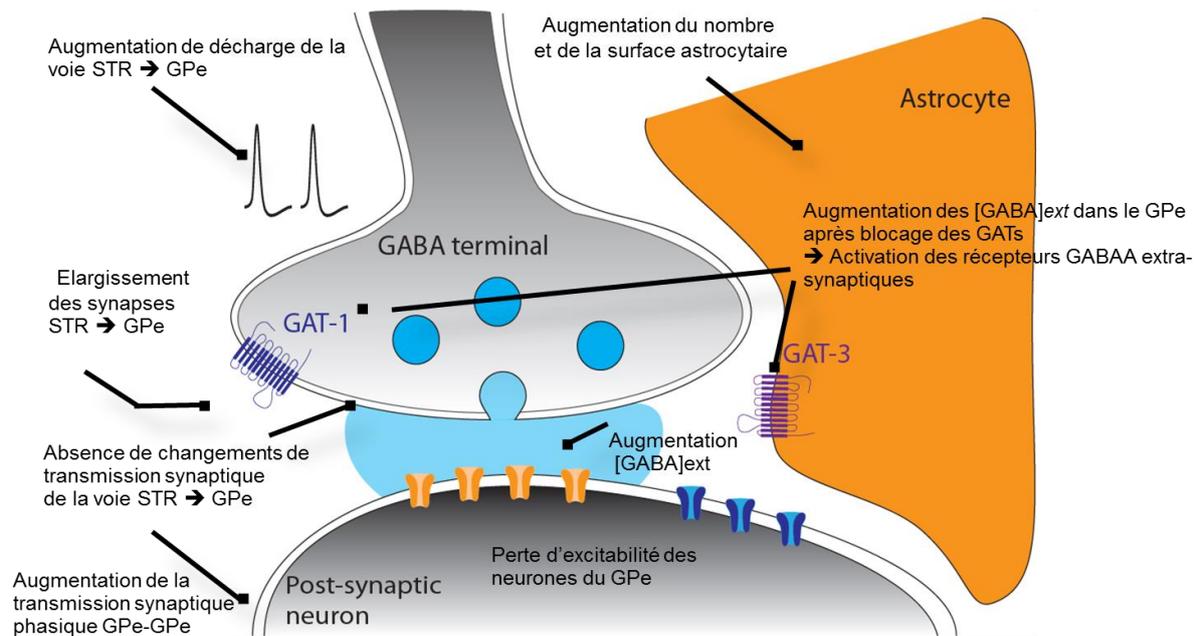


Figure 33: Résumé des différentes modifications des synapses GABAergiques dans le GPe présentes chez les modèles animaux de la MP.

4. Modifications GABAergiques dans le globus pallidus externe dans la maladie de Huntington

De par ses interactions avec des protéines pré- et post-synaptiques, la HTT semble avoir un rôle primordial dans le transport axonal vésiculaire, l'endocytose et exocytose et le maintien de la structure synaptique. Les interactions des protéines cellulaires avec la HTT mutée peut donc impacter la transmission synaptique à plusieurs niveaux. Certaines données montrent des changements au niveau de différents systèmes de neurotransmission incluant les systèmes glutamatergique, GABAergique et dopaminergique. L'équilibre complexe du fonctionnement de ces systèmes de neurotransmission sous-tend l'activité neuronale optimale en particulier dans le striatum dont la dégénérescence des neurones de projections GABAergiques, les MSNs, constitue la lésion fondamentale de la maladie de MH. Bien que les études se sont focalisées sur la transmission glutamatergique qui a été décrite comme présentant de profondes altérations dans la maladie de MH (Cepeda et al, 2003 ; Cepeda et al, 2007; Levine et al, 1999), de nouvelles données montrent que la transmission GABAergique est aussi atteinte dans cette pathologie. En effet, la protéine HTT mutée peut impacter le transport des récepteurs GABA_A ainsi que leur nombre et leur localisation à la surface membranaire (Jacob et al, 2008). Ainsi, il est probable que l'ensemble de la transmission GABAergique soit altéré dans les GB et en particulier sur les cibles principales

du striatum dans la MH. En effet, concernant le système GABAergique, si on se reporte aux études post-mortem de patients atteints de la MH, il est bien établi que les neurones de projections striataux, les MSNs, qui représentent plus de 90% des neurones striataux, sont principalement touchés dans cette pathologie (Graveland et al, 1985a). Les études d'autoradiographie indiquent que l'expression des récepteurs GABA_A dans les GB diminue progressivement au cours de l'évolution de la maladie et disparaissent complètement dans le striatum à un stade avancé de la pathologie. Dans le GPe, les récepteurs GABA_A sont significativement augmentés suggérant une compensation de la perte de signal striatal (Glass et al, 2000). Concernant les études d'immunohistochimie, l'immunofluorescence pour les sous-unités $\alpha 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\gamma 2$, principalement représentées dans les récepteurs GABA_A synaptiques, et l'immunofluorescence pour les récepteurs GABA_B (R1) montrent aussi une augmentation d'expression dans le GPe et le GPi dans la MH alors que l'expression de la protéine gephyrin ne semble pas être altérée (Allen et al, 2009; Thompson-Vest et al, 2003). Les changements de transmission GABAergique chez les animaux modèles de la MH sont beaucoup moins caractérisés que ceux de la transmission glutamatergique. De manière intéressante, et contrairement au cortex où la fréquence des courants synaptiques inhibiteurs est diminuée, celle des courants synaptiques inhibiteurs dans les MSNs, est augmentée dans les souris R6/2, YAC128 et CAG140-KI à un âge symptomatique (Cepeda et al, 2004 ; Cepeda et al, 2007 ; Cummings et al, 2007). Une étude plus récente utilisant l'électrophysiologie et l'optogénétique menée chez les souris R6/2 a révélé que l'augmentation des courants synaptiques inhibiteurs dans le striatum impacte en particulier les MSNs striataux de la voie indirecte ce qui pourrait diminuer la transmission GABAergique STR-GPe à un âge symptomatique (Cepeda et al, 2013). De plus, le courant tonique inhibiteur présent en condition physiologique dans les MSNs est significativement réduit dans les MSNs de la voie indirecte (Cepeda et al, 2013). Ces résultats suggèrent que la transmission GABAergique semble principalement affecter ce sous-type neuronal lors de la physiopathologie de la MH. Dans le même ordre d'idée, des études d'électrophysiologie réalisées sur des tranches aigües de cerveaux de souris transgéniques de deux lignées différentes, R6/2 et Z-Q175-KI, révèlent une réduction du courant tonique GABAergique dans les MSNs striataux en condition pathologique. Les expériences montrent qu'une partie du courant tonique est due au débordement du GABA synaptique et une autre partie aux transporteurs astrocytaires du GABA, GAT-3 qui libèrent du GABA en conditions contrôles en fonctionnant en mode inversé. La diminution du courant tonique GABAergique chez ces souris, s'explique par le fait que les astrocytes striataux ne peuvent plus se dépolariser suffisamment pour entraîner la libération de GABA par GAT-3 (Wojtowicz et al, 2013). Ces données suggèrent que les astrocytes sont également touchés dans la maladie de MH et participent aux profondes modifications de transmission GABAergique observées dans cette

pathologie. D'autre part, des changements de connectivité neuronale apparaissent. Alors qu'il semble y avoir une perte de connectivité au sein du striatum entre les collatérales d'axones des MSNs, une connectivité bi-directionnelle entre D1-MSNs et D2-MSNs apparaît chez les souris MH ce qui n'est pas le cas en conditions physiologiques (Cepeda et al, 2013). De plus, des études menées sur les interneurons GABAergiques striataux montrent une augmentation de leur activité dans la MH suggérant une augmentation de l'inhibition qu'ils exercent sur les MSNs (Cepeda et al, 2013). Malgré la diminution du courant GABAergique tonique, l'ensemble de ces résultats semble démontrer une augmentation de la transmission GABAergique au sein du striatum. De manière sous-jacente, des recherches menées chez des rats transgéniques révèlent, par la mesure histochimique du cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale, une augmentation de l'activité métabolique neuronale globale dans le GPe et le NST. Les enregistrements électrophysiologiques indiquent quant à eux une diminution de la fréquence de décharge de la majorité des neurones du GPe et à l'inverse une augmentation de l'activité électrique des neurones du NST. Ces résultats suggèrent que bien que le striatum soit la source primaire de dysfonction lors de la maladie de MH, une altération de l'ensemble des noyaux des GB et en particulier de la voie indirecte participe à la physiopathologie de la MH (Vlamings et al, 2012). D'autre part, des atteintes moléculaires des neurones pré-synaptiques peuvent également être observées dans la MH et sous-tendre les défauts de transmission GABAergique. Les niveaux d'expression des enzymes GAD, requises pour la synthèse de GABA, peuvent être un bon marqueur de l'activité GABAergique. Des expériences d'hybridation *in situ* sur des souris transgéniques R6/2 montrent que les niveaux d'expression de la GAD67 sont normaux dans le striatum mais altérés dans plusieurs autres régions cérébrales comprenant le GPe (Gourfinkel-An et al, 2003). Concernant la GAD65 qui est principalement associée aux vésicules de libération synaptiques dans les neurones pré-synaptiques, des études de modèles cellulaires de la MH montrent que son expression est significativement réduite et sa localisation altérée quand la protéine de HTT mutée est présente (Rush et al, 2012).

Rationnel scientifique:

Rationnel scientifique :

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, la transmission GABAergique joue un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activité du GPe. Bien que l'anatomie et la connectivité entre les différents noyaux du réseau des GB soient connues, l'origine des modifications d'activité neuronale observées dans le GPe dans la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington, tant sur le plan de la circuiterie qu'à l'échelle moléculaire reste mal comprise. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces changements d'activité électrique pallidale dans ces différentes conditions pathologiques. Concernant la maladie de Parkinson, deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'hypoactivité des neurones du GPe:

- 1) une hyperactivité des neurones striataux de la voie indirecte (Ingham et al, 1997 ; Kita & Kita, 2011; Mallet et al, 2006). En adéquation avec ces données, il est connu que les concentrations extracellulaires de GABA sont anormalement élevées dans le GPe en condition parkinsonienne bien que la source de cette augmentation de GABA ne soit pas clairement établie (Ochi et al, 2000).
- 2) une perte d'excitabilité des neurones du GPe (Chan et al, 2011).

Le principal objectif de mon travail de thèse a donc consisté à clarifier les mécanismes impliqués dans l'hypoactivité du GPe.

Dans un premier temps, et en collaboration avec l'équipe du Dr Bevan à Chicago, nous avons testé si :

- 1) l'excitabilité des neurones prototypiques du GPe, dont l'activité électrique est particulièrement perturbée en conditions parkinsoniennes, était réduite suite à une déplétion dopaminergique.
- 2) Les neurones D2-MSN étaient hyperactifs *in vivo* après une déplétion dopaminergique.
- 3) inhiber selectivement l'activité des D2-MSN pouvait restaurer une activité normale au niveau des neurones prototypiques du GPe.

Ce projet a donné lieu à un premier article en préparation, auquel j'ai participé en comparant l'excitabilité des neurones prototypiques PV⁺ chez des animaux contrôles et 6-OHDA (Figure 5)

Nous nous sommes ensuite intéressés de plus près à la transmission GABAergique dans le GPe afin d'étudier les modifications synaptiques induites par une déplétion chronique en dopamine. Nous avons identifié la présence d'une inhibition tonique aberrante au sein du GPe en condition parkinsonienne. Nous avons donc voulu comprendre les causes de cette

inhibition tonique et ses conséquences sur l'activité électrique pallidale en condition de déplétion dopaminergique.

Pour cela, en utilisant des techniques électrophysiologiques, d'immunohistochimie et de biochimie, nous avons étudié :

- le rôle de l'activité striatale dans l'établissement du courant tonique
- la caractérisation et l'expression des récepteurs extra-synaptiques
- le rôle des transporteurs au GABA dans la régulation des concentrations extracellulaires de GABA
- la présence d'une inhibition tonique dans les différentes sous-populations pallidales
- l'impact de l'inhibition tonique sur la fréquence et le patron de décharge des neurones du GPe
- le rôle des astrocytes dans le contrôle de l'homéostasie GABAergique au niveau du GPe

Ce travail est mon principal projet de thèse. Il a donné lieu à un second article en préparation.

Concernant la maladie de Huntington, la lésion anatomique fondamentale caractérisée par la dégénérescence des MSNs striataux pourrait être à l'origine de l'hyperactivité pallidale (Deng et al, 2004; Reiner et al, 1988; Starr et al, 2008). Mais comment expliquer que cette dégénérescence ne soit pas nécessaire à l'apparition des symptômes moteurs dans certains modèles animaux de référence tel que les lignées transgéniques R6? Il est donc important dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie, d'étudier la neurotransmission GABAergique à des stades asymptomatiques. Pour compléter les connaissances dans ce domaine, le second objectif de ma thèse a donc été de caractériser les altérations électrophysiologiques et moléculaires de transmission GABAergique au sein du GPe chez un modèle transgénique de la maladie de Huntington, la lignée de souris R6/1. Ce travail a été.

Dans ce projet, réalisé en collaboration avec le Dr Maurice Garret à l'INClA, ma contribution a concerné les expériences d'électrophysiologie (Figures 3 et 4). Il a donné lieu à un article soumis au journal « Neuroscience ».

Matériels et méthodes :

Matériels et méthodes :

I. 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. Les animaux sont logés sous un cycle circadien lumière – obscurité 12h:12h avec de l'eau et de la nourriture fourni *ad libitum*.

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 (voir ci-dessous) et le rat (*Ratus norvegicus*) qui est actuellement l'un des meilleurs modèles d'étude de la maladie de Parkinson.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé les lignées de souris suivantes : C57Bl6, *GABRD*^{-/-}, R6/1, PV-ires-Cre (Jax lab, #8069), *Nkx2.1*-Cre (Jax lab, #8661) et Ai9 (Jax lab #7909). Les souris PV-ires-Cre et *Nkx2.1*-Cre ont été croisées avec la lignée Ai9 afin d'obtenir des souris F1 PV::Ai9 et *Nkx2.1*::Ai9.

1. Souris transgéniques et recombinaison Cre-Lox

Pour la réalisation de cette thèse, j'ai utilisé plusieurs lignées de souris transgéniques afin d'identifier :

1) La nature des récepteurs GABA_A extra-synaptiques dans le globus pallidus responsable du courant tonique. Puisque la sous-unité δ est majoritairement représentée dans les récepteurs GABA_A responsables du courant tonique, nous avons voulu tester sa présence dans ceux du GPe. Pour identifier la présence de la sous-unité δ dans les récepteurs GABA_A extra-synaptiques dans le GPe, nous avons utilisé une souris où le gène *GABRD*, codant pour la sous-unité δ , a été invalidé. Cette lignée a été obtenue par le laboratoire du Dr V.Crunelli. Ces souris nous ont permis de discriminer la composition en sous-unités des récepteurs GABA_A extra-synaptiques responsables du courant tonique dans le GPe.

2) Les différentes populations neuronales du GPe. Les lignées PV::Ai9 et *Nkx2.1*::Ai9, m'ont permis d'identifier les neurones prototypiques du GPe grâce à l'expression de la protéine double tomato (dt). Les neurones arkypallidaux ont pu être identifiés par l'absence de fluorescence des neurones du GPe chez les souris *Nkx2.1*::Ai9. Les lignées, appelées PV::Ai9 et *NKX2.1*::Ai9 ont été obtenues par le croisement entre la lignée PV-ires-Cre ou *NKX2.1*-ires-Cre et la lignée reportrice Ai9 (Madisen et al 2010). Pour les lignées PV-ires-

Cre et NKX2.1 -Cre, le gène codant une recombinase bactérienne (Cre) est sous le contrôle du promoteur des gènes d'intérêts, c'est à dire exprimée de manière spécifique dans les neurones exprimant la parvalbumine ou le facteur de transcription Nkx2.1. La lignée Ai9 est une lignée reportrice, c'est à dire que l'ensemble des cellules de la souris possède le gène de la protéine dt flanquée de deux sites LoxP. Ainsi l'expression de la protéine fluorescente dt est conditionnée à la présence de la Cre dans les neurones. La protéine Cre est une recombinase, identifiée chez le bactériophage P1. Elle agit lorsqu'elle reconnaît, dans un segment d'ADN, une séquence de 34 paires de bases, appelée *loxP* (Kilby et al 1993). Lorsque deux sites *loxP* sont orientés dans le sens contraire, la Cre recombinase induit la rotation dans le bon sens de la séquence d'ADN située entre les deux sites loxP permettant ainsi son expression. L'utilisation du système Cre/loxP permet d'obtenir des expressions conditionnelles chez l'animal en cours de développement et chez l'adulte (Gu et al 1994). Le principe est de développer dans un premier temps des souris porteuses d'un allèle dans lequel deux sites loxP encadrent une partie du gène d'intérêt sans pour autant perturber son fonctionnement. Ces souris sont ensuite croisées avec une souris transgénique qui exprime la Cre dans un type cellulaire, grâce à l'emploi de séquences régulatrices appropriées. Chez les souris issues de ce croisement, la recombinase entraîne l'excision et la rotation des séquences situées entre les sites loxP et induit donc une expression conditionnelle dans un type cellulaire donné. Nous avons utilisé les lignées PV::Ai9 et Nkx2.1::Ai9 pour visualiser *in vitro* les neurones PV ou NKX2.1 positifs du GPe par détection de la « dt » en épifluorescence, afin d'enregistrer les courants GABAergiques dans ces différentes populations en conditions physiologiques et sous différentes conditions pharmacologiques.

3) l'altération de la transmission GABAergique STR-GPe à des stades asymptomatiques et symptomatiques de la maladie de Huntington. Concernant ce troisième point, nous avons utilisé une modèle de souris transgénique de la maladie de Huntington, la lignée R6-1. Ce modèle a été établi par l'insertion de l'exon 1 du gène humain « IT15 » de la protéine de Huntingtine avec une longue répétition de codons CAG (115 répétitions) dont l'expression est contrôlée par le promoteur du gène « IT15 ». Ces souris possèdent l'avantage d'avoir une durée de vie de 8-10 mois avec l'apparition de troubles comportementaux (tremblements, déficits moteurs et cognitifs, perte de poids) vers 4-5 mois précédée par l'apparition d'inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques d'agrégats contenant la protéine mutée. Ces caractéristiques nous permettent de répondre parfaitement au projet consistant à étudier les altérations du système GABAergique au stade asymptomatique et symptomatique.

2. Modèle rongeur de déplétion dopaminergique

A. Mode d'action de la 6-OHDA

Afin d'étudier la transmission GABAergique en condition normale et en condition de déplétion dopaminergique, nous avons utilisé un modèle animal d'étude de la maladie de Parkinson : les rongeurs lésés à la 6-hydroxydopamine 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 respiratoire mitochondriale, 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 (FMT), 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. Cette lésion va également produire la dégénérescence des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) dont les axones transitent par le FMT.

A1. Protocole chirurgical pour l'injection de « 6-hydroxydopamine » (6-OHDA)

Les rongeurs, des rats Sprague–Dawley âgés de 16-19j et souris âgées de 30-45j, sont anesthésiés avec de l'isoflurane (induction à 3 % et maintien à 1,5 %) pendant toute la durée de l'intervention. Après avoir placé l'animal dans un cadre stéréotaxique numérique (Kopf), sur une couverture chauffante à 37°C, un gel ophtalmique (Ocryl-gel) est appliqué sur ses yeux, sa tête est rasée et de la bétadine dermique 10% est appliquée sur la peau du crâne. Le crâne est alors mis à nu puis séché afin de distinguer deux repères anatomiques : le bregma et le lambda. La position du crâne est ajustée afin d'aligner le bregma et le lambda sur l'axe horizontal puis l'appareil stéréotaxique est étalonné à partir des coordonnées du bregma. Une crâniotomie est alors réalisée au niveau des coordonnées stéréotaxiques correspondant au faisceau médian du télencéphale (FMT). Pour le rat, les coordonnées d'injection à partir du bregma sont : AP : -2.4 mm, L : -1.2mm, P : -7.4/-7.9 mm et pour la souris AP : -0.7 mm, L, -1.2 mm, P, -4.7 mm. La lésion du système dopaminergique est réalisée de manière unilatérale. Pour cela, 1 μL de 6-OHDA ($4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dans du NaCl 0,9 % contenant 0,02% d'ascorbate) par point est injecté au moyen d'une canule reliée à un pousse-seringue (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Une solution de désipramine ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) est injectée par voie intrapéritonéale 30 min avant l'injection de 6-OHDA afin de

protéger les neurones noradrénergiques et ainsi garantir la sélectivité de cette neurotoxine pour le système dopaminergique. La canule est 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 est suturée et désinfectée avec de la bétadine dermique 10%. Après récupération de l'anesthésie, les animaux sont surveillés pendant 2 heures après l'opération, puis chaque jour pendant les 2 premiers jours post-opératoires.

A2 Evaluation comportementale du degré de lésion dopaminergique

Quinze 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 développé par le groupe du Dr T. Schallert (Schallert et al, 2000). Chaque rat a été placé dans un cylindre en plexiglass de 20 cm de diamètre et laissé libre de leurs mouvements. Pendant 10 minutes, le nombre d'appuis réalisés sur la paroi du cylindre avec les pattes avant ipsilatérales et contralatérales à la lésion a été relevé et exprimé 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 est confirmée par immunohistochimie après les enregistrements électrophysiologiques (voir paragraphe 4.3).

II. Enregistrements électrophysiologiques sur des tranches fraîches de cerveau de rongeur

1. Préparation des tranches

Les expériences électrophysiologiques ont été réalisées sur des tranches aigües de cerveau de rat (souche Sprague-Dawley) et de souris transgéniques. Les rats et les souris utilisés dans notre étude sont issus de portées naturelles et âgées de 24 à 45 jours post-nataux pour les expériences d'électrophysiologie concernant l'inhibition tonique. Après anesthésie générale par injection en intra-péritonéale d'un mélange Kétamine (75mg/Kg) et Xylazine (10 mg/Kg), une thoracotomie est rapidement effectuée, suivie par une perfusion intracardiaque de 20 mL de solution enrichie en sucrose (solution de prélèvement, **tableau 1**), oxygénée par un mélange de 95% d'O₂ et 5% de CO₂ et préalablement refroidie entre 0 et 4°C. Cette étape permet de remplacer le sang du cerveau par la solution de prélèvement afin de ralentir

le métabolisme cellulaire des neurones et de réduire l'excitabilité cellulaire et l'activité synaptique en raison de la faible concentration extracellulaire en ions sodium et calcium. L'animal est ensuite décapité, les os du crâne sont retirés et le cerveau est mis à nu. Les deux hémisphères sont séparés grâce à une incision au scalpel au niveau de la ligne médiane. Ils sont ensuite retirés et placés dans une boîte de Pétri contenant la solution de prélèvement froide et oxygénée. L'isolation du cerveau doit être effectuée rapidement pour garantir une bonne survie neuronale, mais le soin et la délicatesse des opérations sont des éléments importants pour obtenir des tranches de cerveau d'excellente qualité. Les 2 hémisphères sont collés séparément sur un porte échantillon afin d'être découpés en tranches de 350µm d'épaisseur dans le plan sagittal avec un vibratome (VT1200S, Leica Microsystems).

2. Solutions

A. Solutions extracellulaires

Les solutions extracellulaires utilisées sont adaptées pour reproduire les milieux physiologiques des neurones dont les compositions sont présentées dans le **tableau 1**. L'osmolarité est contrôlée pour éviter les chocs osmotiques entre l'intérieur et l'extérieur des neurones. A noter que les solutions sont maintenues à un pH de 7,3- 7,4 grâce au bullage constant par un mélange gazeux O₂/CO₂ (95% / 5%). La concentration des différents sels est également calculée pour respecter les valeurs théoriques des potentiels d'équilibre des ions. Du pyruvate (110 mg/L) et du glutathion (1,5 mg/L), sont ajoutés dans la solution d'ACSF standard pour alimenter le cycle de Krebs et ainsi empêcher la mort cellulaire pendant le temps de récupération.

Composition (en mM)	NaCl	KCl	NaH ₂ PO ₄	CaCl ₂	NaHCO ₃	MgSO ₄	D-Glucose	Saccharose
Solution de prélèvement	-	2,5	1,25	0,5	26	10	10	250
ACSF standard	126	2,5	1,25	2	26	2	10	-
ACSF modifié	126	3	1,25	1,6	26	1,5	10	-

Tableau 1 : Composition des solutions extracellulaires :

Ces solutions ont été utilisées pour le prélèvement et la perfusion des tranches ; Osmolarité : 310-315 mOsm ; pH ~ 7,35.

B. Solutions intracellulaires

Pour les enregistrements de patch-clamp, nous avons utilisé une solution intrapipette riche en Césium chlore (CsCl) dont la composition est décrite dans le **tableau 2** ci-dessous. Lors des expériences réalisées en mode «*cellule entière*», la solution de CsCl est filtrée puis

directement ajoutée dans l'électrode d'enregistrement. Pour les expériences de patch perforé, 0,15 µL de solution stock de gramicidine (15 mg/mL) préparée fraîchement le jour de l'expérience dans du Dimethyl sulfoxide (DMSO) sont dilués dans 100 µL de solution intrapipette de potassium méthyl sulfate (KMeSO₄) juste avant de remplir l'électrode. Pour faciliter l'établissement du gigaseal, la pointe de l'électrode est remplie avec de la solution sans gramicidine. Dans certains cas, de la biocytine (2,5mg.mL⁻¹) a été ajoutée dans la solution intracellulaire pour l'identification post-hoc du neurone enregistré en immunohistochimie. Pour les expériences de cellule attachée configuration « loose seal », nous avons utilisé la solution d'ACSF modifié comme solution intracellulaire. Afin de tamponner efficacement cette solution, le bicarbonate a été remplacé par de l'HEPES (cf HEPES-ACSF, **tableau 2**).

Composition en (mM)	CsCl	KMeSO ₄	NaCl	MgCl ₂	HEPES	EGTA	Na ₃ GTP	Mg _{1,5} ATP	QX314	CaCl ₂	KCl
CsCl	135	-	3,6	1	10	0,1	0,4	2	2	-	-
KMeSO ₄	-	135	3,8	1	10	0,1	0,4	2	-	-	-
HEPES-ACSF*	-	-	140	1,5	15	-	-	-	-	1,6	3

Tableau 2 : Composition des solutions intracellulaires :

Ces solutions ont été utilisées pour les enregistrements de patch-clamp ; Osmolarité : 290-295 mOsm; pH~ 7.2 ajusté avec du KOH (*305-315 mOsm, pH=7,4 ajusté avec NaOH)

3. Enregistrements électrophysiologiques

A. La chambre d'enregistrement

Une tranche est placée dans la chambre d'enregistrement et observée avec un microscope droit équipé d'un système de contraste interférentiel différentiel (DIC) à infrarouge (Eclipse workstation E600FN; Nikon). L'observation se fait grâce à une caméra « noir et blanc » (C7500-51 ; Hamamatsu) sur un moniteur analogique, d'abord à l'objectif x4 pour repérer le GPe, puis à l'objectif x60 à immersion (Fluor 60x/1.00W ; Nikon) afin de visualiser le corps cellulaire des neurones pour pouvoir les enregistrer intracellulairement. Pendant les expériences, les tranches sont perfusées en permanence à un débit de 2-3 mL/min avec de l'ACSF modifié oxygéné et maintenu à une température entre 32 et 34°C.

B. Préparation des électrodes de patch-clamp

Les enregistrements de patch-clamp sont réalisés avec des pipettes de borosilicate préparées grâce à une étireuse horizontale (P-97 ; Sutter Instruments, Novato, CA). Une fois remplie avec la solution intracellulaire de CsCl pour les enregistrements en « potentiel imposé », les pipettes (GC150F-10 ; Warner Instruments, Hamden, CT) ont une résistance

comprise entre 3 et 6 M Ω . Pour ces enregistrements, nous avons utilisé du verre avec filament pour faciliter le remplissage de l'électrode avec la solution intracellulaire. Pour les enregistrements électrophysiologiques en patch perforé, nous avons utilisé des pipettes sans filament (GC150-10 ; Warner Instruments, Hamden, CT) afin de retarder le mélange de la solution intracellulaire de KMeSO₄ contenant la gramicidine avec la solution de KMeSO₄ sans l'antibiotique présente à la pointe de l'électrode.

C. La technique du patch-clamp

C1. Enregistrements en configuration «cellule détachée ou loose-seal»

Cette configuration consiste à l'aide d'un micromanipulateur à approcher une microélectrode de verre d'un diamètre de pointe de l'ordre du μm vers la membrane du neurone, afin d'établir un faible contact entre les parois de l'électrode et la membrane. En effet, cette configuration se caractérise par une faible résistance électrique de l'ordre de 20 à 30 M Ω entre le neurone et l'électrode. Les enregistrements en «*cellule détachée*» ont été réalisés exclusivement en mode « courant imposé » sans imposer de courant au neurone ($I=0$ pA). Il est nécessaire d'appliquer une pression positive légère à l'électrode afin de coller partiellement la membrane du neurone. Lors de cette technique de patch clamp en « cellule détachée », la pipette n'est pas suffisamment proche de la membrane pour former une connexion complètement hermétique contrairement à la configuration « cellule attachée », ni pour percer la membrane de la cellule. La membrane cellulaire reste intacte, et l'absence d'un joint étanche crée une petite brèche par laquelle les ions peuvent passer à l'extérieur de la cellule sans entrer dans la pipette. Un avantage important de cette technique est que la pipette qui est utilisée peut être enlevée et la membrane du neurone reste intacte. Cela permet des mesures sur une cellule sans détruire l'intégrité de la membrane. Nous avons utilisé cette configuration pour réaliser des enregistrements de longue durée (> 20 minutes) en continu afin de déterminer si des différences d'excitabilité des neurones prototypiques PV+ apparaissaient suite à une déplétion dopaminergique.

C2. Enregistrements 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 la micropipette en verre remplie d'une solution conductrice. Il est ainsi possible d'enregistrer et de manipuler l'activité électrique d'un neurone. Les propriétés de décharge des neurones sont le plus souvent étudiées dans cette configuration «*cellule entière*». Pour atteindre cette configuration, après l'obtention du scellement (c'est-à-dire l'obtention du « giga-seal »), on casse le bout de membrane sous

l'électrode par de petites dépressions abruptes afin d'accéder au milieu intracellulaire. 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. La plupart de nos expériences ont été réalisées en configuration « potentiel imposé » où le potentiel de membrane du neurone a été fixé au potentiel physiologique des neurones du GPe de -60mV. L'inconvénient de la configuration « *cellule entière* » est la dialyse du milieu intracellulaire des neurones, qui peut perturber les processus enzymatiques et affecter l'activité de décharge. Cet inconvénient devient un avantage pour faire diffuser de la biocytine dans les neurones.

C3. Enregistrements en potentiel imposé

Nous avons principalement travaillé en mode « potentiel imposé » pour mesurer les courants GABAergiques synaptiques et tonique dans les neurones GPe. Nous nous sommes focalisés sur le courant GABAergique tonique dans différentes conditions pharmacologiques et sur les animaux témoins ou déplétés en dopamine. Lors de ces enregistrements, les neurones ont été maintenus à un potentiel de -60 mV auquel est à ajouter le potentiel de jonction de -4mV de notre solution interne de CsCl-. Nous avons suivi en continu l'évolution de la résistance d'accès au cours de nos expériences via l'application d'une variation de potentiel de -5 mV pendant 50 ms, 1 fois toutes les 50s d'enregistrement ce qui nous permet lors de l'analyse des données d'exclure des neurones dont la résistance d'accès varie de plus de 20% entre les différentes conditions comparées. La résistance d'accès (R_a , en M Ω) 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.

➤ Enregistrements des IPSCs spontanés et miniatures

Les IPSCs spontanés et miniatures (indépendants des potentiels d'actions) ont été enregistrés à un potentiel de membrane fixé à -60mV en présence de bloqueurs de la transmission synaptique glutamatergique, APV 50µM, DNQX 20µM et de bloqueurs des récepteurs GABAergiques métabotropiques GABA_B, le CGP55845 1µM. Nous avons ajouté 0.5 µM de Tetrodotoxine (TTX) dans le milieu de perfusion pendant l'enregistrement des tranches aigües sagittales obtenues à partir de rats contrôle et 6-OHDA et de souris contrôle et R6-1 pour l'enregistrement des courants GABA_A miniatures.

C4. Le patch perforé

La technique du patch perforé constitue une alternative à la configuration «*cellule entière*», elle permet d'enregistrer sans dialyser et donc sans modifier le milieu intracellulaire du neurone et ainsi d'obtenir des enregistrements électrophysiologiques de meilleure qualité. Cette méthode utilise les propriétés des antibiotiques pour former des pores dans les membranes lipidiques perméables uniquement aux ions monovalents et aux molécules d'un diamètre inférieur à 10 Å. L'antibiotique que nous avons utilisé est la gramicidine, qui a pour particularité de ne laisser passer que les cations monovalents. La gramicidine est mélangée avec la solution intracellulaire à une concentration finale de 15-20 µg/mL. Une fois la configuration cellule-attachée obtenue, la gramicidine va perméabiliser le morceau de membrane qui se trouve sous la pipette et, progressivement, produire un accès électrique à l'espace intracellulaire. Une fois la phase de perforation stabilisée, ce qui prend entre 30 et 45 minutes, il est alors possible d'enregistrer l'activité de décharge des neurones sans perturber le milieu cytoplasmique. Néanmoins, cette technique reste difficile à utiliser car le risque de passer au cours de l'expérience dans la configuration «*cellule entière*» n'est pas négligeable, et si le morceau de membrane se rompt sous l'effet de l'antibiotique, celui-ci diffuse alors librement dans la cellule et perméabilise l'ensemble des membranes cellulaires. Ce changement brutal de configuration se traduit par un saut du potentiel de membrane de quelques mV dans nos conditions accompagné par une augmentation instantanée de l'amplitude des potentiels d'action. L'enregistrement est donc aussitôt arrêté. Le patch perforé a pour inconvénient de produire des résistances série élevées. Pour les expériences de potentiel imposé, nous avons préféré la configuration «*cellule entière*» au patch perforé afin d'obtenir les résistances série les plus faibles possibles et ainsi préserver les cinétiques des courants synaptiques.

D. Pharmacologie

Après avoir appliqué une substance pharmacologique modifiant durablement les propriétés des événements étudiés, comme les antagonistes GABAergiques, une tranche « naïve » a systématiquement été utilisée pour l'expérience suivante. L'ensemble des produits pharmacologiques utilisés au cours de ma thèse sont résumés dans le tableau 3 suivant

Drogue	Fournisseur	Concentration utilisée	Action
D-AP5	Abcam	50µM	Antagoniste des récepteurs NMDA
DNQX-disodium	Abcam	20µM	Antagoniste des récepteurs AMPA
GABAzine	Abcam	20µM	Antagoniste des récepteurs GABA _A
TTX citrate	Sigma	0,5µM	Antagoniste des canaux Na ⁺ dépendants du voltage
CGP 55845	Tocris	1µM	Antagoniste des récepteurs GABA _B
dopamine hydrochloride	Sigma	10µM	Agoniste des récepteurs dopaminergiques
quinpirole HCL	Tocris	2µM	Agoniste des récepteurs dopaminergiques D2
NCC 711	Tocris	10µM	Antagoniste des transporteurs GAT-1
THIP	Tocris	1µM	Agoniste des récepteurs δ-GABA _A
L-655,708	Tocris	1µM	Agoniste inverse des récepteurs α5-GABA _A
SNAP-25	Tocris	20µM	Antagoniste des transporteurs GAT-3
NPPB	Tocris	50µM	Inhibiteur des canaux bestrophines
Gadolinium	Sigma	100µM	Inhibiteur des canaux TRP
HC 030031	Sigma	40µM	Antagoniste des canaux TRPA1
AITC	Sigma	100µM	Agoniste des canaux TRPA1
Séléginine	Sigma	100nM	Antagoniste de l'enzyme MAOB
Bafilomycine	Abcam	4µM	Inhibiteur des ATPases vacuolaires (ATPase V)
Fluoroacétate	SIGMA	1mM	Inhibiteur du cycle de Krebs astrocytaire

Tableau 3 : liste des différentes drogues utilisées dans les expériences de pharmacologie sur tranches aigües.

E. Acquisition des données

Les signaux électrophysiologiques ont été mesurés grâce à un amplificateur de patch-clamp (Multiclamp 700B, Molecular Devices) connecté à une interface analogue/digital (Digidata 1320, Molecular Devices). L'acquisition des données électrophysiologiques a été réalisée

avec le logiciel PClamp 9.2. Les acquisitions ont été réalisées en utilisant une fréquence d'échantillonnage de 20 kHz.

F. Analyse des données

L'analyse des enregistrements électrophysiologiques pour l'analyse du courant tonique a été faite à l'aide des logiciels Clampfit 9.2 et Origin 7. Pour la détection des événements synaptiques et l'analyse de leurs paramètres cinétiques, nous avons utilisé le logiciel « detection mini » qui a été développé au sein de notre laboratoire par M. Goillandeau.

G. Mesure et Analyse de l'inhibition tonique

La méthode classique pour révéler un courant tonique dans des enregistrements électrophysiologiques sur tranches aiguës de cerveau en configuration « cellules entière » est d'appliquer des concentrations saturantes d'antagonistes spécifiques des récepteurs GABA_A, qui peuvent être la bicuculine, la gabazine (SR95531) ou encore la picrotoxine (PTX). En plus de bloquer les IPSCs, ce traitement révélera un courant tonique visualisable par le déplacement du courant entrant de maintien du neurone, si le potentiel d'inversion du chlore (ECl) est proche de 0 mV (ce qui est le cas dans nos enregistrements), et produira une réduction de variance du courant de base, en rapport avec la diminution du nombre de canaux GABA_A ouverts.

G1 Mesure du courant tonique

L'amplitude du courant tonique médié par les récepteurs GABA_A extrasynaptiques est généralement révélée par la mesure des modifications du courant de maintien du neurone provoqué par l'application d'un antagoniste du GABA comme la GABAzine (pour revue: (Bright & Smart, 2013)). Comme la plupart des enregistrements de neurones comprennent également des courants synaptiques inhibiteurs, il peut être important de les exclure de la mesure du courant tonique. Il existe deux méthodes simples qui sont généralement utilisées pour mesurer le déplacement du courant de maintien vers des valeurs moins négatives. Tout d'abord, le courant obtenu tout au long de l'enregistrement peut être échantillonné en réalisant la moyenne des points pendant 5 ms toutes les 100 ms. Cette fréquence d'échantillonnage permet de s'affranchir des IPSCs. Ensuite, il suffit de prendre la valeur moyenne des points pour obtenir des mesures du courant de maintien avant et après application de l'antagoniste (**Figure 34 A-B**). Alternativement, la seconde méthode consiste à analyser le courant de base en générant un histogramme de tous les points. La présence

d'IPSCs dans l'enregistrement donne une distribution de type poisson. Il est donc nécessaire d'appliquer sur les valeurs une distribution gaussienne pour s'abstraire de la transmission synaptique. Puis, la différence entre les moyennes des distributions gaussiennes sont utilisés pour définir les courants de maintien avant et après application de l'antagoniste (Figure 34C). Dans la pratique, ces deux méthodes pour calculer le déplacement du courant de base, ont tendance à produire des résultats identiques. Les courants toniques sont souvent normalisés par rapport à la capacité de la cellule (pA / pF) pour permettre la comparaison entre les cellules de différentes tailles.

Dans notre cas, nous avons utilisé une méthode alternative qui consiste à mesurer la médiane de tous les points en contrôle et en GABAzine sur une période de 30 s. Nous avons comparé cette méthode avec les deux méthodes précédentes et avons obtenu les mêmes valeurs de courants de maintien. Pour la représentation du courant de maintien dans les figures, nous avons opté pour un échantillonnage à une fréquence de 2Hz qui donne un résultat proche de la figure 34B.

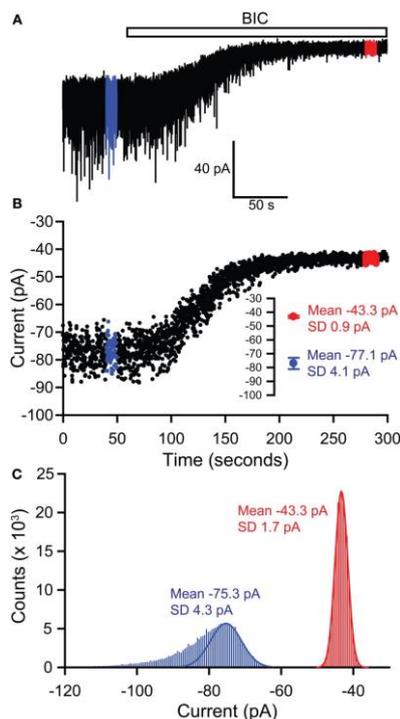


Figure 34: Méthodes pour mesurer le courant tonique. (A) Exemple d'un tracé électrophysiologique illustrant le blocage par la bicuculline (BIC) des récepteurs GABA_A synaptiques responsables des IPSCs et le blocage simultané des récepteurs GABA_A extra-synaptiques responsables du courant tonique. Les épisodes utilisés pour définir le courant tonique en conditions contrôle et bicuculline sont illustrées en bleu et en rouge respectivement.

(B) Le courant de maintien est échantillonné en réalisant la moyenne sur 5 ms toutes les 100 ms. Les valeurs de courant en contrôle et bicuculline sont alors calculées en réalisant la moyenne des valeurs sur une durée de 10 s. (C) Le courant tonique peut aussi être défini en réalisant un histogramme de tous les points pour la période contrôle et la période bicuculline. Une courbe de Gauss est alors appliquée sur la partie la plus positive de ces histogrammes. Les valeurs moyennes de ces courbes de Gauss sont alors utilisées pour obtenir la valeur des courants en conditions contrôle et bicuculline. Les valeurs obtenues avec ces 2 méthodes sont indiquées en encart dans les graphiques en B et C

III. Immunohistochimie

1. Prélèvement et préparation des tissus

Les expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur deux types de tissus : des coupes fines de 50 μM d'épaisseur ou des tranches sagittales de cerveau de 350 μM d'épaisseur utilisées pour les enregistrements électrophysiologiques. Les coupes de 50 μM ont été préparées à partir de cerveau fixés au paraformaldéhyde 4% (PFA). Les cerveaux sont conservés à -80°C jusqu'à la réalisation des coupes à l'aide d'un cryostat (Leica, CM3000) à une température de -19°C . Pour les tranches de 350 μM , ces dernières sont fixées avec du PFA 4% à la fin des enregistrements électrophysiologiques durant 1 nuit à 4°C puis conservées à 4°C dans du PBS (0,1M) additionné d'azide de sodium à 0,2% jusqu'à la réalisation des expériences d'immunohistochimie.

A. Révélation de la tyrosine hydroxylase par réaction enzymatique

La révélation de la tyrosine hydroxylase (TH) nous a permis de vérifier le degré de déplétion dopaminergique au niveau du striatum. Nous avons considéré pour les analyses uniquement les animaux ayant une déplétion dopaminergique supérieure à 70% de perte de fibres dopaminergiques TH positives dans le striatum du côté lésé par rapport au côté témoin (Miguelz 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 (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 (6 x 5min), les tranches ont été incubées 30 min dans du PBS 0,1M contenant de l' H_2O_2 à 3% afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Elles ont alors été rincées dans du PBS 0,1M (2 x 5min), 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 $1/10\ 000^{\text{e}}$ (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 $1/1000^{\text{e}}$ (Vectastain™ 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 $1/500^{\text{e}}$ (Vectastain™ 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 (ImmPACT™ 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 (VectaMount™ AQ H-5501, Vector Laboratories, USA).

La densité optique du marquage TH dans le striatum a été quantifiée à l'aide du logiciel « Mercator » (Explora Nova, La Rochelle, France) et du logiciel « Image J ». 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.

B. Marquages immunohistochimiques de GAT-3 sur les astrocytes

Les immunohistochimies ont été effectuées sur des tranches de 50 µm pour comparer le marquage de GAT-3 à la surface astrocytaire dans le GPe entre les rats témoins et 6-OHDA. Les animaux âgés de 30 à 35 jours ont été profondément anesthésiés à l'uréthane. L'oreillette droite est incisée puis une aiguille placée dans le ventricule gauche permet de perfuser les animaux, tout d'abord au moyen de 100 mL d'un tampon phosphate (PBS ; 0.1M, pH=7.4) puis avec 200 mL d'une solution fixatrice de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS avec une vitesse de perfusion constante de 15 mL/min afin d'évacuer tout le sang au niveau du cerveau et de fixer le tissu cérébral. Les animaux sont ensuite décapités, leur cerveau rapidement prélevé et post-fixé par immersion dans du PFA 4% et stocké à 4°C pendant la nuit. Les cerveaux sont ensuite placés durant 24 heures dans une solution de PBS-sucrose 20% afin de cryo-protéger le cerveau en vue de la congélation. Celle-ci s'effectue lorsque le cerveau est complètement imbibé de sucrose en le plongeant dans de l'isopentane préalablement refroidie à -45°C. Le cerveau est ensuite conservé à -80°C jusqu'au moment de la coupe. Des coupes de 50 µm d'épaisseur contenant le GP sont réalisées à -19°C selon le plan frontal au cryostat (Leica, CM3000) et sont conservées dans une solution protectrice de PBS-azide de sodium 0.2% à 4°C, afin de les protéger de toute infection fongique en attendant d'effectuer les immunohistochimies. Après un lavage de 5 minutes dans du PBS, les coupes sont placées 45 minutes dans une solution de saturation/perméabilisation PBS - Triton 0.5% à 4°C. Le Triton permet de perméabiliser les membranes cellulaires pour permettre la pénétration des anticorps. Les coupes sont ensuite mises pendant 2h dans du PBS-NGS 10% (normal goat serum) à 4°C. Le NGS permet de saturer les sites de fixation non spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées 48h à 4°C en

présence d'une combinaison de 2 anticorps primaires parmi lesquels : l'anti-GFAP (Millipore, ref : MAB3402, souris ; dilution 1/1000e) et l'anti-GAT-3 (Millipore ; ref : AB-1574, lapin, d=1/500e) dilués dans du PBS-NGS 2% pendant 48h à 4°C. Les coupes sont ensuite lavées (6 x 5 min) dans du PBS, avant d'être incubées 3 heures à 4°C avec les anticorps secondaires dilués au 1/500e couplés à différents fluorophores (Alexa-488 ; Alexa-568). Enfin les coupes sont lavées (6 x 5 min) puis sont montées sur des lames gélatinées, sous lamelle avec un milieu de montage préservant la fluorescence (H-1000 Vectashield ; Vector laboratories, USA).

C. Identification immunohistochimique des populations neuronales du GPe

Lors de nos expériences de patch-clamp réalisées sur les tranches de souris PV::Ai9 et Nkx2.1::Ai9, les neurones du GPe ont été remplis avec de la biocytine contenue dans la solution de patch-clamp par diffusion de l'électrode d'enregistrement au neurone. Les tranches de 350 µm d'épaisseur ont ensuite été fixées dans une solution de PFA 4% dans un tampon phosphate, PBS 0.1 M, pendant une nuit à 4°C puis conservées à cette même température dans du PBS-azide en attendant de réaliser les immunohistochimies.

C1. Immunohistochimie réalisées sur les souris PV::Ai9

Les tranches de 350 µm sont lavées (2 x 5 min) dans du PBS 0.1 M, puis placées dans une solution d'eau oxygénée H₂O₂ diluée à 3% dans du PBS 0.1M durant 15 min, afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les tranches sont ensuite lavées au PBS-Triton 0.3% (2 x 5min) avant d'être immergées dans un milieu de saturation/perméabilisation, le PBS-Triton 0.3%-Blocking reagent 0,5% (Individual fluorescein tyramide reagent Pack, PerkinElmer) durant 30 minutes afin de saturer les sites aspécifiques et de perméabiliser la membrane pour faciliter la pénétration des anticorps. Après cette étape, les tranches sont incubées toute la nuit à température ambiante avec les anticorps primaires anti-PV (Synaptic System, cochon d'Inde, d=1/10000e) et anti-FoxP2 (chèvre, d=1/200e) et de la Streptavidine 568 (d=1/500e) (ligand à très haute affinité de la biocytine) afin de révéler respectivement PV, FoxP2 et la biocytine. Les coupes sont lavées dans du PBS-Triton 0.3%-Blocking reagent 0,5% (6 x 5min), puis sont ensuite incubées pendant une 1h30 dans du PBS-Triton 0.3%-Blocking reagent 0,5% avec les anticorps secondaires, anti-cochon d'Inde HRP (d=1/1000e) et l'anti-chèvre Alexa 649 (d=1/500e). Les tranches subissent de nouveau un rinçage au PBS-Triton 0.3% (6 x 5min). À la fin du rinçage, elles sont incubées avec de la tyramide fluorescéine (d=1/100e dans une solution de diluent amplificateur) pendant 7 minutes. Enfin, elles sont de nouveau

rincées pendant 30 min (6 x 5min), pour être montées sur des lames gélatinées dans du vectashield puis recouvertes par une fine lamelle.

C2. Immunohistochimie réalisée sur les souris NKX2.1-Ai9T

Après les lavages de 2 x 5 minutes dans du PBS, les coupes de 350 μ M sont placées 1h30 dans une solution de saturation/perméabilisation PBS-BSA (bovin serum albumin) 1% - Triton 0.3%. Le Triton permet de perméabiliser les membranes cellulaires pour permettre la pénétration des anticorps et la BSA de saturer les sites de fixation non spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées une nuit à température ambiante en présence d'une combinaison de 2 anticorps primaires parmi lesquels : l'anti-FOXP2 (Forkhead Box 2 Protein ; Santa Cruz ; chèvre, d=1/200e) et l'anti-RFP (Chromotek, ref : 5f8, rat, d=1/1000e) dilués dans du PBS-BSA 1%-Triton 0.3%, pendant 1 nuit. Les coupes sont ensuite lavées (6 x 5 min) dans du PBS, avant d'être incubées 2 heures avec les anticorps secondaires dilués au 1/500e couplés à différents fluorophores (Alexa-594 et Alexa-647) et de la Streptavidine 488 (d=1/500e) (ligand à très haute affinité de la biocytine). Enfin, les coupes sont lavées (6 x 5 min) puis sont montées sur des lames gélatinées, sous lamelle avec un milieu de montage préservant la fluorescence (H-1000 Vectashield ; Vector laboratories, USA).

2. Acquisitions d'images

Les acquisitions des images ont été réalisées à la plateforme du Bordeaux Imaging Center (BIC) sur un microscope confocal SP8 sur un support droit DM6000 (Leica Microsystems) avec un objectif x40 à huile (HC plan Apo CS2 huile 40X NA 1.30). Ce microscope est équipé d'un laser à lumière blanche (WLL2) permettant une excitation à travers un large spectre de 470 à 670 nm (pas de 1 nm). L'analyse a été faite soit avec un scanner classique (10 Hz à 1800 Hz) ou un scanner à résonance (8000 Hz). Afin de limiter le bruit de fond, chaque image a été obtenue par un moyennage de 3 (Leica LAS Lite). Les images sont ensuite retravaillées avec le logiciel *Image J (NIH)*.

3. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Prism. La taille de nos échantillons étant le plus souvent trop faible pour déterminer si la répartition des données suit une loi normale, nous avons utilisé des tests non-paramétriques. Pour les données appariées, nous avons utilisé le test de Wilcoxon et pour les données non appariées, celui de Mann-Whitney. Pour les comparaisons entre plusieurs groupes, nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn. Les données ont été considérées comme significativement

différentes pour des valeurs de p inférieures à 0,05. Les résultats des articles 1 et 2 ainsi que les résultats complémentaires de l'article 2 dans les figures sont présentés sous la forme de boîte à moustache (ligne centrale : médiane ; boîte : valeurs interquartiles 25-75 ; les moustaches : valeurs interquartiles 10-90). Dans le texte, les valeurs sont représentées sous la forme médiane, interquartile 25 - interquartile 75. Pour l'article 3, les données sont présentées sous la forme de la valeur moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne).

Résultats:

Résultats I :

Origine de l'hypoactivité du GPe dans la maladie de Parkinson.

Article 1

Optogenetic interrogation of abnormal subthalamic nucleus-external globus pallidus network activity following the loss of dopamine

En préparation

Optogenetic interrogation of abnormal subthalamic nucleus-external globus pallidus network activity following the loss of dopamine

Callahan JW^{*1}, Kovaleski RF^{*1}, Chu HY^{*1}, Chazalon M^{2,3}, Wokosin D¹, Atherton JF¹, Normand E^{3,5}, Morin S^{2,3}, Chan CS¹, Surmeier DJ¹, Baufreton J^{2,3}, Bevan MD^{1#}

¹Department of Physiology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA.

² Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, F-33000 Bordeaux, France.

³ CNRS UMR 5293, Institut des Maladies Neurodégénératives, F-33000 Bordeaux, France.

⁴ Université de Bordeaux, Institut Interdisciplinaire des Neurosciences, F-33000 Bordeaux, France.

⁵ CNRS UMR 5297, Institut Interdisciplinaire des Neurosciences, F-33000 Bordeaux, France.

* C.J.W., K.R.F. and C.H.U. contributed equally to this work.

Corresponding author:

Dr Mark Bevan, Department of Physiology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA

E-mail: m-bevan@northwestern.edu

SUMMARY

Motor dysfunction in Parkinson's disease (PD) and its experimental models is associated with an abnormal rate and pattern of subthalamic nucleus-external globus pallidus (STN-GPe) network activity. In order to address the underlying mechanisms electrophysiological recording and optogenetic interrogation methods were applied to mice, which had received selective, lesions of midbrain dopamine neurons. Parkinsonian STN-GPe network activity was not due to strengthening of glutamatergic cortico-STN inputs or loss of autonomous activity in prototypic GPe neurons because opposite presumably homeostatic changes were observed. Instead, we found that following loss of dopamine hyperactive D2-expressing striatal projection neurons excessively inhibited pallido-subthalamic neurons leading to increased control of STN activity by the indirect pathway. Together with published studies, our findings suggest that abnormal activity and maladaptive plasticity of the indirect pathway are the principal drivers of parkinsonian STN-GPe network activity.

INTRODUCTION

The subthalamic nucleus-external globus pallidus (STN-GPe) network is a key component of the basal ganglia, a group of subcortical brain nuclei critical for movement and the major site of pathology and dysfunction in Parkinson's disease (PD) (Albin et al., 1989; Galvan and Wichmann, 2008; Hammond et al., 2007; Mink and Thach, 1993; Quiroga-Varela, 2013; Schmidt et al., 2013). The STN-GPe network has until recently been thought to comprise of reciprocally connected glutamatergic STN neurons and "prototypic" GABAergic GPe neurons, which in turn innervate common sets of GABAergic basal ganglia output neurons (Smith et al., 1998). Therefore, the network has been proposed to both powerfully regulate basal ganglia output and to act as an amplifier of oscillatory cortico-basal ganglia-thalamo-cortical activity. However, this view has been challenged by the discovery of a subclass (20%) of GPe neurons, so-called "arkypallidal" neurons, which do not innervate the STN but instead project exclusively and massively to the striatum (Abdi et al., 2015; Dodson et al., 2015; Mallet et al., 2012). Furthermore, the activity patterns of prototypic and arkypallidal GPe neurons *in vivo* (Magill et al., 2008a; Mallet et al., 2012) together with modeling suggest that arkypallidal rather than prototypic neurons are the primary target of the STN (Nevado-Holgado et al., 2014).

The major afferents of the STN-GPe network arise from 1) layer V cortical pyramidal neurons, which project to the STN amongst other targets (Degos et al., 2008; Kita and Kita, 2012; Nambu et al., 1996) and 2) D2-expressing striatal

projection neurons (D2-SPNs) (Chang et al., 1981; Gerfen et al., 1990), which project to the GPe. The STN-GPe network is therefore an integral component of the movement-suppressing hyperdirect and indirect pathways of the basal ganglia. The hyperdirect pathway transmits cortical excitation to basal ganglia output nuclei via the STN (Maurice et al., 1999; Tachibana et al., 2008) and thus rapidly constrains movement (Baunez et al., 1995; Nambu et al., 2002; Mink and Thach, 1993). The indirect pathway, which courses through the striatum, GPe and STN, elevates basal ganglia output more slowly and may play roles in movement prevention and termination (Albin et al., 1989; Kravitz et al., 2010; Maurice et al., 1999; Mink and Thach, 1993; Tachibana et al., 2008). Following cortical stimulation, the responses of individual STN and GPe neurons *in vivo* indicate that the hyperdirect and indirect pathways converge onto individual STN and GPe neurons (Fujimoto et al., 1993; Kita, 1992; Maurice et al., 1998).

Under normal conditions, the activity of the STN-GPe network is relatively de-correlated and related to movement in a complex manner (Arakadir et al., 2004; Elias et al., 2007; Matsumara et al., 1992; Wichmann et al., 1994a; Isoda and Hikosaka, 2008). In contrast, the activity of the parkinsonian STN-GPe network is more highly correlated and coherent with rhythmic cortical activity (Goldberg et al., 2002; Jenkinson and Brown, 2011; Magill et al., 2001; Mallet et al., 2008a; Quiroga-Varela et al., 2013; Sanders et al., 2013; Sanders et al., 2013; Sharrot et al., 2014; Shimamoto et al., 2013; Tachibana et al., 2011; Whitmer et al., 2012). The discharges of prototypic

and arkypallidal GPe neurons are also relatively phase-offset or phase-aligned to cortico-STN activity, respectively (Mallet et al., 2008a, 2012). Critically, this abnormal pattern of STN-GPe network activity is tightly linked to motor dysfunction, and treatments that de-correlate STN-GPe network activity, such as STN deep brain stimulation or levodopa treatment, are highly therapeutic (Agnesi et al., 2013; Benabid et al., 2009; Brown et al., 2001; Eusebio et al., 2012; Heimer et al., 2002; Whitmer et al., 2012; Zaidel et al., 2010). In addition, the mean rates of GPe and STN activity decrease and increase, respectively, following the loss of dopamine (Albin et al., 1989; Galvan and Wichmann, 2008).

The origins of parkinsonian STN-GPe network activity remain poorly understood. Because abnormal activity emerges slowly, days to weeks after acute loss of dopamine in animal models, plasticity within the circuit may be important (Degos et al., 2009; Mallet et al., 2008b; Vila et al., 2000). Indeed, increases in the strength and influence of hyperdirect cortico-STN inputs (Moran et al., 2011) and/or GPe-STN inputs (Chu et al., 2015; Moran et al., 2011), loss of autonomous GPe activity (Chan et al., 2011), and hyperactivity (Mallet et al., 2006; Moran et al., 2011) and plasticity of D2-SPNs (Day et al., 2006; Gittis et al., 2011) triggered by the loss of dopamine have each been hypothesized to play important roles. In order to address these hypotheses, we used a combination of *in vivo* and *ex vivo* electrophysiological recording techniques in combination with optogenetic interrogation in vehicle-injected control and 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-injected dopamine-depleted

mice, respectively. Stereotyped cortical activity states available during anesthesia have been utilized to probe the mechanisms underlying abnormal cortical patterning of the dopamine-depleted basal ganglia (e.g. Magill et al., 2001; Mallet et al., 2008a, 2012; Tseng et al., 2001). We therefore compared the impact of optogenetically inhibiting parvalbumin (PV) expressing GPe neurons, STN neurons and A2A-expressing D2-SPNs on STN-GPe network activity during cortical slow-wave activity (SWA) and cortical activation (ACT) in control and chronic, dopamine-depleted mice under urethane anesthesia. *Ex vivo*, we compared the density and strength of cortico-STN inputs and the autonomous activity of PV-expressing GPe-STN neurons in brain slices derived from control and parkinsonian mice. Using these approaches, we elucidate key cellular and circuit mechanisms contributing to abnormal STN-GPe network activity that follows loss of dopamine.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Procedures involving mice were performed in accordance with the policies of the Society for Neuroscience, the National Institutes of Health, the European Communities Council Directives 86/609/EEC and 2010/63/EU, and the Institutional Animal Care and Use Committees of Northwestern and Bordeaux Universities. Adult (p50–100) C57BL/6, PV-cre (Hippenmeyer et al., 2005) and A2A-cre (Gong et al., 2007) and PV-cre/Ai9 (Madisen et al., 2010) mice were used.

Stereotaxic injection of 6-OHDA and AAV vectors

Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (87/13 mg/kg⁻¹, IP), injected with desipramine (25 mg/kg, IP) and pargyline (50 mg/kg, IP) and then placed in a robotic, stereotaxic instrument (Neurostar, Sindelfingen, Germany). Anesthesia was maintained with 1-2% isoflurane (Smiths Medical PM, Inc., Norwell, MA). 2 µl 6-OHDA (3-4 mg/ml) in HEPES buffered saline (HBS)/0.02% ascorbate or HBS/0.02% ascorbate alone was then injected into the medial forebrain bundle (coordinates in mm from Bregma: AP, -0.7; ML, 1.2; DV, 4.7). AAV vectors (~10¹²⁻¹³ GC/ml; UNC Vector Core, Chapel Hill, NC; Penn Vector Core, Philadelphia, PA) were injected into the GPe of PV-cre mice (2 x 400 nl AAV9.CAG.FLEX.ArchT.GFP; AP, -0.27; ML, 1.8; DV, 3.3, 3.8) or the STN of C57BL/6 mice (300 nl

AAV9.CAG.ArchT.GFP.WPRE.SV40; AP, -2.06; ML, 1.4; DV, 4.45) or the primary motor cortex of C57BL/6 mice (3 X 300 nl AAV9.hSyn.hChr2(H134R)-eYFP; AP, 0.6, 1.2, 1.8; ML, 1.5; DV, 1.0) or the striatum of A2A-cre mice (4 x 400 nl AAV9-CAG-FLEX-ArchT-GFP; AP, 0.4, 0.9; ML, 2.2; DV, 3.0, 4.25).

In vivo electrophysiological recording

Data acquisition: Mice were anesthetized with urethane (1.25g/kg, IP) and supplements of ketamine/xylazine (14.4/1.6 mg/kg IP) were administered until the toe-pinch withdrawal reflex was abolished. Mice were placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) and craniotomies were made over the motor cortex and the STN and GPe or the striatum and GPe. Unit recordings were made using silicon tetrode/optrode arrays (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI). Prior to recording tetrode arrays were dipped in lipophilic fluorescent dye (Dil, 20mg/ml in 50% acetone/methanol) to enable subsequent reconstruction of recording sites. A custom light delivery system in which the output of a 580 nm laser (Coherent, Santa Clara, CA, USA) was reported by a light meter, modulated by a Pockels cell and controlled by a shutter (Vincent Associates, Rochester, New York) in the light path was used for optogenetic stimulation of ArchT. EEG was recorded from a peridural electrode placed over motor cortex. Single unit activity and EEG were acquired using a 64-channel Digital Lynx (Neuralynx, Boseman, MT) amplifier with a sampling frequency at 40 kHz referenced against a wire overlying the ipsilateral temporal

musculature. Unit activity was band pass-filtered at 200-9,000 Hz. The EEG was low pass-filtered filtered at 400Hz. Coincident unit activity and cortical EEG was recorded during SWA and tail pinch-evoked ACT with and without optogenetic inhibition. 5 sec optogenetic inhibition was repeated up to 3 times with an interval of at least 3 minutes. Following recording, mice were perfuse-fixed in 4% paraformaldehyde and post-fixed in the same solution for up to 1 hour.

Anatomical analysis: Perfuse-fixed brains were first sectioned at 70 μm on a vibratome (VT1200S; Leica Microsystems Inc., IL, USA). Sections were then processed for immunofluorescent detection of NeuN or PV or FoxP2 or TH and then imaged on an epiifluorescent microscope equipped with digital imaging (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and a 3D reconstruction and stereological analysis system (MBF Bioscience, Williston, VT). Recording and optogenetic stimulation locations were then reconstructed in 3-D using Dil labeling, NeuN immunoreactivity and ArchT-GFP expression. PV, FoxP2 and ArchT expression in the GPe was quantified stereologically using the optical fractionator. Every fourth slice, a grid size of 300 x 300 μm and a counting frame of 100 x 100 μm was applied. A 1 μm guard zone from the surface of the section was applied and neurons were then counted from images recorded at 1 μm intervals for 5 μm . Striatal TH immunofluorescence was quantified in ImageJ (NIH).

Electrophysiological analysis: Spike data was first sorted into single unit activity using Offline Sorter (Plexon, Dallas, TX). Signal conditioning and further analyses were carried out using MATLAB (MathWorks, Natick, MA). The EEG was down-sampled offline to 250 Hz and band pass-filtered between 0.5-1.5 Hz in the forward and reverse directions using a 2nd order Butterworth filter. The mean rate of single unit activity was calculated from the reciprocal of the mean interspike interval (ISI). The coefficient of variation of a single units ISIs was also calculated. To investigate how the activity of single neurons varied with respect to coincident SWA, the Hilbert transform was applied to the EEG to derive the phase relationship between each action potential and SWA. During SWA peaks in the EEG were defined as 0° and troughs as 180°. Phase non-uniformities in SWA were corrected with the empirical cumulative distribution function of MATLAB. Polar plots and statistical analyses of phase preference were then generated using the CircStat toolbox (Berens, 2009) for MATLAB. On polar plots an individual neuron's phase preference was plotted as a line, the angle of which denoted its mean phase preference and the length of which reflected the resultant vector of its spikes within the analysis period. The mean phase angle of each neuron was also used to calculate a population vector, the angle of which denoted the median phase preference and the length of which reflected the resultant vector. The Kuiper two-sample test (circular analogue of the K-S test) was used to determine if phase preference differed significantly between two sample populations. Finally, phase locking of single unit activity to SWA was tested using the nonparametric Hodges-

Ajne test (Omnibus test) for non-uniformity. Fisher's exact test was applied to determine whether the number of neurons exhibiting phase-locking was significantly different between the two sample populations. Significantly and non-significantly phase-locked neurons were also distinguished on polar plots by different colors.

Ex vivo electrophysiology

Slice preparation: Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (87/13 mgkg⁻¹, IP), and perfused transcardially with sucrose-based artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at 1-4°C. Parasagittal brain slices (electrophysiology, 250 µm; immunohistochemistry, 200 µm) containing the STN or the GPe were prepared in the same solution using a vibratome (Leica Microsystems Inc., IL). Slices were held in ACSF at 35 °C for 30 min and then at room temperature until recording.

Electrophysiology and optogenetic and stimulation: For electrophysiological recording and optogenetic stimulation slices were transferred to a recording chamber, perfused at a rate of ~ 5 ml/min with synthetic interstitial fluid (SIF) at 35-37 °C. Somatic patch clamp recordings were obtained using glass micropipettes filled with either: 1) a Cs⁺-methanesulfonate-based solution or 2) HBS SIF. Signals were low-pass filtered at 10 kHz and sampled at 20-50 kHz. Electrode capacitance and series resistance were compensated. For EPSC recordings whole-cell capacitance was

also compensated. Liquid junction potentials were corrected. EPSCs were evoked in the STN in the presence of GABA_A-R and GABA_B-R antagonists by optogenetic stimulation of the internal capsule rostral to the STN and were recorded in voltage-clamp mode using pipette solution 1. Optogenetic excitation was delivered via a 63X objective lens using a 470 nm light-emitting diode. Autonomous GPe PV neuron activity was recorded in the presence of GABA_A-R, GABA_B-R, AMPAR and NMDAR antagonists in current clamp mode using pipette solution 2.

Anatomical analysis: eYFP, dTomato and immunofluorescent labeling for vGluT1, PV, FoxP2 and TH were visualized using epifluorescent or confocal laser scanning microscopy. To visualize expression of AAV vectors in the motor cortex and STN or dTomato expression in the GPe and/or immunoreactivity for vGluT1, PV or TH brain slices were first immersion fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4 °C either 1 hour after slice preparation or immediately following recording. Some slices were then processed for immunofluorescent detection of vGluT1, PV or TH. Slices were then imaged on an epifluorescent microscope equipped with digital imaging and a 3D reconstruction and stereological analysis system or a confocal microscope. The density of vGluT1 immunoreactive structures in the STN and the area of the STN were estimated stereologically using the dissector and Cavalieri techniques, respectively (West, 1999). Cellular expression of dTomato, PV and FoxP2 in the GPe were quantified stereologically using the optical fractionator, as described

above. The intensity of striatal TH immunofluorescence was quantified, as described above (NIH).

Statistical analysis

Paired and unpaired data were compared using the non-parametric Wilcoxon sign rank test and the Mann-Whitney U test, respectively. Population data were expressed as median and interquartile range. Line plots were used to illustrate paired data. Box plots (central line; median, box; 25%-75%, whiskers; 10%-90%) were used to illustrate data if some statistical comparisons were for unpaired data. Data were corrected for multiple comparisons by multiplying p values by the number of comparisons. P values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

The rate and pattern of PV expressing prototypic GPe neuron activity *in vivo* is altered by dopamine depletion

The majority of prototypic GPe neurons express the calcium-binding protein PV and project to the STN (Abdi et al., 2015; Dodson et al., 2015; Hernández et al., 2015; Mastro et al., 2014). In order to identify and silence the activity of GPe PV neurons, ArchT-eGFP (Han et al., 2011) was virally expressed through injection of a cre-dependent adeno-associated viral (AAV) vector into the GPe of mice expressing cre-recombinase under the control of the PV promoter. Immunohistochemistry confirmed the robust and specific expression of ArchT-eGFP in PV-immunoreactive GPe neurons

(**Fig. 1**). 94.9% of ArchT-eGFP expressing neurons co-expressed PV (n = 2 mice). Less than perfect detection efficiency of PV by immunohistochemistry was the most likely reason for the absence of PV expression in 5.1% of ArchT-eGFP expressing GPe neurons. Consistent with their prototypic nature, ArchT-eGFP was strongly expressed by the axon terminals of GPe PV neurons in the STN (**Fig. 1**). In contrast, arky pallidal neurons, identified by their immunoreactivity for FoxP2 (Abdi et al., 2015; Dodson et al., 2015; Hernández et al., 2015) was not observed in ArchT-eGFP expressing GPe neurons (**Fig. 1**; n = 2 mice). Together these data confirm the specific expression of ArchT-eGFP in prototypic GPe PV neurons and the absence of ArchT-eGFP expression in Fox P2 expressing arky pallidal neurons.

In vivo, under urethane anesthesia, prototypic and arky pallidal GPe neurons exhibit distinct activity patterns relative to SWA and tail pinch-evoked ACT in dopamine-intact and -depleted rodents (Abdi et al., 2015; Mallet et al., 2008a, 2012; Magill et al., 2001). To determine whether ArchT-eGFP expressing GPe PV neurons exhibit similar firing patterns to those described previously for prototypic neurons, ArchT-eGFP was activated by orange light delivered via a fiberoptic positioned above an array of 4 tetrodes that were used to record GPe activity. Neurons that were rapidly and continuously inhibited when ArchT-eGFP was activated were considered to be prototypic GPe PV neurons (**Fig. 1**). Indeed, following light delivery, inhibited GPe neurons were only recorded when the optrode was positioned in sectors of the GPe that contained ArchT-eGFP expressing GPe PV neurons

(Fig. 1). The frequency and pattern of firing of GPe PV neurons, defined using these criteria, were then compared in vehicle-injected control and 6-OHDA-injected dopamine-depleted mice.

In control mice GPe PV neurons discharged in a tonic, irregular firing pattern (**Fig. 1**; vehicle: frequency = 25.6, 9.5-36.2 Hz; CV = 0.55, 0.44-0.72; n = 30). In dopamine-depleted mice, the rate of discharge of GPe PV neurons was not altered but the firing pattern was significantly more irregular relative to control (**Fig. 1**; 6-OHDA: frequency = 18.5-13.6, 30.6 Hz; $p > 0.05$; Mann-Whitney U test (MWU); CV = 0.96, 0.75-1.44; n = 34; $p < 0.001$; MWU). Although a similar proportion of GPe PV neurons (**Fig. 1**; vehicle: 13.3%, n = 4 of 30; 6-OHDA: 20.6%; n = 7 of 34; $p > 0.7446$; Fisher's exact test (F test)) exhibited activity that was significantly phase-locked to SWA, the mean phase of firing shifted to the inactive component of SWA in dopamine-depleted mice, (**Fig. 1**; vehicle: n = 30; 6-OHDA: n = 34; $p < 0.05$; Kuiper's test (K test)).

Loss of dopamine also altered the response of GPe PV neurons to tail pinch-evoked ACT in a manner that was consistent with earlier studies of prototypic neurons (**Fig. 1**) (Abdi et al., 2015; Magill et al., 2001; Mallet et al., 2008a, 2012). In vehicle-injected control mice, the firing of GPe PV neurons was not significantly altered by ACT (**Fig. 1**; vehicle: SWA = 20.6, 8.9-35.0 Hz; ACT = 26.8, 17.9-33.6 Hz; n = 21; $p > 0.05$; Wilcoxon signed rank test (WSR); SWA CV = 0.58, 0.50-0.97; ACT CV = 0.64, 0.47-0.76; n = 21; $p > 0.05$; WSR). In contrast, the firing of GPe PV neurons decreased markedly during ACT in parkinsonian mice (**Fig. 1**; 6-

OHDA: SWA = 16.2, 11.3-22.1Hz; ACT = 9.6, 2-16.5 Hz; n = 21; $p < 0.0005$; WSR; vehicle: SWA CV = 1.01, 0.73-1.47; ACT CV = 0.81, 0.51-1.36; n = 21; $p > 0.05$; WSR). As a result, the firing of GPe PV neurons was significantly lower in dopamine-depleted mice than in control mice during ACT ($p < 0.0001$; MWU). Together, these data demonstrate that loss of dopamine leads in prototypic GPe PV neurons to 1) firing that is relatively phase-locked to the inactive component of cortical SWA 2) profound inhibition of firing following the transition from SWA to ACT.

Impact of optogenetic silencing of GPe PV neurons on the STN in control and dopamine-depleted mice

To determine how loss of dopamine affects the manner in which prototypic GPe PV neurons pattern STN activity, the effects of optogenetically inhibiting ArchT-eGFP expressing GPe PV neurons for 5 seconds on STN neuron firing in control and dopamine-depleted mice were recorded. Following optogenetic inhibition of GPe PV neurons, the majority of responsive STN neurons recorded from the GPe PV neuron-innervated sector of the STN were disinhibited (82%, n = 36 of 44). Fewer were inhibited (18%, n = 8 of 44). During inhibition of GPe PV neurons, both the rate and regularity of firing of disinhibited STN neurons increased significantly (**Fig. 2**; vehicle SWA: laser off = 10.5, 4.9-17.3 Hz; laser on = 23.7, 14.6-28.1 Hz; n = 36; $p < 0.0001$; WSR; laser off CV = 1.13, 0.84-1.66; laser on CV = 0.73, 0.55-0.88; n = 36; $p < 0.0001$; WSR). However, inhibition of GPe PV neurons did not

significantly reduce the proportion of STN neurons phase-locked to the active component of SWA (**Fig. 2**; vehicle: laser off = 38.9%, n = 14 of 36; laser on = 22.2%, n = 8 of 36; p = 0.3316; F test) and had no effect on their mean phase preference (**Fig. 2**; n = 36; p > 0.05; K test).

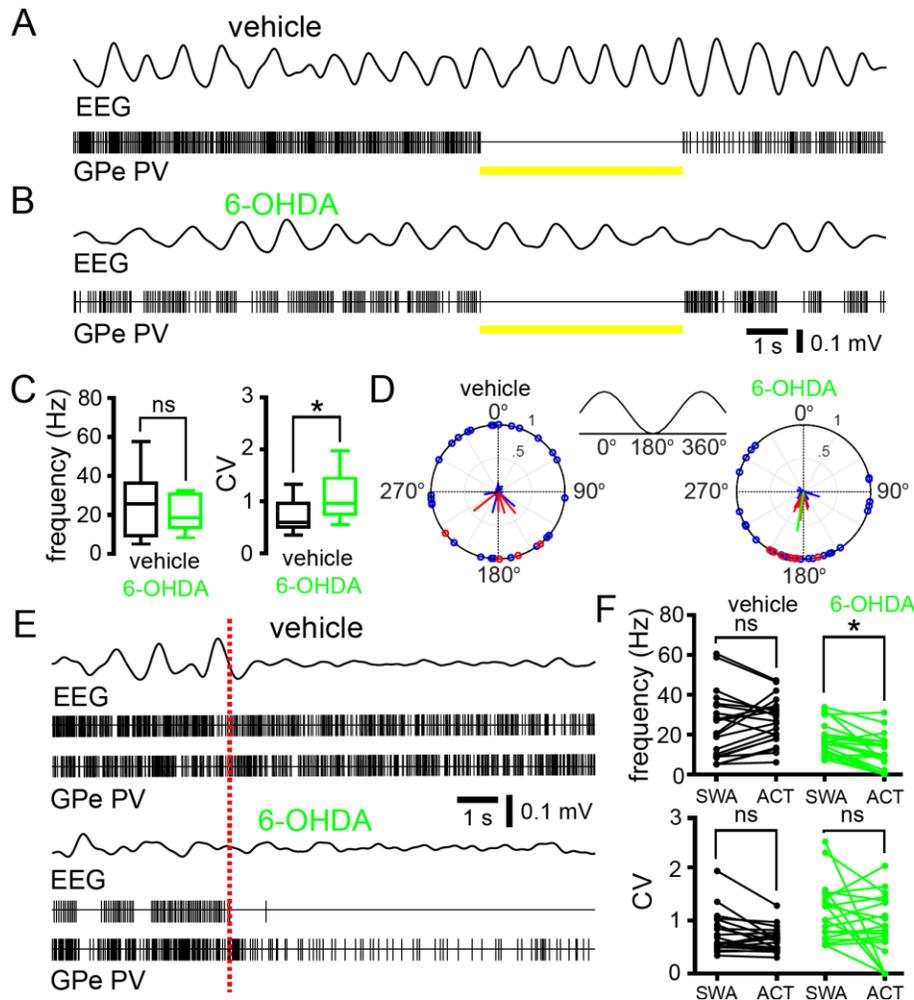


Figure 1. The pattern of prototypic GPe PV neuron activity *in vivo* was altered by dopamine depletion

(A, B) Examples of coincident 0.5-2.0 Hz band pass filtered EEG and GPe PV unit activity in vehicle- and 6-OHDA-treated mice. Each GPe neuron was identified as PV-expressing by its inhibitory response to activation of Arch-T (yellow line). The firing of GPe PV neurons in 6-OHDA-treated mice was more irregular and shifted to the inactive component of SWA compared to control both in the representative examples (A, B) and the sample populations (C, D), as evidenced by an increase in CV (C) and a shift in phase preference (D, polar plots: red/blue outer circles, phase-locked/non phase-locked neurons; red/blue lines, associated firing vectors; black/green lines, median population vectors for vehicle-/6-OHDA-treated mice). EEG phase is denoted in the inset. (E) Examples of coincident 0.5-2.0 Hz band pass filtered EEG and GPe PV single neuron activity in vehicle- and 6-OHDA-treated mice prior to and following tail pinch-evoked ACT

(dashed red line). Note that in 6-OHDA-treated mice the firing of GPe PV neurons during ACT decreased compared to firing during SWA in both the example (E) and sample population (F). *, $p < 0.05$.

As described above, in 6-OHDA-injected mice, GPe PV neurons discharged in a more phasic pattern, where firing was relatively phase-offset to the active component of SWA and therefore to STN activity. In dopamine-depleted mice, STN firing was similarly related to the active component of SWA, as evidenced by the proportion of phase-locked neurons (**Fig. 2**; vehicle = 38.9%, $n = 14$ of 36; 6-OHDA = 54.3%, $n = 25$ of 46; $p = 0.4357$; F test) and the mean phase preference of firing (**Fig. 2**; vehicle, $n = 36$; 6-OHDA, $n = 46$; $p > 0.05$; K test). During inhibition of GPe PV neurons, the majority of responsive STN neurons recorded from the GPe PV neuron-innervated sector of the STN were disinhibited (96%; $n = 46$ of 48) and fewer neurons were inhibited (4%, $n = 2$ of 46). During optogenetic inhibition of GPe PV neurons, both the firing rate and regularity of disinhibited STN neurons increased in dopamine-depleted mice (**Fig. 2**; 6-OHDA SWA: laser off = 12.4, 9.5-16.6 Hz; laser on = 25.1, 16.0-33.9 Hz; $n = 46$; $p < 0.0001$; WSR; laser off CV = 1.244, 0.98-1.75; laser on CV = 0.66, 0.56-0.87; $n = 46$; $p < 0.0001$; WSR). However, in contrast to vehicle-treated mice, optogenetic inhibition of GPe PV neurons in dopamine-depleted mice profoundly reduced the proportion of STN neurons phase-locked to SWA (**Fig. 2**; 6-OHDA: laser off = 54.3%, $n = 25$ of 46; laser on = 6.5%, $n = 3$ of 46; $p < 0.0002$; F test). However, the phase preference of STN activity was not altered by inhibition of GPe PV neurons in dopamine-depleted

mice (**Fig. 2**; laser off, $n = 46$; laser on, $n = 46$; $p > 0.05$; K test). The frequency and CV of STN activity in vehicle- and 6-OHDA-injected mice during SWA with or without GPe PV inhibition were also similar (**Fig. 2**; $p > 0.05$; MWU). Together, these findings suggest that during SWA GPe PV neurons similarly inhibit the level of STN activity in control and dopamine-depleted mice but are relatively critical for phase-locking of STN neurons to SWA following the loss of dopamine. The lack of response of a subset of STN neurons to GPe PV neuron silencing likely reflects failure to inhibit GPe neurons presynaptic to recorded STN neurons. Inhibition of STN neurons during GPe PV neuron silencing in a minority of STN neurons may reflect disinhibition of GPe-STN neurons due to inhibition of local inhibitory projections within the GPe. We next compared the effects of inhibiting GPe PV neurons on STN activity during ACT. The responses of the subset of STN neurons that were disinhibited by GPe PV inhibition during SWA were analyzed. As described above, GPe PV neurons in 6-OHDA-injected mice were strongly inhibited during ACT compared to neurons in control mice (**Figs. 1, 2**). During ACT, the activity of STN neurons in the GPe PV neuron-innervated sector of dopamine-depleted mice was profoundly elevated relative to STN activity in control mice (vehicle: laser off = 12.3, 8.55-22.6 Hz; $n = 16$; 6-OHDA: laser off = 21.6, 16.0-29.8 Hz; $n = 19$; $p < 0.005$; MWU), presumably due to reduced activity of GPe PV neurons. Optogenetic inhibition of GPe PV

neurons disinhibited STN activity in control and 6-OHDA-injected mice (**Fig. 2**; vehicle: laser on = 26.0, 17.2-34.9 Hz; n = 16; p = 0.001 relative to laser off; WSR; 6-OHDA: laser on = 27.2, 19.6-48.4 Hz; n = 19; p < 0.005 relative to laser off; WSR). During ACT and optogenetic inhibition of GPe PV neurons, the regularity of STN firing also increased significantly in both control and dopamine-depleted mice (**Fig. 2**; vehicle: laser off CV = 0.82, 0.63-0.95; laser on CV = 0.59, 0.53-0.74; n = 16; p < 0.05; WSR; 6-OHDA: laser off CV = 0.91, 0.72-1.03; 6-OHDA laser on CV = 0.70, 0.53-0.80; n = 19; p < 0.005; WSR). The frequency and pattern of STN activity during concurrent ACT and GPe PV neuron inhibition were however not significantly different in control and dopamine-depleted mice (**Fig. 2**; p = 0.1406; MWU; p = 0.8296; MWU, respectively). Together, these data suggest that the hyperactivity of STN neurons in dopamine-depleted mice during ACT is largely due to the reduced activity of presynaptic GPe PV neurons.

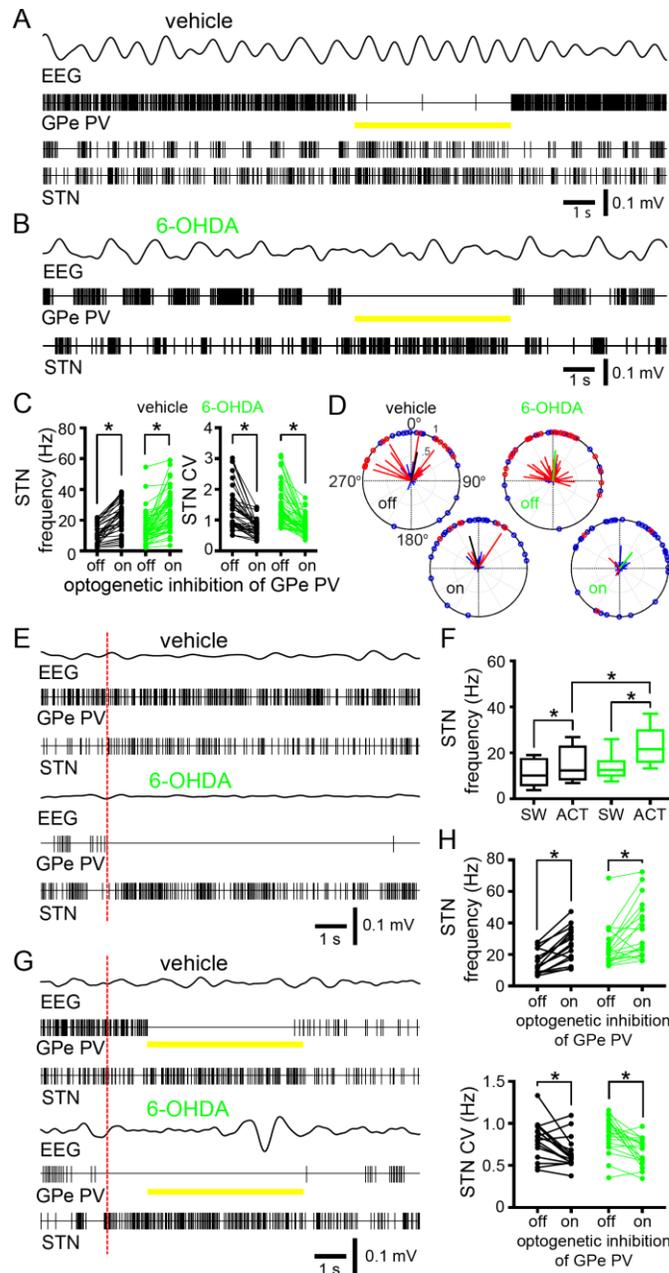


Figure 2. Impact of optogenetic silencing of GPe PV neurons on the STN in control and dopamine-depleted mice

filtered EEG, GPe PV and STN single neuron activity in vehicle- and 6-OHDA-treated mice, prior to and following tail pinch-evoked ACT (red dashed line). (E, F) The firing of STN neurons during ACT was significantly greater than during SWA in both vehicle- and 6-OHDA-treated mice (E, examples; F population data). (F) However, the firing of STN neurons during ACT was significantly greater in 6-OHDA-treated mice compared to vehicle-treated mice both in the example (E) and sample population. (E, G, H) Optogenetic inhibition (yellow line) of GPe PV neurons during ACT disinhibited STN

(A, B) Examples of coincident 0.5-2.0 Hz band pass filtered EEG and GPe PV and STN single neuron activity in vehicle- (A) and 6-OHDA-treated (B) mice. Each GPe neuron was identified as PV expressing by Arch-T-dependent inhibition (yellow), as described above. The firing of GPe PV neurons in 6-OHDA-treated mice was more irregular and shifted to the inactive component of SWA compared to control, also as described in Fig. 1. (A-C) Optogenetic inhibition (yellow line) of GPe PV neurons similarly disinhibited STN neurons in vehicle and control mice (A, B, examples; C, population data). (A, B, D) The firing of STN neurons in vehicle- and 6-OHDA-treated mice exhibited a similar preference for firing during the active component of the cortical EEG (A, B, examples; D, population data). However, the proportion of STN neurons exhibiting phase-locking to the EEG was significantly decreased by GPe PV neuron inhibition in 6-OHDA mice only. (E) Examples of coincident 0.5-2.0 Hz band pass

activity in both vehicle- and 6-OHDA-treated mice and eliminated the difference in firing frequency between vehicle- and 6-OHDA-treated mice in both the examples (E, G) and sample populations (H). *, $p < 0.05$.

The strength of cortico-STN transmission *ex vivo* is reduced following chronic dopamine depletion

Several studies suggest that following loss of dopamine, abnormally coherent and correlated activity in the cortex and STN may be due to strengthening of cortico-STN transmission. However, monosynaptic excitatory responses of the STN to cortical stimulation *in vivo* are reduced in 6-OHDA-treated rats versus control (Kita and Kita, 2011). Furthermore, a recent study in MPTP-treated primates provided evidence that following loss of dopamine 1) the number of cortico-STN inputs declines and 2) the proportion of basal ganglia output neurons responding to stimulation of the hyperdirect cortico-STN-GPi/SNr pathway diminishes (Mathai et al., 2015). To further examine the effect of dopamine depletion on cortico-STN transmission, we first compared the density of cortico-STN axon terminals through immunohistochemistry for the cortical axon terminal marker vGluT1. Application of the stereological dissector technique confirmed that the density of vGluT1-immunoreactive cortico-STN axon terminals was reduced by dopamine depletion (**Fig. 3**; vehicle: vGluT1 density = 19.2, 15.1-23.7 million/mm³; n = 8; 6-OHDA: vGluT1 density = 13.2, 8.8-14.7; n = 8; $p < 0.05$; MWU). However, the area of the STN per brain slice was not affected by dopamine depletion (0.24, 0.20-0.28 mm²; n = 8; 0.20, 0.17-0.24 mm²; n = 8; $p > 0.05$). Thus, following loss of dopamine,

the total number of vGluT1 expressing cortico-STN axon terminals decreased in a similar manner to that described in non-human primates (Mathai et al., 2015).

Next, ChR2(H134R)-eYFP was virally expressed in motor cortex through intracerebral injection in order to optogenetically stimulate and thus study cortico-STN transmission in *ex vivo* brain slices derived from vehicle- and 6-OHDA-depleted mice (TH vehicle = 6.6, 1.2-9.1%; n = 13; TH 6-OHDA = 98.0, 93.5-114.2%; n = 13; $p < 0.0001$; MWU), as described previously (Chu et al., 2015). STN neurons were first voltage clamped at -80 mV to isolate AMPA receptor (AMPA)- from NMDA receptor (NMDAR)-mediated transmission, which is negligible at this voltage. The relationship between the amplitude of cortico-STN transmission and optogenetic stimulation intensity was first assessed. The peak amplitude of the evoked cortico-STN EPSC was consistently lower in slices derived from dopamine-depleted mice (**Fig. 3**; e.g., at 40 % LED intensity: vehicle = 338.0, 251.6-498.6 pA; n = 18; 6-OHDA = 97.8 65.1-132.7 pA; n = 16; $p < 0.0001$; MWU). Because the paired-pulse ratio (PPR; EPSC2/EPSC1) was not significantly affected by dopamine depletion (e.g. PPR at 40% LED intensity: vehicle = 0.87, 0.77 to 1.02; n = 18; 6-OHDA = 0.89, 0.73 to 1.19; n = 16; $p > 0.05$; MWU), a reduction in the initial probability of transmission is unlikely to underlie the reduction in EPSC amplitude. Indeed, the amplitude of quantal cortico-

STN EPSCs, evoked in the presence of Sr^{2+} , was also slightly but significantly lower in slices derived from dopamine-depleted versus vehicle-injected mice (**Fig. 3**; vehicle = 12.6, 10.8- 19.6 pA; n = 24; 6-OHDA = 10.8, 9.7-12.0 pA; n = 19; p < 0.05; MWU). Although these data suggest that AMPAR-mediated cortico-STN transmission is diminished following loss of dopamine, increased cortico-STN patterning *in vivo* could be due to up-regulation of NMDAR-mediated transmission. Therefore, the ratio of AMPAR:NMDAR-mediated transmission was compared. Optogenetic stimulation was applied at holding voltages -80 mV and +40 mV in order to evoke large AMPAR- and NMDAR-EPSCs, respectively, in the same neurons. At +40 mV the EPSC was measured 50 ms after optogenetic stimulation to kinetically isolate the slow NMDAR-mediated EPSC from the more rapid AMPAR component, which had fully decayed at this time point. This approach revealed that the AMPAR:NMDAR ratio was in fact greater in 6-OHDA-treated mice, demonstrating that following loss of dopamine NMDAR-

mediated cortico-STN transmission was down-regulated to a greater extent than AMPAR-mediated cortico-STN transmission (**Fig. 3**; vehicle = 3.86, 3.07-5.25; n = 30; 6-OHDA = 4.75, 3.56-7.28; n = 31; p < 0.05; MWU). Together, these data are consistent with the conclusions that following the loss of dopamine: 1) the number of cortico-STN axon terminals decreased 2) the overall strength of AMPAR- and NMDAR-mediated cortico-STN transmission decreased 3) the initial probability of cortico-STN transmission was not altered 4) the amplitude of AMPAR-mediated quantal cortico-STN transmission decreased. Thus, abnormal STN activity *in vivo* in experimental and idiopathic PD cannot be due to up-regulation of cortico-STN transmission or an increase in NMDAR- versus AMPAR-mediated cortico-STN transmission. Indeed, following loss of dopamine, increased cortico-STN patterning appears to be opposed by homeostatic compensatory loss of cortico-STN synapses similar to that reported for cortical inputs to D2-SPNs (Day et al., 2006).

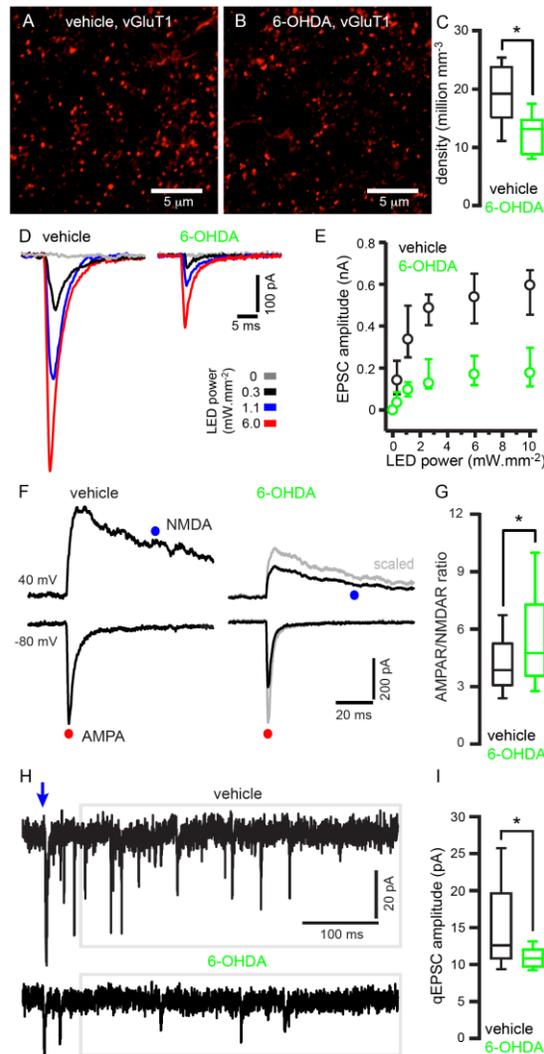


Figure 3. Increased cortical patterning of the parkinsonian STN is not due to an increase in the strength of the cortico-STN pathway

(A, B) Confocal micrographs of vGluT1 immunoreactivity in the STN of vehicle- and 6-OHDA-treated mice. The density of vGluT1-immunoreactive structures was significantly lower in dopamine-depleted mice relative to control in both the examples (A, B) and sample populations (C). (D, E) The amplitude of optogenetically stimulated cortico-STN transmission was significantly lower in STN neurons derived from 6-OHDA- versus vehicle-treated mice (D, examples; E, population data). (F, G) The AMPAR:NMDAR ratio was significantly greater in STN neurons derived from 6-OHDA- versus vehicle-treated mice (F, examples; G, population data). (H, I) The amplitude of quantal cortico-STN transmission evoked in the presence of Sr²⁺ was significantly greater in STN neurons derived from 6-OHDA- versus vehicle-treated mice (H, examples; I, population data). *, $p < 0.05$.

Impact of silencing STN activity on GPe neuron activity

To determine how the STN patterns the activity of prototypic GPe neurons, we recorded the responses of GPe neurons to optogenetic inhibition of STN neurons in vehicle- and 6-OHDA-injected mice during SWA and ACT. ArchT-eGFP was virally expressed in STN neurons through stereotaxic injection of an AAV vector whose expression was regulated by the endogenous synapsin promoter (Fig. 4). The projection of the ArchT-eGFP expressing STN neurons to the GPe was strongly labeled. Although

ArchT-eGFP expression was sometimes not completely confined to the STN, optogenetic inhibition was delivered to the STN, as verified by histological analysis of optrode placement. Because the identities of GPe neurons were unknown in these experiments, we restricted our recordings to sectors of the GPe where GPe PV neurons were abundant and restricted our analysis to neurons with similar firing properties to prototypic neurons, recorded previously in this and other studies (Abdi et al., 2015; Dodson et al., 2015; Mallet et al., 2012). This was particularly straightforward in dopamine-depleted

mice due to the distinct activities of prototypical and arky pallidal neurons during SWA and their distinct responses to ACT. In the majority of responsive GPe neurons recorded both in vehicle- and 6-OHDA-injected mice during SWA (vehicle: 75%, n = 12 of 16; 6-OHDA: 62%, n = 13 of 21) optogenetic inhibition of the STN modestly reduced neuronal activity (**Fig. 4**; vehicle: laser off = 20.8, 17.7-25.8 Hz; laser on = 18.2, 13.3-22.0 Hz; n = 12; p < 0.005; WSR; 6-OHDA: laser off = 25.4, 19.9-34.2 Hz; laser on = 16.8, 9.9-26.0 Hz; n = 13; p < 0.0005; WSR). Optogenetic inhibition of the STN also accentuated firing pauses during the active component of SWA in putative prototypic GPe neurons in 6-OHDA-injected mice and thus increased the CV of firing (**Fig. 4**; vehicle: laser off CV = 0.46, 0.36-0.60; laser on CV = 0.43, 0.34-0.80; n = 12; p > 0.05; WSR; 6-OHDA: laser off CV = 1.517, 1.131-1.911; laser on CV = 1.824, 1.524-2.573; n = 13; p < 0.005; WSR) and increased their preference for firing during the inactive component of SWA (**Fig. 4**; p < 0.01; K test). In contrast, optogenetic inhibition of the STN had no effect on CV (**Fig. 4**; vehicle: laser off CV = 0.46, 0.36-0.60; laser on CV = 0.43, 0.34-0.80; n = 12; p > 0.05; WSR) or phase preference (p > 0.05; K test) of GPe neurons in vehicle-injected mice.

During ACT, optogenetic inhibition of the STN decreased neuronal activity of GPe neurons in 6-OHDA-injected mice only (**Fig. 4**; vehicle: laser off = 30.4, 22.6-35.2 Hz; laser on = 33.4, 25.5-37.8 Hz; n = 9; p > 0.05; WSR; vehicle: laser off CV = 0.41, 0.28-0.50; laser on CV = 0.39, 0.26-0.62; n = 9; p > 0.05; WSR; 6-OHDA: laser off = 13.7, 8.9-16.7 Hz; laser on =

3.3, 0.4-7.7 Hz; n = 12; p < 0.001; WSR; 6-OHDA: laser off CV = 0.84, 0.77-1.10; laser on CV = 0.83, 0.17-1.18; n = 12; p > 0.05; WSR). Together these data suggest that synaptic excitation arising from the STN contributes to the firing of prototypic GPe neurons *in vivo* in control and dopamine-depleted mice during SWA. However, during ACT synaptic excitation from the STN only contributed significantly to GPe activity in dopamine-depleted mice. Interestingly, STN inhibition exacerbated abnormal phasic GPe activity during SWA and hypoactivity during ACT implying that the STN is not responsible for abnormal GPe activity, as was previously suggested (Plenz and Kitai, 1999).

The autonomous firing of GPe-PV neurons is significantly elevated following loss of dopamine

To determine whether loss of autonomous GPe PV neuron activity contributes to their abnormal activity in dopamine-depleted mice during SWA and ACT, as was previously suggested (Chan et al., 2011), the autonomous firing of GPe PV neurons was compared in *ex vivo* brain slices derived from vehicle- and 6-OHDA-injected mice. In order to target GPe PV neurons for cell-attached patch clamp recording *ex vivo*, mice were derived from a cross of Ai9 mice in which a loxP-flanked STOP cassette prevents transcription of the downstream tdTomato and PV cre mice. The selective expression of tdTomato in GPe PV neurons was first verified using immunohistochemistry for PV. 73.2% (66.1-77.9%; n = 3) of neurons expressed both tdTomato and

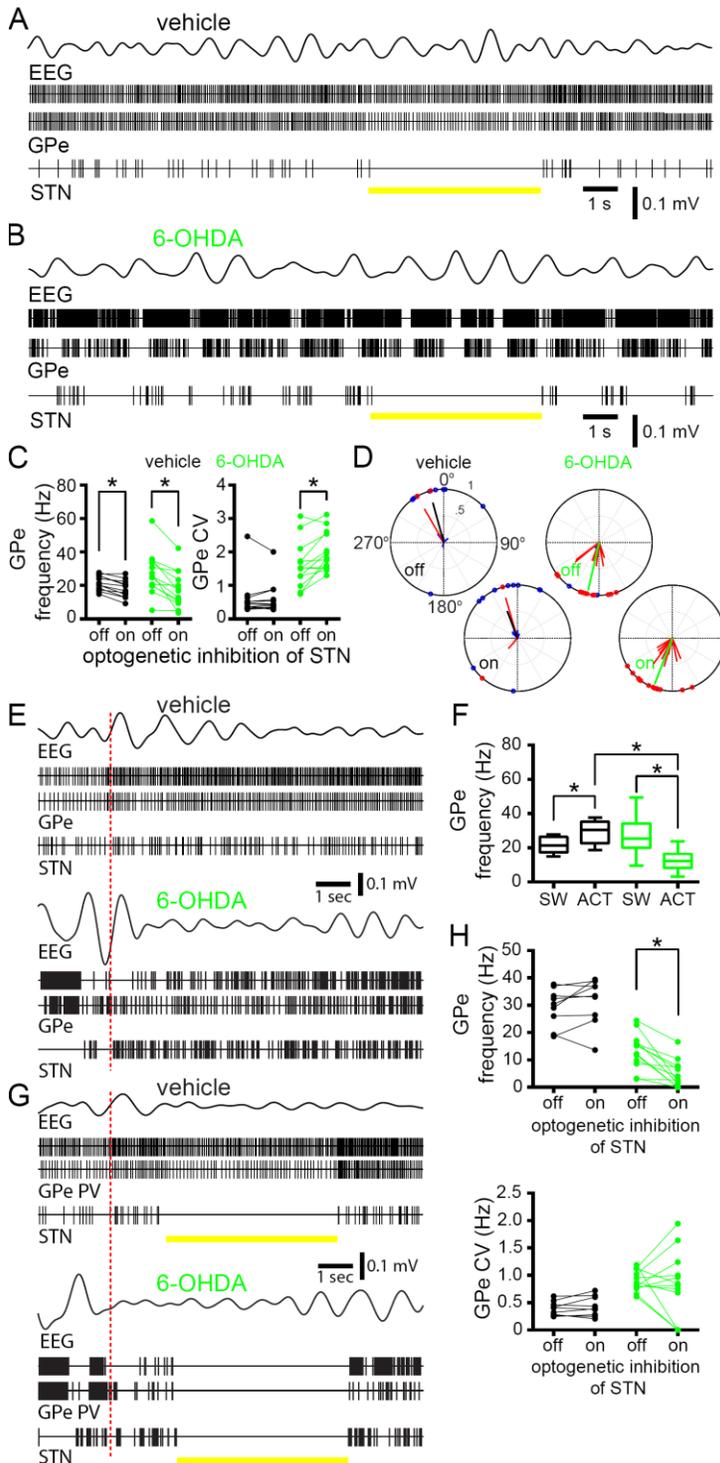


Figure 4. Impact of silencing STN activity on GPe neuron activity

(A-C) Optogenetic inhibition (yellow line) of STN neurons moderately, but significantly, reduced the rate of GPe neuron activity in both vehicle- and 6-OHDA-injected animals during SWA (A, B, examples; C, population data). Optogenetic inhibition of the STN also accentuated firing pauses during the active component of SWA in GPe neurons from 6-OHDA-treated mice, as evidenced by an increase in the CV of firing (B, C) and an increased preference for firing during the inactive component of SWA (B, D). (E, F) The firing of putative prototypic GPe neurons increased and decreased during tail pinch-evoked (red dashed line) ACT in vehicle- and 6-OHDA-injected mice, respectively. (E, examples; F, population data). (G, H) Optogenetic inhibition (yellow lines) of STN neurons during ACT significantly decreased firing GPe neurons in 6-OHDA-treated mice. (G) Representative examples of GPe and STN neuron activity during ACT prior to and during optogenetic inhibition of STN neurons. These

traces can also be compared with their respective traces in E, where optogenetic inhibition of the STN was not applied. (H) Population data. *, $p < 0.05$.

PV. Only 8.9% (4.1-14.2%; $n = 3$) of tdTomato neurons were not immunoreactive for PV, most likely due to $<100\%$ efficiency of immunodetection and 18.1% (18.0-19.8%, $n = 3$) of PV neurons did not express tdTomato, presumably due to $<100\%$ efficiency of cre-mediated excision of the loxP-flanked STOP cassette (**Fig. 5**). Less than 1% of PV or tdTomato expressing GPe neurons expressed the arkypallidal neuron marker Fox P2 (**Fig. S?**). Together, these data suggest that tdTomato expression is a reliable marker of prototypic GPe PV neurons in this mouse line. Cell-attached current clamp recordings of GPe tdTomato neurons in *ex vivo* brain slices were conducted in the presence of AMPAR, NMDAR, GABA_AR and GABA_BR antagonists in order to measure their autonomous activity. As described previously, GPe PV neurons discharged regularly and at high frequency in brain slices derived from dopamine intact mice (vehicle: frequency = 35.1, 26.8-44.0 Hz; CV = 0.13, 0.10-0.23; $n = 89$) (Abdi et al., 2015; Hernández et al., 2015; Mastro et al., 2014). Not only was the autonomous firing of GPe PV neurons preserved in slices derived from 6-OHDA-injected mice, firing was significantly elevated compared to firing in GPe PV neurons from vehicle-injected mice (6-OHDA: frequency = 41.7, 34.0-50.2 Hz; CV = 0.12, 0.08-0.20; $n = 98$; frequency, $p < 0.001$; CV, $p > 0.05$; WSR). Together these data indicate that the low frequency and abnormal pattern of GPe PV neuron firing in dopamine-depleted mice *in vivo* cannot be due to

loss of autonomous firing. In fact, autonomous firing was significantly up-regulated in GPe PV neurons following loss of dopamine, presumably through engagement of homeostatic mechanisms that are triggered by their overall reduction in firing *in vivo*.

Inhibition of hyperactive D2-SPNs normalizes GPe activity in 6-OHDA mice

Together these data suggest that following the loss of dopamine the increased patterning of prototypic GPe PV neurons during SWA, the hypoactivity of prototypic GPe PV neurons during SWA and ACT and the hyperactivity of STN neurons during ACT do not result from an increase in the strength of cortico-STN transmission nor the loss of autonomous GPe PV neuron activity. Indeed, STN and GPe PV neurons exhibit plasticities, which appear to oppose abnormal activity. In addition, synaptic excitation arising from the STN partially counteracted the abnormal frequency and pattern of prototypic GPe PV neuron activity rather than drove it. The other major afferent of the STN-GPe network emanates from GABAergic striatal D2-SPNs and is directed towards the GPe. In order to monitor and manipulate the activity of D2-SPNs, ArchT-eGFP was virally expressed through injection of a cre-dependent AAV vector into the striatum of mice expressing cre-recombinase under the control of the adenosine 2A receptor (A2A) promoter

(Fig. 6). The specificity of ArchT-eGFP expression in D2-SPNs was evidenced by ArchT-eGFP expression in the subset of SPNs that projected to the GPe (Fig. 6).

Expression of ArchT-eGFP in the projections of D1-SPNs to the basal ganglia output nuclei was not

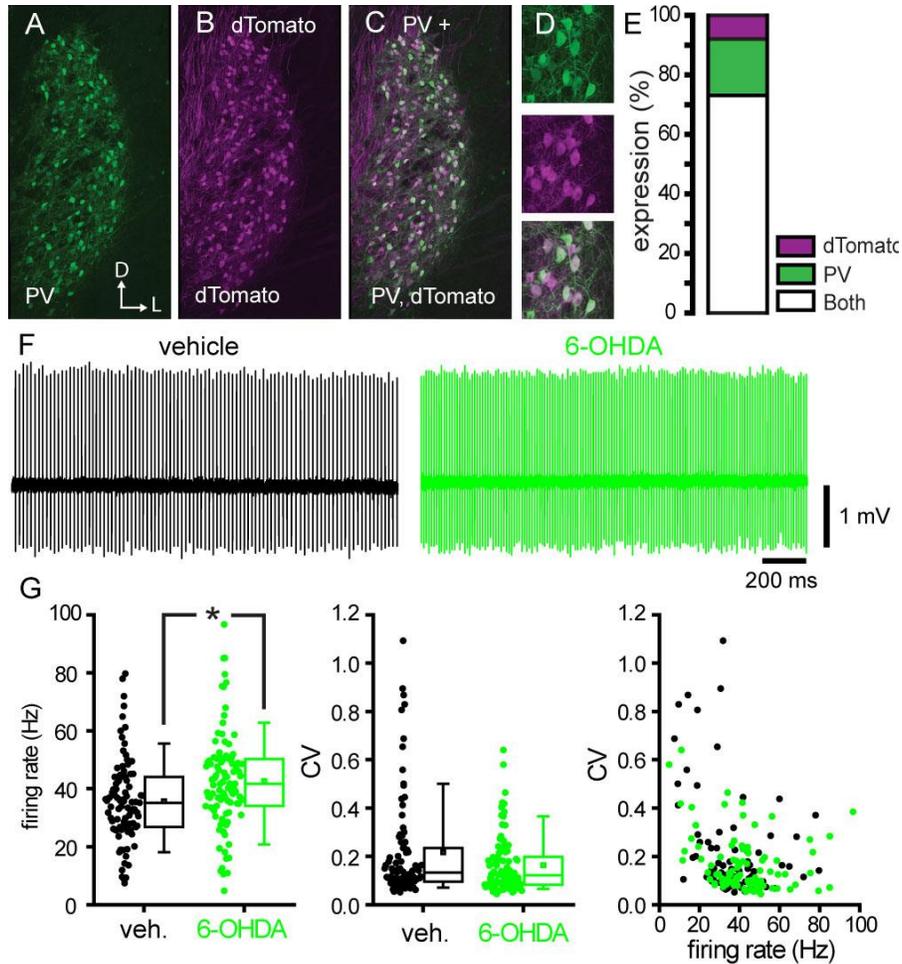


Figure 5. The autonomous activity of prototypic GPe PV neurons increases following loss of dopamine.

(A-E) In PV cre/Ai9 mice the majority of neurons expressing PV or dTomato expressed both PV and dTomato, as evidenced by representative confocal micrographs of PV and dTomato expression (A-D) and stereological analysis (E). (F-G) the autonomous activity of dTomato expressing GPe neurons was not disrupted in 6-OHDA injected mice versus vehicle-injected mice. Indeed, the frequency of autonomous firing was significantly elevated in dopamine-depleted mice compared to control mice. (F) Examples. (G) Population data. *, $p < 0.05$.

observed, verifying the selective expression of ArchT-eGFP in D2- and not D1-SPNs. Because dopamine negatively modulates the excitability of D2-SPNs, its loss is thought to underlie their increased responsiveness to cortical drive (Gerfen and Surmeier, 2011; Mallet et al., 2006; Tseng et al., 2001). We therefore compared the firing of ArchT-eGFP-expressing D2-SPNs in vehicle- and 6-OHDA-injected mice during SWA and ACT. Consistent with the negative modulation of D2-SPN excitability by dopamine, the frequency of D2-SPN activity was elevated in dopamine-depleted mice during SWA (**Fig. 6**; vehicle SWA: laser off = 2.1, 1.6-4.2 Hz; n = 46; 6-OHDA SWA: laser off = 5.4, 2.6- 9.3 Hz; n = 57; p < 0.0001; MW; vehicle SWA: laser off CV = 1.34, 1.04-1.76; n = 46; 6-OHDA SWA: laser off CV = 2.03, 1.57-2.41; n = 57; p = 0.0001; MWU) and ACT (vehicle ACT: laser off = 0, 0-1.25 Hz; n = 18; 6-OHDA ACT: laser off = 5.0, 0.9-15.5 Hz ; n = 21; p < 0.0003; MWU vehicle ACT: laser off CV = 0, 0-0.56; n = 18; 6-OHDA ACT: laser off CV = 0.95, 0.44-1.19; n = 21; p = 0.0039; MWU) relative to vehicle-injected mice.

The impact of ArchT-eGFP inhibition of D2-SPNs on GPe neurons in 6-OHDA-injected mice was then examined. GPe neurons that exhibited the firing patterns of prototypic GPe PV neurons recorded in this and other studies were targeted (Abdi et al., 2015; Mallet et al., 2012; Dodson et al., 2015). GPe neurons that responded to inhibition of D2-SPNs were rare (43%, n = 45 of 105), presumably due to the large size of the striatum relative to the small zone of optogenetic inhibition and also to the highly topographic nature of the striato-

pallidal projection. In the majority of responsive putative prototypic GPe PV neurons (91%, n = 41 of 45), D2-SPN inhibition led to elevated and more regular activity during SWA (**Fig. 6**; 6-OHDA: laser off = 24.0, 12.9-35.8 Hz; laser on = 27.8, 16.0-38.7 Hz; n = 41; p < 0.0001; WSR; 6-OHDA: laser off CV = 0.90, 0.74-1.03; laser on CV = 0.69, 0.48-0.83; n = 41; p < 0.0001; WSR). Furthermore, D2-SPN inhibition significantly reduced the proportion of GPe neurons whose firing was phase-locked to the inactive component of SWA (**Fig. 6**; 6-OHDA laser off: = 36.6%, n = 15 of 41; laser on = 9.8%, n = 4 of 41; p < 0.0390; F test) but had no effect on phase preference (**Fig. 6**; p > 0.05; K test). D2-SPN inhibition during ACT also elevated GPe activity (**Fig. 6**; 6-OHDA: laser off = 12.2, 5.1-25.3 Hz; laser on = 21.6, 17.0-34.5 Hz; n = 9; p = 0.0391; WSR; 6-OHDA: laser off CV = 0.71, 0.52-0.97; laser on CV = 0.65, 0.47, 0.83; n = 9; p = 0.3828; WSR). Thus, inhibition of D2-SPNs in dopamine-depleted mice reduced both the pauses in GPe activity during the active component of SWA and the inhibition of firing of GPe neurons that accompanied the transition to ACT. These data suggest that following loss of dopamine, increased inhibition of prototypic GPe neurons by D2-SPNs is the major factor underlying the abnormal frequency and pattern of GPe and therefore STN activity. Taken together our findings suggest that following loss of dopamine hyperactivity of D2-SPNs leads to excessive inhibition of prototypic GPe PV neurons, which leads to increased patterning of STN neurons by the indirect pathway. Furthermore, the cellular and synaptic plasticities associated with dopamine depletion that were identified in this and other studies appear to represent

homeostatic adaptations to this new regime of activity. Thus, excitatory cortical inputs and inhibitory interneuron inputs to D2-SPNs decrease and increase, respectively Day et al., 2006; Fiebinger et al., 2014; Gittis et al., 2011); the intrinsic excitability of D2 SPNs decreases;

inhibitory GPe inputs and cortical inputs to STN neurons increase and decrease, respectively (Chu et al., 2015; this study); autonomous STN activity decreases (Wilson et al., 2006; Zhu et al., 2002); and the autonomous activity of prototypic GPe PV neurons increases (this study).

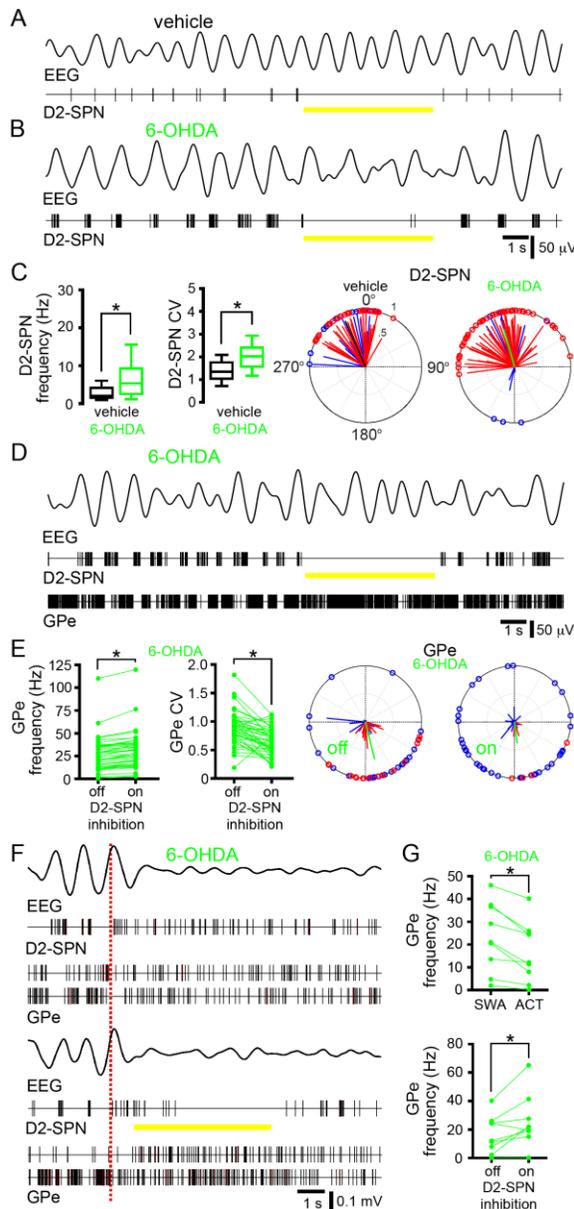


Figure 6. Inhibition of hyperactive D2-SPNs normalizes GPe activity in 6-OHDA mice

(A, B) Examples of coincident 0.5-2.0 Hz band pass filtered EEG and D2-SPN neuron activity in vehicle- (A) and 6-OHDA-treated (B) mice. Each D2-SPN neuron was identified as A2A expressing by Arch-T-dependent inhibition (yellow line). (C) Population data illustrating the frequency, CV and phase preference of D2-SPN activity in vehicle- and 6-OHDA-injected mice. (A-C) During SWA the frequency and CV of D2-SPN activity were significantly greater in 6-OHDA- versus vehicle-injected mice. (D, E) Optogenetic inhibition (yellow line) of D2-SPNs increased the firing rate, decreased the CV, and reduced the proportion of putative prototypic GPe neurons phase-locked to SWA in 6-OHDA-treated mice. (D) Representative example traces. (E) Population data illustrating the frequency, CV and phase preference of GPe activity before and during optogenetic inhibition of D2-SPNs. (F, G) In 6-OHDA-treated mice tail pinch-evoked ACT decreased putative

prototypical GPe neuron firing relative to firing Representative example traces. during SWA, as described above. Optogenetic (G) Population data. *, $p < 0.05$. inhibition of D2-SPNs during ACT (yellow line) significantly increased GPe neuron firing. (F)

DISCUSSION

Using optogenetic interrogation *in vivo* and *ex vivo*, we elucidated the contribution of specific cell classes and their synaptic connections to abnormal STN-GPe network activity that follows the loss of dopamine. The data demonstrate that hyperactivity of D2-SPNs generates excessive inhibition of prototypical GPe PV neurons, which leads to disinhibited cortical patterning of STN-GPe neurons, which is in turn transmitted to arthropallidal neurons. Furthermore, in contrast to earlier studies, we found that cortico-STN transmission and autonomous GPe PV neuron activity were down- and up-regulated, respectively, which is presumably a reflection of homeostatic mechanisms that are engaged by abnormal STN-GPe network activity.

Origins of abnormal STN-GPe network activity following the loss of dopamine

Prototypic GPe PV neuron silencing elevated and regularized STN activity both during SWA and ACT in dopamine-intact and -depleted mice. In control mice, the tonic, irregular activity of prototypic GPe PV neurons powerfully limited STN firing throughout the entire cycle of SWA and during ACT, consistent with hyperpolarizing and shunting inhibition mediated through activation of postsynaptic GABA_A and GABA_B receptors. In parkinsonian mice, GPe PV neuron silencing less effectively disinhibited STN activity, presumably

because GPe PV neuron activity was relatively phase-offset to STN activity during SWA and relatively diminished during ACT. During GPe PV neuron silencing, STN activity (presumably autonomous in nature) increased during the inactive component of SWA due to disinhibition. Conversely, SWA-associated STN firing decreased slightly during silencing. This latter observation implies that each bout of GABAergic inhibition deactivates STN Cav1/3 and Nav1 channels increasing their availability for synaptic integration and firing during the active component of SWA. Thus, the net effect of silencing GPe PV neurons in parkinsonian mice was that STN activity became less correlated with SWA.

Strengthening of cortico-STN transmission has been postulated to underlie the increased cortical patterning of the STN in parkinsonism. Indeed, driving cortico-STN transmission and patterning *ex vivo* leads to NMDAR-dependent LTP of cortico-STN inputs. However, we report here that cortico-STN transmission was in fact strongly down-regulated following loss of dopamine. Thus, the density/number of vGluT1-immunoreactive cortico-STN axon terminals was markedly reduced in 6-OHDA- versus vehicle-injected mice, consistent with a recent study in MPTP-treated non-human primates. We also report that AMPAR-mediated cortico-STN transmission was consistently reduced across a range of optogenetic stimulation intensities *ex vivo* and that NMDAR-mediated transmission was even more

strongly down-regulated than AMPAR-mediated transmission, as evidenced by an increase in AMPAR:NMDAR ratio. The reduction in cortico-STN transmission was not due to a decrease in the probability of transmission because PPR was unaffected. Finally, quantal cortico-STN transmission *ex vivo* was also modestly but significantly reduced following dopamine depletion. Together these data suggest that following loss of dopamine, the strength of cortico-STN transmission was reduced through loss of cortico-STN connections, together with weakening of the remaining connections. Thus, in the absence of dopamine, it's the abnormal frequency and pattern of prototypic GPe PV neuron activity rather than an increase in the strength of cortico-STN transmission that underlies the more powerful patterning of the STN by cortex.

Silencing STN activity reduced the activity of putative prototypic GPe neurons both during SWA and ACT in dopamine-intact and dopamine-depleted mice, consistent with the view that prototypic GPe PV neurons and STN neurons are indeed reciprocally connected. In dopamine-depleted mice STN silencing accentuated the inhibition of prototypic GPe PV neurons during the active component of SWA and during ACT, implying that STN excitation is largely overwhelmed by inhibitory influences. The loss of autonomous GPe activity has been proposed to contribute to the relatively diminished and phasic activity of prototypic GPe neurons following dopamine depletion. However, the firing of GPe PV neurons is generally phase-offset to STN activity during SWA, implying that it is driven by another excitatory afferent and/or is autonomous in nature. Indeed, a more recent study suggested that following dopamine depletion autonomous

activity was disrupted in arkypallidal neurons but not in prototypic GPe PV neurons. In this study, a more extensive sample of GPe PV neuron activity revealed that autonomous firing was not only maintained, it was in fact significantly up-regulated by approximately 20%, following the loss of dopamine. This data is also consistent with the study of Miguelez and colleagues who reported up-regulated firing in unspecified GPe neurons in 6-OHDA treated mice. Together, these data demonstrate that in parkinsonian mice, the increased inhibition of prototypic GPe PV neurons during the active component of SWA and during ACT does not arise from the loss of autonomous activity. Therefore, another possibility is that increased striato-pallidal inhibition underlies the abnormal activity of prototypic GPe PV neurons. In order to test this hypothesis the response of putative prototypic GPe PV neurons to optogenetic inhibition of D2-SPNs was studied. As predicted, the rate and regularity of firing of putative prototypic GPe neurons during SWA and ACT robustly increased following inhibition of D2-SPNs. Furthermore, comparison of D2-SPN firing in vehicle- and 6-OHDA injected mice confirmed that firing was profoundly elevated both during the active component of SWA and during ACT. These data therefore suggest that loss of inhibitory D2-like receptor modulation of D2-SPNs leads to disinhibited cortical patterning of D2-SPNs, which is in turn transmitted to prototypic GPe neurons and perturbs their firing. These data are consistent with studies that showed in dopamine-depleted rodents that putative striato-pallidal neurons are relatively depolarized during SWA and that GPe neuron activity that is anti-phasic to (the active component of) SWA was reduced

by intrastriatal injection of muscimol and dopamine receptor antagonism.

Following loss of dopamine, arky pallidal GPe neurons can be readily distinguished from prototypic GPe PV neurons by their activity pattern during SWA, which is in phase with cortical and STN activity and by their response to ACT, which is a robust elevation of firing. It has therefore been proposed that their connectivity is distinct from prototypic GPe PV neurons. Indeed, we found that 1) optogenetic inhibition of GPe PV neurons led to an increase in the firing of putative arky pallidal neurons, consistent with the silencing of the local inhibitory connections of GPe PV neurons and/or synaptic excitation emanating from the disinhibited STN; 2) optogenetic inhibition of STN neurons led to a marked reduction in the firing of putative arky pallidal neurons, consistent with the inhibition of strong direct excitation from the STN. Because STN silencing generally reduced the firing of prototypic GPe PV neurons, this should have disinhibited arky pallidal neurons if local inhibitory inputs were dominant over synaptic excitation from the STN; 3) optogenetic inhibition of D2 SPNs had a relatively minor effect on putative arky pallidal neurons that neighbored responsive prototypic GPe neurons either during SWA or ACT, consistent with the conclusion that arky pallidal neurons are less strongly inhibited by D2-SPNs than prototypic GPe neurons. Together, these data suggest that the abnormal firing of arky pallidal neurons in experimental PD is triggered by D2-SPNs, which inhibit GPe PV neurons to a greater extent than arky pallidal neurons, leading to disinhibited cortical patterning of the STN and feed-forward excitation of arky pallidal neurons.

Functional considerations

Together with other studies, the data presented here suggest that parkinsonian STN-GPe network activity is due in large measure to the hyperactivity of D2-SPNs in response to cortical excitation and their relatively strong patterning of prototypical GPe neurons. As a result, following cortical activity feed-forward excitation of prototypic GPe neurons by STN neurons and feedback inhibition of STN by prototypic GPe neurons is replaced by stronger D2-SPN-mediated inhibition of GPe neurons and therefore disinhibited cortical patterning of the STN. As suggested above the anti-phasic activity of prototypical GPe neurons and STN neurons may amplify the response of STN neurons to rhythmic cortical inputs by increasing the availability of Ca_v and Na_v channels at the onset of cortico-STN excitation. In the anesthetized state and deep sleep approximately 1 Hz cortical SWA is the dominant cortical oscillation, which then more effectively patterns the dopamine-depleted basal ganglia, including the STN-GPe network. During wakefulness, 8-30 Hz rhythmic activity is abnormally prevalent and persistent in PD and its experimental models. Furthermore, this activity pattern is tightly correlated with motor dysfunction, particularly in the motor territory of the STN. It is therefore tempting to speculate a similar shift in the balance striatal inhibition and STN excitation of prototypic GPe neurons is responsible for the abnormally, strongly patterned STN-GPe network activity under these conditions. Indeed, blockade of STN or GPe glutamate receptors or pharmacological silencing of the GPe reduces abnormal rhythmic activity, suggesting that cortico-STN excitation and anti-phasic STN neuron and prototypic GPe neuron activity are essential

elements of abnormal STN-GPe network activity.

In summary our data reconcile the classic direct and indirect pathway model with the newer pattern model of basal ganglia dysfunction. Thus hyperactivity of D2-SPNs not only leads to hypoactivity of prototypic GPe neurons and hyperactivity of STN neurons, it also promotes cortical patterning of the STN. This activity pattern

is then transmitted the basal ganglia output neurons by the antiphasic activity of the STN and GPe and to the striatum via arkypallidal GPe neurons thus compromising not only the output signal of the basal ganglia but also information processing within the striatum.

REFERENCES

- Abdi, A., Mallet, N., Mohamed, F.Y., Sharott, A., Dodson, P.D., Nakamura, K.C., Suri, S., Avery, S.V., Larvin, J.T., Garas, F.N., Garas, S.N., Vinciati, F., Morin, S., Bezard, E., Baufreton, J., Magill, P.J. (2015) Prototypic and arky pallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *J. Neurosci.* 35, 6667-88.
- Agnesi, F., Johnson, M.D., Vitek, J.L. (2013) Deep brain stimulation: how does it work? *Handb. Clin. Neurol.* 116, 39-54.
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366-75.
- Arkadir D, Morris G, Vaadia E, Bergman H (2004) Independent coding of movement direction and reward prediction by single pallidal neurons. *J Neurosci* 24, 10047-56.
- Aron, A.R., Poldrack, R.A. (2006) Cortical and subcortical contributions to Stop signal response inhibition: role of the subthalamic nucleus. *J. Neurosci.* 26, 2424-33.
- Atherton, J.F., Kitano, K., Baufreton, J., Fan, K., Wokosin, D., Tkatch, T., Shigemoto, R., Surmeier, D.J., Bevan, M.D. (2010) Selective participation of somatodendritic HCN channels in inhibitory but not excitatory synaptic integration in neurons of the subthalamic nucleus. *J. Neurosci.* 30, 16025-40.
- Atherton, J.F., Menard, A., Urbain, N., Bevan, M.D. (2013) Short-term depression of external globus pallidus-subthalamic nucleus synaptic transmission and implications for patterning subthalamic activity. *J. Neurosci.* 33, 7130-44.
- Baufreton, J., Atherton, J.F., Surmeier, D.J., Bevan, M.D. (2005) Enhancement of excitatory synaptic integration by GABAergic inhibition in the subthalamic nucleus. *J. Neurosci.* 25, 8505-17.
- Baufreton J, Bevan MD (2008) D2-like dopamine receptor-mediated modulation of activity-dependent plasticity at GABAergic synapses in the subthalamic nucleus. *J Physiol* 586:2121-42.
- Baufreton J, Kirkham E, Atherton JF, Menard A, Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2009) Sparse but selective and potent synaptic transmission from the globus pallidus to the subthalamic nucleus. *J. Neurophysiol.* 102:532-45.
- 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. *J. Neurosci.* 15, 6531-41.
- Benabid, A.L., Chabardes, S., Mitrofanis, J., Pollak, P. (2009) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 8, 67-81.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-8.
- Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B., DeLong, M.R. (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of

- parkinsonism. *J Neurophysiol* 72, 507-20.
- Bevan MD, Bolam JP (1995) Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 15:7105-20.
- Bevan MD, Booth PA, Eaton SA, Bolam JP (1998) Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *J Neurosci* 18:9438-52.
- Bevan MD, Clarke NP, Bolam JP (1997) Synaptic integration of functionally diverse pallidal information in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 17:308-24.
- Bevan MD, Bolam JP, Crossman AR (1994a) Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 6:320-34.
- Bevan MD, Crossman AR, Bolam JP (1994b) Neurons projecting from the entopeduncular nucleus to the thalamus receive convergent synaptic inputs from the subthalamic nucleus and the neostriatum in the rat. *Brain Res* 659:99-109.
- Bevan MD, Francis CM, Bolam JP (1995) The glutamate-enriched cortical and thalamic input to neurons in the subthalamic nucleus of the rat: convergence with GABA-positive terminals. *J Comp Neurol* 361:491-511.
- Bevan MD, Magill PJ, Hallworth NE, Bolam JP, Wilson CJ (2002) Regulation of the timing and pattern of action potential generation in rat subthalamic neurons in vitro by GABA-A IPSPs. *J Neurophysiol* 87:1348-62.
- 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. *J Neurophysiol* 83:3169-72.
- Bevan MD, Wilson CJ (1999) Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci* 19:7617-28.
- Beurrier C, Bioulac B, Hammond C (2000) Slowly inactivating sodium current (I(NaP)) underlies single-spike activity in rat subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 83:1951-7.
- Bruce CJ, Goldberg ME (1985) Primate frontal eye field. I. Single neurons discharging before saccades. *J Neurophysiol* 53:603-635.
- Brown P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Tonali P, Di Lazzaro V (2001) Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci*. 21, 1033-8.
- Castrioto A, Lhomme E, Moro E, Krack P (2014) Mood and behavioural effects of subthalamic stimulation in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 13:287-305.
- Chan CS, Shigemoto R, Mercer JN, Surmeier DJ (2004) HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *J Neurosci* 24:9921-32.
- Chang, H.T., Wilson, C.J., Kitai, S.T. (1981) Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Science* 213, 915-8.
- Chetrit J, Taupignon A, Froux L, Morin S, Bouali-Benazzouz R, Naudet F, Kadir 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. *J Neurosci* 33:14840-9.
- Clarke NP, Bevan MD, Cozzari C, Hartman BK, Bolam JP (1997) Glutamate-enriched cholinergic synaptic terminals in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus of the rat. *Neuroscience* 81:371-85.
- Chan, C.S., Glajch, K.E., Gertler, T.S., Guzman, J.N., Mercer, J.N., Lewis, A.S., Goldberg, A.B., Tkatch, T., Shigemoto, R., Fleming, S.M., Chetkovich, D.M., Osten, P., Kita, H., Surmeier, D.J. (2011) HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 14, 85-92.
- Chang HT, Kita H, Kitai ST (1983) The fine structure of the rat subthalamic nucleus: an electron microscopic study. *J Comp Neurol* 221:113-23.
- Chu, H-Y, Atherton, J.F., Wokosin, D., Surmeier, D.J., Bevan, M.D. (2015) Heterosynaptic regulation of external globus pallidus inputs to the subthalamic nucleus by motor cortex. *Neuron* 85, 364-76.
- Coizet V, Graham JH, Moss J, Bolam JP, Savasta M, McHaffie JG, Redgrave P, Overton PG (2009) Short-latency visual input to the subthalamic nucleus is provided by the midbrain superior colliculus. *J Neurosci* 29: 5701-9.
- Cragg SJ, Baufreton J, Xue Y, Bolam JP, Bevan MD (2004) Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. *Eur J Neurosci* 20:1788-802.
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251-9.
- Degos, B., Deniau, J.M., Le Cam, J., Mailly, P., Maurice, N. (2008) Evidence for a direct subthalamo-cortical loop circuit in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2599-610.
- Degos, B., Deniau, J.M., Chavez, M., Maurice, N. (2009) Chronic but not acute dopaminergic transmission interruption promotes a progressive increase in cortical beta frequency synchronization: relationships to vigilance state and akinesia. *Cereb. Cortex* 19,1616-30.
- Deschênes M, Bourassa J, Doan VD, Parent A (1996) A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Eur J Neurosci* 8:329-43.
- Do MT, Bean BP (2003) Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation. *Neuron* 39:109-20.
- Dodson, P.D., Larvin, J.T., Duffell, J.M., Garas, F.N., Doig, N.M., Kessar, N., Duguid, I.C., Bogacz, R., Butt, S.J., Magill, P.J. (2015) Distinct developmental origins manifest in the specialized encoding of movement by adult neurons of the external globus pallidus. *Neuron* 86, 501-13.
- Dupuis JP, Feyder M, Miguelez C, Garcia L, Morin S, Choquet D, Hosy E, Bezard E, Fisone G, Bioulac BH, Baufreton J (2013) Dopamine-dependent long-term depression at subthalamo-nigral

- synapses is lost in experimental parkinsonism. *J Neurosci* 33:14331-41.
- Elias, S., Joshua, M., Goldberg, J.A., Heimer, G., Arkadir, D., Morris, G., Bergman, H (2007) Statistical properties of pauses of the high-frequency discharge neurons in the external segment of the globus pallidus. *J Neurosci.* 27: 2525-38.
- Eusebio, A., Cagnan, H., Brown, P. (2012) Does suppression of oscillatory synchronisation mediate some of the therapeutic effects of DBS in patients with Parkinson's disease? *Front. Integr. Neurosci.* 6, 47.
- Fan KY, Baufreton J, Surmeier DJ, Chan CS, Bevan MD (2012) Proliferation of external globus pallidus-subthalamic nucleus synapses following degeneration of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 32:13718-28.
- Farries MA, Kita H, Wilson CJ (2010) Dynamic spike threshold and zero membrane slope conductance shape the response of subthalamic neurons to cortical input. *J Neurosci* 30:13180-91.
- Farries MA, Wilson CJ (2012a) Phase response curves of subthalamic neurons measured with synaptic input and current injection. *J Neurophysiol* 108:1822-37.
- Farries MA, Wilson CJ (2012b) Biophysical basis of the phase response curve of subthalamic neurons with generalization to other cell types. *J Neurophysiol* 108:1838-55.
- Fieblinger, T., Graves, S.M., Sebel, L.E., Alcacer, C., Plotkin, J.L., Gertler, T.S., Chan, C.S., Heiman, M., Greengard, P., Cenci, M.A., Surmeier, D.J. (2014) Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Commun.* 5, 5316.
- Flores G, Hernandez S, Rosales MG, Sierra A, Martines-Fong D, Flores-Hernandez J, Aceves J (1996) M3 muscarinic receptors mediate cholinergic excitation of the spontaneous activity of subthalamic neurons in the rat. *Neurosci Lett* 203:203-6.
- François C, Savy C, Jan C, Tande D, Hirsch EC, Yelnik J (2000) Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients. *J Comp Neurol* 425:121-9.
- Fujimoto, K., Kita, H. (1993) Response characteristics of subthalamic neurons to the stimulation of the sensorimotor cortex in the rat. *Brain Res.* 609,185-92.
- 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. *J Neurophysiol* 112:467-79.
- Galvan, A., Wichmann, T. (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol.* 119, 1459-74.
- Gauthier J, Parent M, Lévesque M, Parent A (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834:228-32.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J. Jr, Sibley, D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429-32.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection

- systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441-66.
- Gittis, A.H., Hang, G.B., LaDow, E.S., Shoenfeld, L.R., Atallah, B.V., Finkbeiner, S., Kreitzer, A.C. (2011) Rapid target-specific remodeling of fast-spiking inhibitory circuits after loss of dopamine. *Neuron* 71, 858–68.
- Goldberg, J.A., Boraud, T., Maraton, S., Haber, S.N., Vaadia, E., Bergman, H. (2002) Enhanced synchrony among primary motor cortex neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 22, 4639-53.
- Groenewegen HJ, Berendse HW (1990) Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *J Comp Neurol* 294:607-22.
- Hallworth NE, Bevan MD (2005) Globus pallidus neurons dynamically regulate the activity pattern of subthalamic nucleus neurons through the frequency-dependent activation of postsynaptic GABAA and GABAB receptors. *J Neurosci* 25:6304-15.
- 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. *J Neurosci* 23:7525-42.
- Hamada I, DeLong MR (1992) Excitotoxic acid lesions of the primate subthalamic nucleus result in transient dyskinesias of the contralateral limbs. *J Neurophysiol* 68:1850-8.
- Hammond C, Yelnik J (1983) Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization. *Neuroscience* 8:781-90.
- Hashimoto T, Elder CM, Okun MS, Patrick SK, Vitek JL (2003) Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J Neurosci* 23:1916-23.
- Hammond, C., Bergman, H., Brown, P. (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci.* 30, 357-64.
- Han X, Chow BY, Zhou H, Klapoetke NC, Chuong A, Rajimehr R, Yang A, Baratta MV, Winkle J, Desimone R, Boyden ES (2011) A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 18.
- Hassani OK, François C, Yelnik J, Féger J (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 749:88-94.
- Heimer, G., Bar-Gad, I., Goldberg, J.A., Bergman, H. (2002) Dopamine replacement therapy reverses abnormal synchronization of pallidal neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of parkinsonism. *J. Neurosci.* 22, 7850-5.
- Hernández, V.M., Hegeman, D.J., Cui, Q., Kelper, D.A., Fiske, M.P., Glajch, K.E., Pitt, J.E., Huang, T.Y., Justice, N.J., Chan, C.S. (2015) Parvalbumin+ Neurons and Npas1+ neurons are distinct neuron classes in the mouse external globus pallidus. *J. Neurosci.* 35, 11830-47.

- Huerta MF, Kaas JH (1990) Supplementary eye field as defined by intracortical microstimulation: connections in macaques. *J Comp Neurol* 293: 299-330.
- Huerta MF, Krubitzer LA, Kaas JH (1986) Frontal eye field as defined by intracortical microstimulation in squirrel monkeys, owl monkeys, and macaque monkeys. I. Subcortical connections. *J Comp Neurol* 253:415-439.
- Hikosaka O, Sakamoto M, Usui S (1989) Functional properties of monkey caudate neurons. I. Activities related to saccadic eye movements. *J Neurophysiol* 61:780-798.
- Inase M, Tokuno H, Nambu A, Akazawa T, Takada M (1999) Corticostriatal and corticosubthalamic input zones from the presupplementary motor area in the macaque monkey: comparison with the input zones from the supplementary motor area. *Brain Res* 833:191-201.
- Indriati DW, Kamasawa N, Matsui K, Meredith AL, Watanabe M, Shigemoto R (2013) Quantitative localization of Cav2.1 (P/Q-type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: somatodendritic gradient and distinct somatic coclustering with calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* 33:3668-78.
- Isoda, M., Hikosaka, O. (2008) Role for subthalamic nucleus neurons in switching from automatic to controlled eye movement. *J Neurosci* 28, 7209-18.
- Jenkinson, N., Brown, P. (2011) New insights into the relationship between dopamine, beta oscillations and motor function. *Trends Neurosci* 34, 611-8.
- Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104:933-946.
- Kita H, Chang HT, Kitai ST (1983) The morphology of intracellularly labeled rat subthalamic neurons: a light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 215:245-57.
- Kita, T., Kita, H. (2011) Cholinergic and non-cholinergic mesopontine tegmental neurons projecting to the subthalamic nucleus in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 33, 433-43.
- 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. *J Neurosci* 32, 5990-9.
- Kita H, Kitai ST (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260:435-52.
- Kita T, Osten P, Kita H (2014) Rat subthalamic nucleus and zona incerta share extensively overlapped representations of cortical functional territories. *J Comp Neurol* 522:4043-56.
- Kita, H. (1992) Responses of globus pallidus neurons to cortical stimulation: intracellular study in the rat. *Brain Res.* 589, 84-90.
- Koshimizu Y, Fujiyama F, Nakamura KC, Furuta T, Kaneko T (2013) Quantitative analysis of axon bouton distribution of subthalamic nucleus neurons in the rat by single neuron visualization with a viral vector. *J Comp Neurol* 521:2125-46.

- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C. (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622-6.
- Kuwajima M, Hall RA, Aiba A, Smith Y (2004) Subcellular and subsynaptic localization of group I metabotropic glutamate receptors in the monkey subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 474:589-602.
- Lanciego JL, Gonzalo N, Castle M, Sanchez-Escobar C, Aymerich MS, Obeso JA (2004) Thalamic innervation of striatal and subthalamic neurons projecting to the rat entopeduncular nucleus. *Eur J Neurosci* 19:1267-77.
- Lardeux S, Pernaud R, Paleressompoulle D, Baunez C (2009) Beyond the reward pathway: coding reward magnitude and error in the rat subthalamic nucleus. *J Neurophysiol* 102:2526–2537.
- Lavoie B, Parent A (1990) Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 299:1-16.
- Lee MS, Marsden CD (1994) Movement disorders following lesions of the thalamus or subthalamic region. *Mov Disord* 9:493-507.
- Leventhal DK, Gage GJ, Schmidt R, Pettibone JR, Case AC, Berke JD (2012) Basal ganglia beta oscillations accompany cue utilization. *Neuron* 73:523-36.
- 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* 124:2105-18.
- Li S, Arbuthnott GW, Jutras MJ, Goldberg JA, Jaeger D (2007) Resonant antidromic cortical circuit activation as a consequence of high-frequency subthalamic deep-brain stimulation. *J Neurophysiol* 98:3525-37.
- 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* 76:1030-41.
- Loucif AJ, Woodhall GL, Shirlir 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, P.J., Bolam, J.P., Bevan, M.D. (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106, 313-30.
- Mallet, N., Pogosyan, A., Márton, L.F., Bolam, J.P., Brown, P., Magill, P.J. (2008a) Parkinsonian beta oscillations in the external globus pallidus and their relationship with subthalamic nucleus activity. *J Neurosci* 28, 14245-58.
- Mallet, N., Pogosyan, A., Sharott, A., Csicsvari, J., Bolam, J.P., Brown, P., Magill, P.J. (2008b) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci* 28, 4795-806.
- Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C., Gonon, F. (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26, 3875-84.

- Mallet, N., Micklem, B.R., Henny, P., Brown MT, Williams C, Bolam JP, Nakamura KC, Magill PJ (2012) Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* 74, 1075-86.
- Mastro, K.J., Bouchard, R.S., Holt, H.A., Gittis, A.H. (2014) Transgenic mouse lines subdivide external segment of the globus pallidus (GPe) neurons and reveal distinct GPe output pathways. *J. Neurosci.* 34, 2087-99.
- Matsumura M, Kojima J, Gardiner TW, Hikosaka O (1992) Visual and oculomotor functions of monkey subthalamic nucleus. *J Neurophysiol* 67:1615-32.
- Mathai, A., Ma, Y., Paré, J.F., Villalba, R.M., Wichmann, T., Smith, Y. (2015) Reduced cortical innervation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Brain* 138, 946-62.
- Maurice, N., Deniau, J.M., Glowinski, J., Thierry, A.M. (1998) Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the corticosubthalamic circuits. *J. Neurosci.* 18, 9539-46.
- Maurice, N., Deniau, J.M., Glowinski, J., Thierry, A.M. (1999) Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the cortico-nigral circuits. *J. Neurosci.* 19, 4674-81.
- McConnell GC1, So RQ, Hilliard JD, Lopomo P, Grill WM (2012) Effective deep brain stimulation suppresses low-frequency network oscillations in the basal ganglia by regularizing neural firing patterns. *J Neurosci* 32: 15657-68.
- 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. *J Physiol* 590: 5861-75.
- Mink, J.W., Thach, W.T. (1993) Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 950-7.
- Monakow KH, Akert K, Künzle H (1978) Projections of the precentral motor cortex and other cortical areas of the frontal lobe to the subthalamic nucleus in the monkey. *Exp Brain Res* 33:395-40.
- Moran, R.J., Mallet, N., Litvak, V., Dolan, R.J., Magill, P.J., Friston, K.J., Brown, P. (2011) Alterations in brain connectivity underlying beta oscillations in Parkinsonism. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002124.
- Mouroux M, Féger J (1993) Evidence that the parafascicular projection to the subthalamic nucleus is glutamatergic. *Neuroreport* 4:613-5.
- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1987) Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res* 437:45-55.
- 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. *J Neurosci* 16, 2671-83.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-

- subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res* 43:111-7.
- Nelson AB, Bussert TG, Kreitzer AC, Seal RP (2014) Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *J Neurosci* 34:8772-7.
- Nevado-Holgado AJ, Mallet N, Magill PJ, Bogacz R (2014) Effective connectivity of the subthalamic nucleus-globus pallidus network during Parkinsonian oscillations. *J Physiol* 592, 1429-55.
- Otsuka T, Murakami F, Song WJ (2001) Excitatory postsynaptic potentials trigger a plateau potential in rat subthalamic neurons at hyperpolarized states. *J Neurophysiol* 86:1816-25.
- Parent M, Wallman MJ, Descarries L (2010) Distribution and ultrastructural features of the serotonin innervation in rat and squirrel monkey subthalamic nucleus. *Eur J Neurosci* 31:1233-42.
- Pavlidis, A., Hogan, S.J., Bogacz, R. (2012) Improved conditions for the generation of beta oscillations in the subthalamic nucleus--globus pallidus network. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2229-39.
- Plenz D, Kitai ST (1999) A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400, 677-82.
- Quiroga-Varela, A., Walters, J.R., Brazhnik, E., Marin, C., Obeso, J.A. (2013) What basal ganglia changes underlie the parkinsonian state? The significance of neuronal oscillatory activity. *Neurobiol. Dis.* 58, 242-8.
- 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. *J Neurophysiol* 99:442-59.
- Reese NB, Garcia-Rill E, Skinner RD (1995) The pedunculo-pontine nucleus--auditory input, arousal and pathophysiology. *Prog Neurobiol* 47: 105-33.
- Rodriguez-Oroz MC, López-Azcárate J, Garcia-Garcia D, Alegre M, Toledo J, Valencia M, Guridi J, Artieda J, Obeso JA (2011) Involvement of the subthalamic nucleus in impulse control disorders associated with Parkinson's disease. *Brain* 134: 36-49.
- Rowan MJ, Tranquil E, Christie JM (2014) Distinct Kv channel subtypes contribute to differences in spike signaling properties in the axon initial segment and presynaptic boutons of cerebellar interneurons. *J Neurosci* 34:6611-23.
- Sanders, T.H., Clements, M.A., Wichmann, T. (2013) Parkinsonism-related features of neuronal discharge in primates. *J Neurophysiol* 110, 720-31.
- Sato F, Parent M, Levesque M, Parent A (2000) Axonal branching pattern of neurons of the subthalamic nucleus in primates. *J Comp Neurol* 424:142-52.
- Sadikot AF, Parent A, François C (1992) Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: a PHA-L study of subcortical projections. *J Comp Neurol* 315:137-59.
- Schlag J, Schlag-Rey M (1987) Evidence for a supplementary eye field. *J. Neurophysiol* 57:179-200.
- Schmidt, R., Leventhal, D.K., Mallet, N., Chen, F., Berke, J.D. (2013) Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nat. Neurosci.* 16, 1118-24.

- Sharott, A., Gulberti, A., Zittel, S., Tudor Jones, A.A., Fickel, U., Munchau, A., Koppen, J.A., Gerloff, G., Westphal, M., Buhmann, C., Hamel, W., Engel, A.K., Moll, C.K.E. (2014) Activity Parameters of Subthalamic Nucleus Neurons Selectively Predict Motor Symptom Severity in Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* *34*, 6273–6285.
- Shen KZ, Johnson SW (2000) Presynaptic dopamine D2 and muscarine M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *J Physiol* *525*:331-41.
- Shen KZ, Johnson SW (2006) Subthalamic stimulation evokes complex EPSCs in the rat substantia nigra pars reticulata in vitro. *J Physiol* *573*:697-709.
- Shen KZ, Johnson SW (2008) 5-HT inhibits synaptic transmission in rat subthalamic nucleus neurons in vitro. *Neuroscience* *151*:1029-33.
- Shen KZ, Kozell LB, Johnson SW (2007) Multiple conductances are modulated by 5-HT receptor subtypes in rat subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience* *148*:996-1003.
- Shink E, Bevan MD, Bolam JP, Smith Y (1996) The subthalamic nucleus and the external pallidum: two tightly interconnected structures that control the output of the basal ganglia in the monkey. *Neuroscience* *73*:335-57.
- Shimamoto, S.A., Ryapolova-Webb, E.S., Ostrem, J.L., Galifianakis, N.B., Miller K.J., Starr, P.A. (2013) Subthalamic nucleus neurons are synchronized to primary motor cortex local field potentials in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* *33*, 7220–7233.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* *86*, 353-87.
- Tachibana, Y., Kita, H., Chiken, S., Takada, M., Nambu, A. (2008) Motor cortical control of internal pallidal activity through glutamatergic and GABAergic inputs in awake monkeys. *Eur. J. Neurosci.* *27*, 238-53.
- Tachibana, Y., Iwamuro, H., Kita, H., Takada, M., Nambu, A. (2011) Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia. *Eur. J. Neurosci.* *34*, 1470-84.
- Tseng, K.Y., Kasanetz, F., Kargieman, L., Riquelme, L.A., Murer, M.G. (2001) Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. *J. Neurosci.* *21*, 6430-9.
- Urbain N, Gervasoni D, Soulière F, Lobo L, Rentéro N, Windels F, Astier B, Savasta M, Fort P, Renaud B, Luppi PH, Chouvet G (2000) Unrelated course of subthalamic nucleus and globus pallidus neuronal activities across vigilance states in the rat. *Eur J Neurosci* *12*:3361-74.
- Vila, M., Périer, C., Féger, J., Yelnik, J., Faucheux, B., Ruberg, M., Raisman-Vozari, R., Agid, Y., Hirsch, E.C. (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*, 337-44.
- Walters, J.R., Hu, D., Itoga, C.A., Parr-Brownlie, L.C., Bergstrom, D.A. (2007) Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations

- in basal ganglia output after loss of dopamine. *Neuroscience* 144, 762-76.
- Welter ML, Burbaud P, Fernandez-Vidal S, Bardinet E, Coste J, Piallat B, Borg M, Besnard S, Sauleau P, Devaux B, Pidoux B, Chaynes P, Tézenas du Montcel S, Bastian A, Langbour N, Teillant A, Haynes W, Yelnik J, Karachi C, Mallet L (2011) Basal ganglia dysfunction in OCD: subthalamic neuronal activity correlates with symptoms severity and predicts high-frequency stimulation efficacy. *Transl Psychiatry* 1:e5.
- Whitmer, D., de Solages, C., Hill, B., Yu, H., Henderson, J.M., Bronte-Stewart, H. (2012) High frequency deep brain stimulation attenuates subthalamic and cortical rhythms in Parkinson's disease. *Front. Hum. Neurosci.* 6, 155.
- Wichmann, T., Bergman, H., DeLong, M.R. (1994) The primate subthalamic nucleus. I. Functional properties in intact animals. *J. Neurophysiol.* 72, 494-506.
- Wilson CJ (2013) Active decorrelation in the basal ganglia. *Neuroscience* 250:467-82.
- Wilson CL, Cash D, Galley K, Chapman H, Lacey MG, Stanford IM (2006) Subthalamic nucleus neurones in slices from 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mice show irregular, dopamine-reversible firing pattern changes, but without synchronous activity. *Neuroscience* 143:565-72.
- Xiao C, Miwa JM, Henderson BJ, Wang Y1, Deshpande P, McKinney SL, Lester HA (2015) Nicotinic receptor subtype-selective circuit patterns in the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 35: 3734-46.
- Yelnik J, Percheron G (1979) Subthalamic neurons in primates: a quantitative and comparative analysis. *Neuroscience* 4:1717-43.
- Zaidel, A., Spivak, A., Grieb, B., Bergman, H., Israel, Z. (2010) Subthalamic span of beta oscillations predicts deep brain stimulation efficacy for patients with Parkinson's disease. *Brain* 133, 2007-21.
- Zhu Z, Bartol M, Shen K, Johnson SW (2002a) Excitatory effects of dopamine on subthalamic nucleus neurons: in vitro study of rats pretreated with 6-hydroxydopamine and levodopa. *Brain Res* 945:31-40.
- Zhu ZT, Shen KZ, Johnson SW (2002b) Pharmacological identification of inward current evoked by dopamine in rat subthalamic neurons in vitro. *Neuropharmacology* 42: 772-81.

Résultats I :

Origine de l'hypoactivité du GPe dans la maladie de Parkinson.

Article 2

GAT-3 down-expression is responsible for tonic inhibition in external globus pallidus neurons after chronic dopamine depletion

En préparation

GAT-3 down-expression is responsible for tonic inhibition in external globus pallidus neurons after chronic dopamine depletion

Marine Chazalon ^{1, 2‡}, **Cristina Miguez** ^{3‡}, **Stéphanie. Morin** ^{1, 2}, **Audrey Martinez** ^{1, 2}, **Sofia Cristóvão-Ferreira** ⁴, **Sandra Vaz** ⁴, **Ana Sebastiao** ⁴, **Bernard Bioulac** ^{1, 2},
Eric Boué-Grabot ^{1, 2} and **Jérôme Baufreton** ^{1, 2#}

¹ Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, F-33000 Bordeaux, France.

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

³ Department of Pharmacology, University of the Basque Country (UPV/EHU), 48940, Leioa, Spain

⁴ Institute of Pharmacology and Neurosciences, Faculty of Medicine, and Unit of Neuroscience, Institute of Molecular Medicine, University of Lisbon, Portugal

‡ M.C. and C.M. contributed equally to this work.

Corresponding author:

Dr Jérôme Baufreton, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR CNRS 5293, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: jerome.baufreton@u-bordeaux.fr

Abbreviated title: Aberrant tonic inhibition in parkinsonian GPe

Keywords: *globus pallidus; basal ganglia; extrasynaptic GABA_A receptors; GABA transporters; electrophysiology*

Acknowledgements: This work was supported French Agence Nationale de la Recherche (grant 08-JCJC-0087), the Eurorégion Aquitaine-Euskadi (grant Neurosciences n°9), the Basque Government (CM postdoctoral grant) and grant LABEX BRAIN ANR-10-LABX-43 (MC post-doctoral grant). We are grateful to S. H. Oliet, E. Audinat and D. Voisin for insightful scientific discussions. The authors declare no competing financial interests.

ABSTRACT

The external globus pallidus (GPe) is a key GABAergic nucleus in the basal ganglia (BG), a neuronal network involved in motor control. GPe neurons hypoactivity is one of the electrophysiological signatures of Parkinson's disease (PD) but its origin remains highly debated. According to the direct-indirect pathway BG model, the striato-pallidal indirect pathway becomes hyperactive after dopamine depletion which is responsible for the abnormally elevated extracellular GABA concentrations in the GPe. These findings support the conclusion that GABAergic neurotransmission contributes to GPe hypoactivity but the underlying molecular mechanisms are unknown. Here, we have characterized the alterations of GABAergic transmission in the GPe in rodent models of PD using *in vitro* patch-clamp recordings in acute brain slices. We discovered the existence of a persistent background GABAergic current named 'tonic inhibition' (TI) which is only seen in GPe neurons of dopamine-depleted rodents. We have then identified GABA_A receptor subunit participating in the composition of extra-synaptic GABA_A receptors (eGABA_AR) of GPe neurons and demonstrated that TI is independent of neuronal activity. Finally, we investigated the role of GABA transporters. While neuronal GABA transporters (GAT-1) function is unaffected in PD animal models, we found a deficit in GABA uptake by astrocytes due to a down-expression of GAT-3 transporters leading to aberrant activation of eGABA_AR. Finally, we showed that TI reduces neuronal excitability of GPe neurons, suggesting that this persistent form of GABAergic inhibition contribute to hypoactivity and altered firing pattern of GPe neurons in PD.

INTRODUCTION

In the central nervous system, two forms of GABAergic inhibition coexist to control the excitability of neuronal networks (Farrant & Nusser, 2005). Fast, phasic synaptic transmission precisely regulate action potential generation and synchronized activity among neurons (Baufreton et al, 2005a; Baufreton et al, 2009; Cobb et al, 1995), while a persistent form of inhibition (referred to as tonic inhibition) set the global level of excitability of neuronal networks (Semyanov et al, 2004).

The external globus pallidus (GPe) is a key GABAergic element of the basal ganglia (BG), a subcortical network whose primary function is the control of voluntary movements and the major site of pathology and dysfunction in Parkinson's disease (PD). The activity of GPe neurons is powerfully patterned by extrinsic striatal and intrinsic pallidal GABAergic inputs in health and diseased states (Kita & Kita, 2011; Miguez et al, 2012; Sims et al, 2008). Electron microscopic studies have shown that, in the GPe GABA_A receptors are clustered at GABAergic synapses but are also abundant at nonsynaptic locations. (Charara et al. 2005). Phasic inhibition has been shown to act at synaptic GABA_A (Gross et al, 2011) and GABA_B receptors (Kaneda & Kita, 2005; Kita et al, 2006) in GPe neurons.

Tonic inhibition has not been observed under physiological conditions in this nucleus but only when extracellular GABA concentrations are artificially elevated by the pharmacological blockade of GABA uptake systems (Jin et al, 2011b). The GPe is composed of several cell types (Hernandez et al, 2015; Mastro et al, 2014; Nobrega-Pereira et al, 2010) which can be divided into two main types of projection neurons, called arypallidal and prototypic GPe neurons (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015; Mallet et al, 2012; Mallet et al, 2008a).

In experimental Parkinson's disease (PD), prototypic GPe neurons switch from an irregular/regular to a bursty mode of discharge tightly coupled with cortical activity while arypallidal neurons become hypersynchronous in anaesthetized animals (Abdi et al, 2015; Mallet et al, 2012). The origin of this pathophysiological activity remains unclear. According to the classical model of the basal ganglia network (Albin et al, 1989), indirect pathway spiny projection neurons (iSPN) become hyperactive after chronic dopamine depletion and thus contribute to the aberrant pattern and hypoactivity of GPe neurons. While this hypothesis is supported by experimental data (Mallet et al., 2006; Callahan et al., in preparation), it has also been suggested that GPe neurons become hypoactive in PD, due to the loss of autonomous pacemaking (Chan et al, 2011; Hernandez et al, 2015). In the present study, we investigated alteration of GABAergic transmission in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rats. We found that while basal synaptic transmission was unchanged, a tonic current was consistently observed in pallidal neurons recorded from dopamine-depleted acute brain slices. We demonstrated that tonic inhibition is mediated by δ -containing extrasynaptic GABA_A receptors. Then, we investigated the cause of tonic form of inhibition and found that glial transporters GAT-3, but not neuronal transporters GAT-1, expression was down-regulated in 6-OHDA rats. Finally, we showed that tonic inhibition can be found in prototypic and arypallidal GPe neurons and reduce their excitability. Altogether, these data support the conclusion that an aberrant persistent form of inhibition contribute to the pathophysiological activity of GPe in PD.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed in Sprague-Dawley rats (Charles River, France), B6.129-Gabrd^{tm1Geh}/J (δ knock out, δ -/- and wildtype δ +/+), PV-Ai9T, Nkx2.1-Ai9T and control mice of either sex. Animals were housed under a 12:12 light-dark cycle with food and water provided *ad libitum*. Experimental protocols were approved by the local ethical committee (agreement #A5012075) and were conformed to European Economic Community (86/6091EEC). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

6-hydroxydopamine lesion and behavioral assessment.

Rats (P17–19) were anaesthetized with ketamine (75 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic frame. According to established procedures (Francardo et al, 2011; Miguez et al, 2012), injections of 6-OHDA (dissolved in 0.02% *ascorbic acid*) were made into the right medial forebrain bundle at a rate of 0.5 μ l/min. For rats, 2 μ l of 6-OHDA (4 μ g/ μ l) were infused in the following coordinates, AP: -2.4 mm, ML: -1.2 mm, DV: -7.4 and -7.9 mm (relative to bregma, sagittal suture and dural surface). After each injection, the needle was left in place for additional 2–4 min to allow the toxin to diffuse into the structure before being slowly retracted. To protect noradrenergic neurons, desipramine (20 mg/kg, i.p.) was administered 30 minutes before the infusion of 6-OHDA. Two weeks after, forelimb use was measured using the cylinder test in order to assess the dopaminergic loss induced by the lesion (Miguez et al, 2012). Only animals performing < 20% wall contact with the paw contralateral to the lesion were further processed for electrophysiological recordings.

Drugs

Unless otherwise stated, all drugs were purchased in Abcam, prepared in distilled

water as concentrated stock solutions and stored at -20°C. On the day of the experiment, drugs were diluted and applied through the bath perfusion system. Glutamatergic and GABA_B synaptic transmission was blocked for all experiments. GABA_B receptors were blocked with 1 μ M (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid (CGP 55845 dissolved in DMSO), NMDA receptors with 50 μ M D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV) and AMPA/kainate receptors with 20 μ M 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX). For revealing GABA_AR-mediated tonic inhibition, 20 μ M 4-[6-imino-3-(4-methoxyphenyl)pyridazin-1-yl] butanoic acid hydrobromide (GABA_Azine/SR-95531) was applied. For blocking GAT-1 and GAT-3 transporters 10 μ M 1,2,5,6-Tetrahydro-1-[2-[[[(diphenylmethylene)amino]oxy]ethyl]-3-pyridinecarboxylic acid hydrochloride (NNC-711) and 20 μ M 1-[2-[tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-(S)-3-piperidinecarboxylic acid (SNAP 5114, dissolved in DMSO, Tocris) were respectively used. Specific agonist of GABA_AR δ subunits, 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol hydrochloride (THIP) was also used at 1 μ M. Finally, for blocking action potential dependent GABA release, the Na⁺ channel blocker octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9:7,10a-dimethano-10aH-[1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol (TTX) was used at 1 μ M.

Electrophysiology

Slice preparation. Animals were anesthetized with ketamine/xylazine and perfused transcardially with ice-cold modified artificial cerebrospinal fluid (ACSF), equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂, and containing (in mM): 230 sucrose, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 10 MgSO₄ and 10 glucose. Brains were rapidly removed and sectioned into 350 μ m thick parasagittal slices with a vibrating blade microtome (VT1200S; Leica

Microsystems, Germany). Slices containing the GP were then left for equilibration for ~1 h (at ~35°C) in ACSF of the following composition (in mM): 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄, 10 glucose, 1 sodium pyruvate and 4.9 L-gluthathione reduced (gassed with 95% O₂–5% CO₂).

Whole-cell voltage-clamp and perforated-patch current-clamp recordings. Single slices were transferred to a recording chamber, perfused continuously with oxygenated ACSF at 32–34°C, and visualized using infrared gradient contrast video microscopy (Eclipse workstation, Nikon) and a 60X water-immersion objective (Fluor 60X/1.00 W, Nikon). Recordings from individual GPe neurons were made using pipettes (impedance, 3–6MΩ) prepared from borosilicate glass capillaries (G150–4; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) with a micropipette puller (P-97; Sutter Instruments, Novato, CA, USA). For whole-cell voltage-clamp recordings, pipettes were filled with (in mM): 135 CsCl, 3.6 NaCl, 1 MgCl₂·6H₂O, 10 Hepes, 5 QX-314, 0.1 Na₄EGTA, 0.4 Na₃GTP, 2 Mg_{1.5}ATP and 5.4 biocytine. Perforated-patch current-clamp recordings were performed using (in mM): 110 KMeSO₄, 25 KCl, 1 MgCl₂·6H₂O, 0.1 CaCl₂, 10 Hepes, 1.1 Na₄EGTA, 0.4 Na₂GTP and 2 Mg_{1.5}ATP, and the pipette tip was back-filled with the same pipette solution containing Gramicidin D (~15 μg/ml, Sigma-Aldrich, France). The pH and osmolarity of the pipette solutions were pH 7.2 and 290 mOsm, respectively. Recordings were obtained using a Multiclamp 700B amplifier and Digidata 1320A digitizer controlled by Clampex 9.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Signals were low-pass filtered at 4 kHz and sampled at 20 kHz. Whole-cell voltage clamp recordings with CsCl-filled electrodes and perforated-patch current clamp recordings with KMeSO₄-filled electrodes were corrected for a junction potential of 4 mV and 5 mV, respectively. Spontaneous GABA_AR-mediated inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) were recorded at a holding

potential of –60 mV (after junction potential correction). In voltage clamp experiments, series resistance was monitored by a step of –5mV at the end of each recording. Data were discarded when the series resistance increased by >20%. All experiments were made in the presence of selective blockers of GABA_B, NMDA and AMPA/kainate receptors. For revealing tonic inhibition GABA_A 20 μM was perfused on the bath. Once GABA_A was applied, the slice was not further used. After electrophysiological recordings, slices were fixed overnight in a solution of paraformaldehyde at 4% and maintained in PBS-azide at 0.3% at (4°C) until immunohistochemical processing.

Immunohistochemistry

Tyrosine hydroxylase immunostaining. After inactivation of endogenous peroxydases (3% H₂O₂ in PBS for 30 min), sections were incubated for 60 min in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.3% Triton X-100. Thereafter, slices were incubated in primary antibody (1:10000 monoclonal anti-TH; MAB318, Millipore Bioscience Research Reagents) overnight. Subsequently, the sections were treated with the secondary antibody (1:1000 biotinylated horse anti-mouse IgG; Vector Laboratories) for 90 min. Both immunoreagents were diluted in PBS containing 1% BSA and 0.3% Triton X-100. Finally, sections were incubated in avidin-biotin peroxidase complex (1:500; Vector Laboratories) for 60 min and immunoreactivity was revealed using AMEC (Vector Laboratories). Sections were rinsed, mounted on gelatin-coated slides, and coverslipped in VectaMount (Vector Laboratories). The entire procedure was performed at room temperature under gentle agitation.

Tyrosine-hydroxylase optical density. At least three sections from each hemisphere containing the striatum were scanned and further processed. Mean optical density was analyzed using the Mercator image analysis system (Explora Nova, La Rochelle, France) and values were corrected for background staining. TH optical density levels were

expressed as the mean percentage of the values from the intact side. Animals with unilateral 6-OHDA infusions included in the study showed >70 % reduction in TH-fiber density in the striatum.

Molecular characterization of GPe neurons.

In mice with diverse GPe neuron labeling, recorded cells were identified by biocytine revelation. Sections were rinsed and incubated in PBS-triton 0,3% containing 1% w/v BSA for 30 min. Thereafter, slices were treated with AlexaFluor-488-conjugated streptavidin for 120 min (1:500 dilution; Invitrogen). After rinsing, the sections were mounted and coverslipped in VectaShield (Vector Laboratories) and imaged on a confocal fluorescence microscope (TCS SP8; Leica Microsystems) equipped of a white light laser 2 with freely tunable excitation from 470 to 670 nm.

GABA uptake experiments

Punches of GPe were obtained from acute brain slices of control and 6-OHDA rats, respectively. Assays were performed in a non-supplemented low-glucose DMEM. GPe punches were incubated with ADA for 15 min before the addition of the test drugs; test drugs were added and incubation continued for an additional 20 min. GABA uptake was initiated by the addition of 30 μm [^3H]GABA (except otherwise specified). The transport was stopped after 40 s with 2 ml of ice-cold PBS. The amount of [^3H]GABA taken up by GPe neurons was quantified by liquid scintillation counting. The GAT-1-mediated transport was calculated through the subtraction of the amount of GABA taken up in the presence of the specific blocker of GAT-1, NNC-711 (30 μm) to the total transport.

Western Immunoblotting

Patches of GPe were dissected from 500 μm thick parasagittal slices. After, the sample was homogenized in RIPA buffer (Sigma)

with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Pierce) and centrifuged at 14.000 rpm, at 4°C, for 15 min. The resulting supernatants were collected and the proteins are reduced with a buffer containing 12% beta-mercaptoethanol until quantification of the whole protein by the BCA method (Pierce). Samples containing 20 μg of proteins were heated to 100°C for 5 min and electrophoresis was performed onto a 10% polyacrylamide gel. Proteins were blotted on polyvinylidene fluoride membranes (Immobilon P; Millipore, Paris, France) in Miniprotean III (Biorad, Paris, France). Membranes were first blocked in PBS-Tween (0.1% Tween 20) containing 5% BSA for 90 min and later incubated overnight with the primary monoclonal antibody anti-GAT-3 1:500 (Millipore) and anti-Actin 1:10000 (Sigma), diluted in PBS-Tween 0.1%-1% BSA. Membranes were then incubated for 60 min at room temperature with the secondary anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) horseradish peroxidase-coupled antibody (1:5000 in PBS-Tween 0.1%) and supplemented with 5% milk. The western Blots were revealed with the chemidoc system (Bio-Rad)

Data analysis and statistics

Data are presented as the median and interquartile range unless otherwise stated. Box plots (central line: median; box: 25%–75%; central square: mean; whiskers: 10%–90%) are used to illustrate sample distributions. For statistical comparisons, the nonparametric Wilcoxon signed-rank test and Mann-Whitney *U* test were used for paired and unpaired comparisons, respectively.

RESULTS

GABAergic inhibition is altered in GPe neurons after chronic dopamine depletion.

The rate and pattern of GPe neurons is tightly control by internal and external GABAergic synaptic inputs. In order to test if dopamine depletion affected spontaneous GABAergic synaptic transmission, we recorded GPe neurons in voltage-clamp mode from acute brain slices of aged matched control (AMC) and dopamine depleted animals (6-OHDA). While the frequency and the amplitude of spontaneous inhibitory post-synaptic currents (IPSCs) were not affected by dopamine deprivation (Fig. 1A-F) as previously reported (Migueluez et al, 2012), the discovered that blocking

GABA_A receptors with 20μM of the selective GABA_A competitive antagonist SR95531 (GABAzine) induced a shift in holding current attributable to tonically activated GABA_A receptors only in GPe recorded from dopamine depleted slices (AMC; $\Delta I = 0$; 0-5 pA, n=22; 6-OHDA; $\Delta I = 15.5$; 7-20 pA, n=8; P=0.001, MW-U test; Fig. 1A-B, G). This form of inhibition classically called tonic inhibition has only been observed previously in GPe neurons of control rats when GABA transporters were blocked by selective antagonists (Jin et al, 2011b). Thus, our results suggest that GABAergic transmission is altered in the GPe following chronic loss of dopamine.

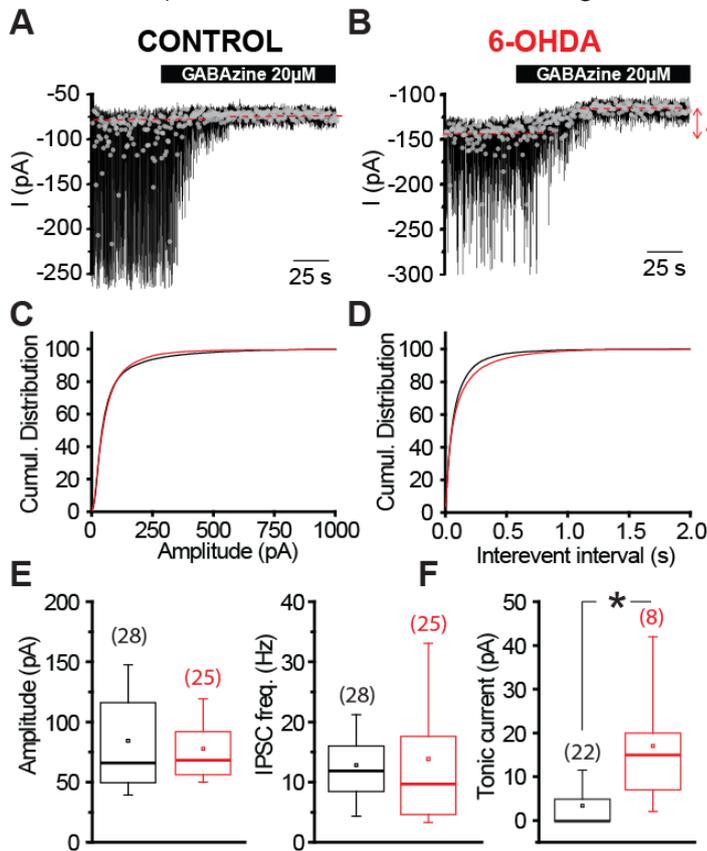


Figure 1: Tonic GABA inhibition is observed in GP neurons only in experimental Parkinsonism

A-B: Representative voltage-clamp recording showing the effect of GABAzine on the holding current of a GP neuron under control (A) and 6OHDA conditions (B). Superimposed grey dots represent the same traces but downsampled at 2Hz. **C-D:** Population cumulative amplitude and frequency distributions of spontaneous IPSCs in control (black lines) and 6-OHDA (red lines) conditions. **E-F:** Box plots of spontaneous IPSC amplitude and frequency in control and DA-depleted conditions. **G:** Box plots showing a significant difference in the magnitude of the tonic current in control and DA-depleted conditions. The dash red lines represent the median holding current in absence and presence of GABAzine. ΔI is the difference between the holding current in control (APV 50μM, DNQX 20μM and CGP55845 1μM) and in GABAzine (20μM) conditions. * p<0.05; Mann-Whitney U test.

Several reports in the literature support the conclusion that indirect pathway medium spiny striatal neurons (D2-SPN) are hyperactive in PD and this GABAergic input to the GPe is responsible for the aberrant rate and pattern of activity of GPe neurons (Abdi et al, 2015; Kita & Kita, 2011). In order

to test if putatively hyperactive striato-pallidal synapses could be responsible of the tonic current observed in dopamine depleted slices, we recorded synaptic GABAergic transmission in presence of 0.5μM tetrodotoxin in the perfusion solution. Miniature IPSC (mIPSCs) amplitude and

frequency distributions and means were not statistically different between control and dopamine depleted slices (**Fig. 2A-F**). While action potential independent synaptic transmission remained similar, a significant tonic current was recorded in presence of TTX in dopamine depleted slices when GABA_A receptors were bath-applied to block GABA_A receptors while no current was detectable in slices obtained from AMC rats

(**Fig. 2A-B, G**; AMC; $\Delta I=0$; 0-0 pA, n=8; 6-OHDA; $\Delta I=21$; 20-30 pA, n=6; P=0.01, MW-U test). Thus this result supports the conclusion that tonic inhibition in slices obtained from 6-OHDA animals is independent of action potential-dependent synaptic release of GABA and therefore relies upon local synaptic alterations rather than excessive network activity.

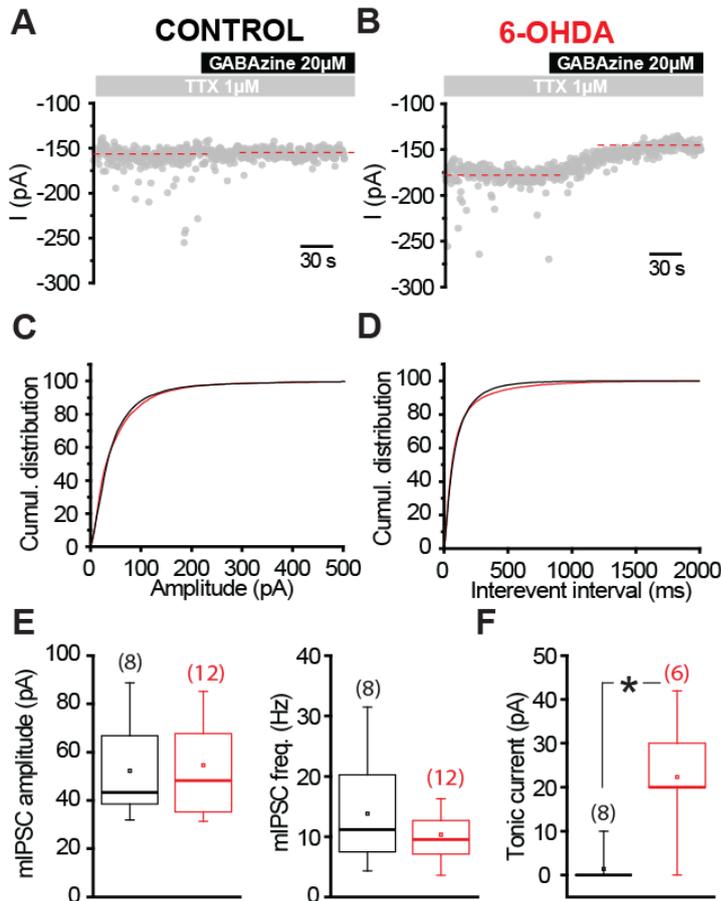


Figure 2: GABA-mediated tonic current is independent of neuronal activity

A-B: Typical examples sampled at 2Hz showing the effect of GABAzine on the holding current of GPe neurons recorded in presence of tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) either under physiological condition (Control) or in brain slices obtained from DA-depleted animals (6-OHDA). **C:** Box plots showing the presence of a tonic current only in DA-depleted condition. *p<0.05; Mann-Whitney U test

Tonic GABA inhibition is mediated by extrasynaptic delta-subunit containing GABA_A receptors.

In the central nervous system, tonic inhibition is mediated by GABA_A receptors composed of specific subunits, such as δ , $\alpha 4$, $\alpha 5$ or $\alpha 6$, which confer to these receptors a high affinity for GABA, slow desensitization and fast deactivation kinetics (Bianchi et al, 2001; Haas & Macdonald, 1999). In the GPe, δ , $\alpha 4$ and $\alpha 5$ has been detected at the protein level (Kultas-Ilinsky et al, 1998; Pirker et al, 2000; Schwarzer et

al, 2001; Waldvogel & Faull, 2015). As δ and $\alpha 4$ are often associated in extrasynaptic GABA_A, we investigated the presence of δ in GPe using the δ -selective superagonist THIP in wild-type mice ($\delta^{+/+}$) and δ subunit knock-out mice ($\delta^{-/-}$). THIP was applied at a concentration of 1 μ M which been reported to selectively activate δ -containing GABA_A receptors (Drasbek et al, 2007; Meera et al, 2011) and GABAzine was used to measure the magnitude of the tonic current. In GPe neurons recorded from $\delta^{+/+}$ slices, the THIP-induced current was 16.5; 12-28 pA (**Fig.**

3A, C, n=10), while no detectable current (0.6; -4.9-13 pA; **Fig. 3B,C**, n=7; p=0.021) were elicited by THIP in GPe neurons recorded from $\delta^{-/-}$ slices, suggesting that δ subunit enter in the composition of extrasynaptic GABA_A receptors in GPe neurons. We also analyzed the kinetic parameters of spontaneous IPSCs in absence and presence of THIP in the bath solution, both in $\delta^{+/+}$ and $\delta^{-/-}$ slices (**supplementary figure 1A-C**), and did not found any differences, suggesting that δ subunit is only present in extrasynaptic GABA_A receptors in GPe neurons. Then, we wanted to test if δ -containing GABA_A receptors are the only extrasynaptic GABA_A

receptors responsible for tonic inhibition in GPe neurons. Consistent with earlier findings (Jin et al, 2011b), blockade of GAT-1 transporters produced an elevation of extracellular GABA concentrations and elicited tonic currents in GPe neurons. We found that inhibiting GABA uptake with 10 μ M NNC711, a selective antagonist of GAT-1, was able to promote a tonic current in slices obtained from $\delta^{+/+}$ but not from $\delta^{-/-}$ mice ($\delta^{+/+}$: $\Delta I = 17$; 8-42 pA, n=6; $\delta^{-/-}$: $\Delta I = 1.5$; 0-8 pA, n=10; P=0.02, MW-U test) suggesting that tonic inhibition in GPe neurons is entirely supported by δ -containing GABA_A receptors (**Fig. 3D-F**).

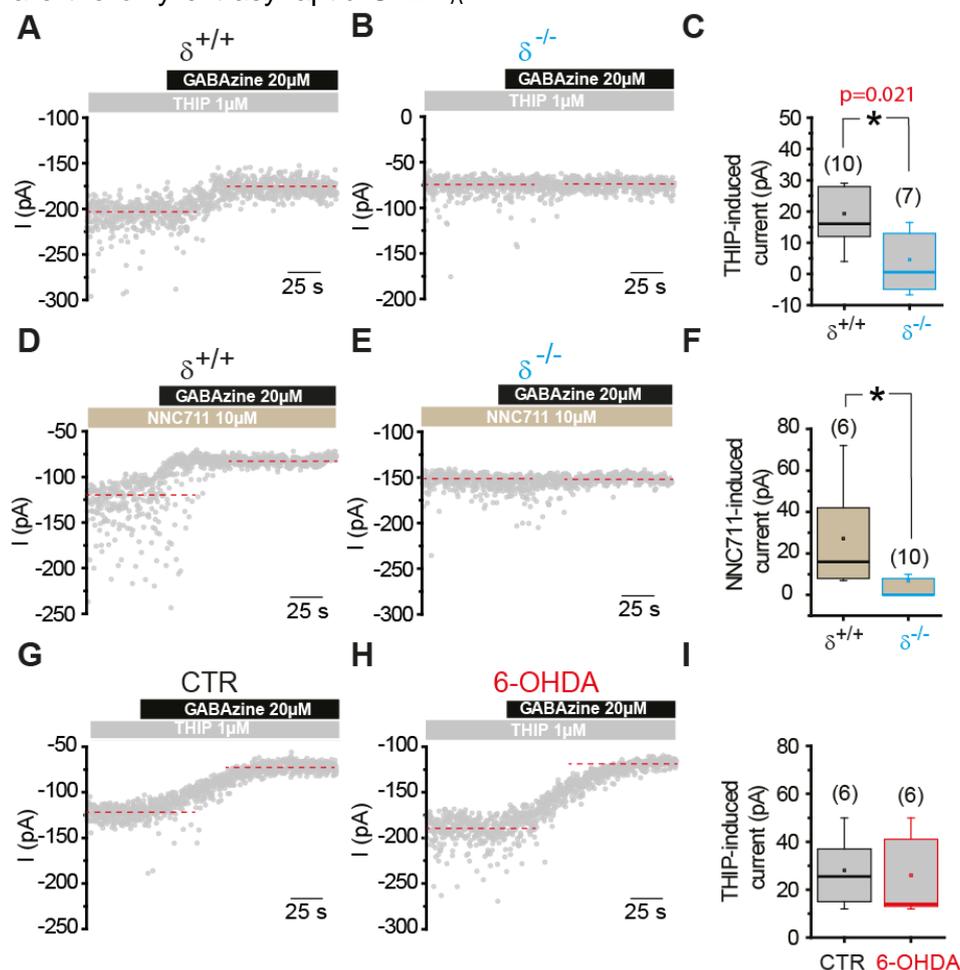


Figure 3: Pallidal tonic inhibition is mediated by δ -containing extrasynaptic GABA_A receptors which are activated by elevated levels of extracellular GABA

A-B: Example of the effect of 1 μ M THIP (a positive allosteric modulator of δ -containing GABA_AR) on the holding current of GPe neurons recorded from wild-type mice ($\delta^{+/+}$) and knock-out mice for the GABA_AR δ subunit ($\delta^{-/-}$). **C:** Box plots showing the absence of effect of THIP in $\delta^{-/-}$ mice. **D-E:** Example of the effect of GABAzine (20 μ M) on the holding current of GPe neurons recorded in presence a NNC711 (10 μ M), a selective antagonist of GAT-1, in slices obtained from wild-type mice ($\delta^{+/+}$) and knock-out mice for the GABA_AR δ subunit ($\delta^{-/-}$). **F:** Box plots showing the absence of effect of extracellular elevated level of GABA on the holding current of GPe neurons recorded from $\delta^{-/-}$ mice. **G-**

H: Examples of the effect of 1 μ M THIP on the holding current of GPe neurons recorded from control and DA-depleted rat slices (6-OHDA). **F:** Box plots indicating that THIP causes a tonic current of similar magnitude in control and 6-OHDA conditions suggesting that tonic inhibition is not due to an upregulation of δ -containing GABA_ARs.

Dopamine depletion can alter GABA_A receptor level of expression. To test if δ subunit is overexpressed in the GPe after 6-OHDA-induced destruction of midbrain dopaminergic neurons, we measured the magnitude of the THIP-induced currents in AMC and 6-OHDA animals. No differences in the magnitude of THIP-induced currents were found between the two groups (**Fig. 3G-I**; AMC: $\Delta I=27.5$; 15-37 pA, n=6; 6-OHDA: $\Delta I=20$; 13-41 pA, n=6; p=0.809, MW-U test) suggesting that pallidal tonic inhibition is not due to δ -containing GABA_A receptors overexpression in 6-OHDA-treated rats.

the $\alpha 5$ inverse agonist L655,708. Perfusion of 1 μ M of L655,708 did not modify the holding current in 6-OHDA slices, suggesting that $\alpha 5$ subunit do not contribute to tonic inhibition under dopamine-depleted conditions in GPe neurons (**Fig. 4A-C**). Furthermore, the magnitude of tonic current was also similar after application of GABA_Azine after L655,708 compared to GABA_Azine alone in 6-OHDA-treated slices. Altogether, these results suggested that tonic inhibition in GPe is mediated by δ -containing extrasynaptic GABA_A receptors but do not rely on an overexpression of these receptors in pathological conditions.

Finally, we tested the contribution of GABA_A $\alpha 5$ subunit in pallidal tonic inhibition using

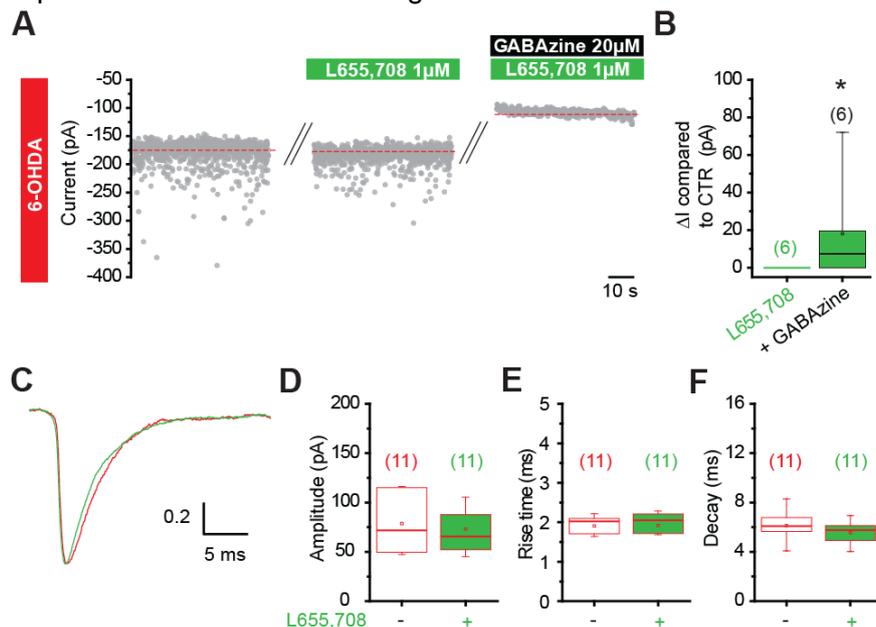


Figure 4: Pallidal tonic inhibition is not mediated by $\alpha 5$ -containing extrasynaptic GABA_A receptors

A: Representative traces showing that L655,708, an inverse agonist of $\alpha 5$ -containing GABA_A does not modify the holding current of GPe neurons, while the addition of GABA_Azine induce a shift of holding current in dopamine-depleted slices. **B:** Box plots summary of the population data. **C:** Normalized averaged IPSC recorded under control and in presence of L655,708. **D-E:** Box plots showing the absence of modification of IPSC kinetic parameters in presence of L655,708.

Reduced expression of glial GAT-3 transporters is responsible of aberrant tonic GABA inhibition.

Activation of extrasynaptic GABA_A receptors is tightly regulated by both neuronal and glial transporters, GAT-1 and GAT-3 respectively. We first investigated GAT-1 function in

control and dopamine-depleted conditions. In AMC rat slices, blockade of GAT-1 by 10 μ M NNC711 generated a tonic current compared to control slices (**Fig. 5A-C**; Control; $\Delta I = 0$; 0-5 pA, n=22; NNC711; $\Delta I = 18$; 3-39 pA, n = 23; $p < 0.001$; MW-U test), which is consistent with the results obtained in wild-type mice (**Fig. 3D-F**). In dopamine-depleted slices, NNC711 produced a significantly greater current compared to the application of GABAzine alone (**Fig. 5D-F**; 6-OHDA; $\Delta I = 15.5$; 7-20 pA, n = 8; 6-OHDA+NNC711; $\Delta I = 36$; 22-60 pA, n = 11; $p = 0.023$; MW-U test) suggesting that the blockade of these neuronal transporters can exacerbate the tonic current observed in 6-OHDA treated rats. Nevertheless, the amount of tonic current mediated by the inhibition of GAT-1 between control and dopamine-depleted conditions, by subtracting the current obtained in presence

of NNC711 + GABAzine by the one obtained by GABAzine alone, was of similar magnitude between control and dopamine-depleted conditions, suggesting that GAT-1 transport is not altered in 6-OHDA treated rats. GAT-1 blockade did not affect spontaneous IPSCs kinetics (**supplemental figure 2**), suggesting that under basal synaptic transmission, GAT-1 contributes little on the regulation of synaptic GABA_A receptor function in GPe. In addition, GABA uptake experiments performed from punches of GPe revealed that GAT-1 transporters have a tendency to more efficiently uptake GABA in 6-OHDA conditions (**Fig. 5G**). This better efficiency is attributable to a greater maximal speed (V_{max}) of GABA uptake (Control; $V_{max} = 1.665 \times 10^6$ CPM/mg, n = 3; 6-OHDA; $V_{max} = 3.95 \times 10^6$ CPM/mg, n = 4; $p = 0.057$).

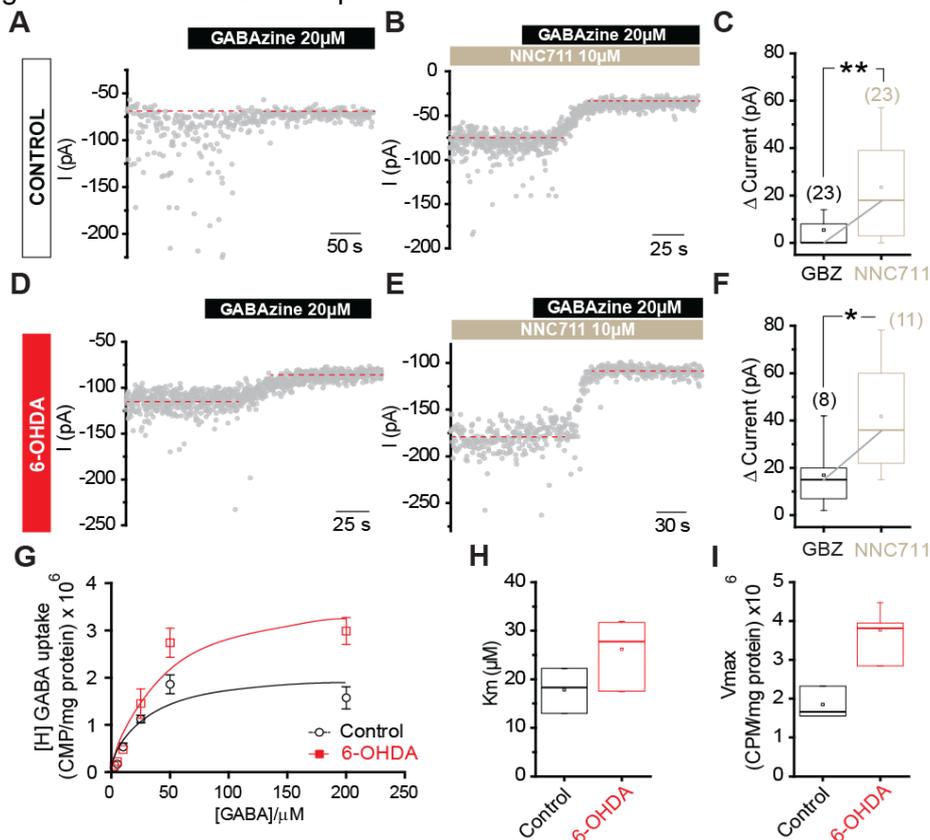


Figure 5: Tonic inhibition does not result from a dysfunction of GAT-1-mediated GABA uptake

A: Example of the effect of GABAzine of the holding current of a GP neuron when GABA transporters are working. **B:** Same as A but in presence of 10 μ M of NNC711 a specific blocker of the GABA transporter GAT-1. **C-D:** Same as A-B in DA-depleted slices. **E-F:** Population data showing the effects of GABA transporters blockade by 10 μ M NNC 711. **G:** Saturation analysis of GAT-1-mediated GABA transport in punches of GP obtained from acute brain slices. **H:** Graphs depicting the averaged K_m and V_{max} values in control and DA-depleted conditions.

GAT-3 transporters also participate to active removal of GABA from GABAergic synapses. In control slices, GAT-3 contribution in limiting extrasynaptic GABA_A receptors was shown by blocking their activity by the selective antagonist SNAP5114 (20 μM) which revealed a tonic current in GPe neurons in agreement with a recent report (Jin et al, 2011b). This tonic current was significantly greater than in control conditions (**Fig. 6A-C**; Control; $\Delta I = 0$; 0-5 pA, n=22; SNAP 5114; $\Delta I = 16$; 3-27 pA, n=20; $p < 0.001$; MW-U test). In contrast the same pharmacological treatment failed to increase tonic current in GPe neurons recorded from 6-OHDA treated animals (**Fig. 6D-F**; 6-OHDA; $\Delta I = 15.5$; 7-20 pA, n = 8; 6-OHDA+SNAP5114; $\Delta I = 12.8$; 11.6-20 pA, n=7; $p = 0.816$; MW-U test) suggesting that

GAT-3 function was unpaired by chronic dopamine depletion. Like for GAT-1, GAT-3 blockade did not affect spontaneous IPSCs kinetics (**supplemental figure 2**), suggesting that under basal synaptic transmission, GAT-3 contributes also little on the regulation of synaptic GABA_A receptor function in GPe. Western blot experiments revealed that GAT-3 expression was significantly reduced by approximately 30% in GPe punches obtained from 6-OHDA animals compared to AMC (**Fig. 6G-H**; AMC; GAT-3/Actin = 1.02, n = 11; 6-OHDA; GAT-3/Actin = 0.70, n = 7; $p = 0.028$; MW-U test). These results support the conclusion that tonic inhibition is due to a downexpression of GAT-3, presumably located on astrocytes, in the GPe of dopamine-depleted rodents.

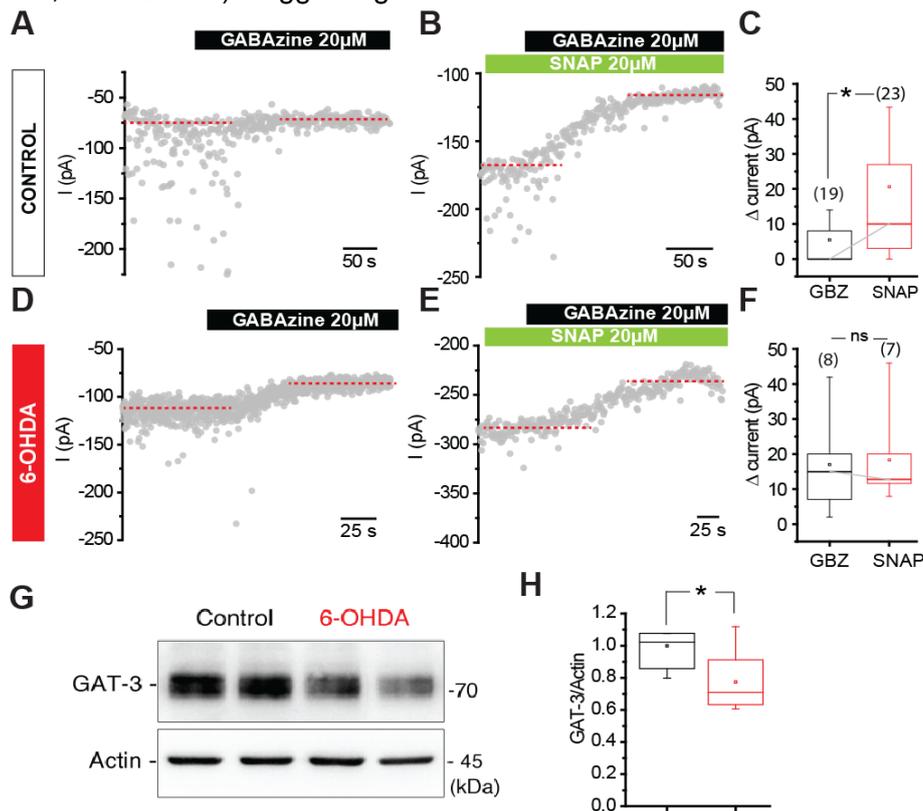


Figure 6: Pallidal tonic inhibition results from a reduced expression of GAT-3 in DA-depleted rats

A-B: Representative examples of tonic inhibition recorded in presence of 20 μM GABAzine (**A**) and 20 μM SNAP 5114, a selective blocker of the GABA transporter GAT-3 (**B**). **C:** Population graph showing that the blockade of GAT-3 (green) and GAT-3 and GAT-1 increase significantly the magnitude of tonic inhibition in control animals. **D-E:** Same as **A-B** in DA-depleted slices. **F:** Same as **C** in DA-depleted slices. Note that the blockade of GAT-3 and GAT-3 + GAT-1 does not significantly increase

the tonic inhibition in 6-OHDA conditions. **G-H**: Western blot showing the significant reduction in GAT-3 expression in DA-depleted conditions.

Tonic GABA inhibition reduce GPe neurons excitability

Several recent reports have shown that the GPe is populated from two main neuronal subtypes called prototypic and arky pallidal GPe neurons (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015). We used PV::Ai9tomato and Nkx2.1::Ai9tomato mice to selectively record prototypic (Nkx2.1- and PV-expressing) and arky pallidal (FoxP2-expressing) GPe neurons and test in tonic inhibition was present in all these cell types. We artificially augmented extracellular GABA concentration by blocking GAT-1 transporters and tested the effect of saturating concentration of GABAzine on the holding current of prototypic PV-expressing and Nkx2.1-expressing GPe neurons (**Fig. 7A,B**). In these two subtypes of prototypic GPe neurons, a tonic current was detected. We performed the same experiment on arky pallidal neurons and also found tonic inhibition in these neurons (**Fig. 7C**) suggesting that all GPe neurons express extrasynaptic receptors. These data fit with our recordings in rats in which tonic inhibition was observed in every recorded GPe neurons when uptake systems were blocked pharmacologically (**Fig. 4 and 5**).

Finally, we wanted to address the impact of tonic inhibition of the excitability of GPe neurons in dopamine-depleted conditions. In order to selectively test the net effect of tonic inhibition we used low concentration of GABAzine (400nM) previously reported to block low affinity synaptic GABA_A receptors (Stell et al., 2003) without affecting extrasynaptic high affinity GABA_A receptors. Indeed, 400 nM significantly reduced GABAergic IPSCs amplitude (**Fig. 8A,B** ; Control, IPSC amplitude = 68.17; 55.8-73.4 pA, n=6; 400nM GABAzine, IPSC amplitude = 33.64; 27.5-36.89 pA, n=6; p=0.031; WSR test) and frequency

(**Fig. 8A,B** ; Control, IPSC frequency = 30.39; 28-38.43 Hz, n=6; 400nM GABAzine,

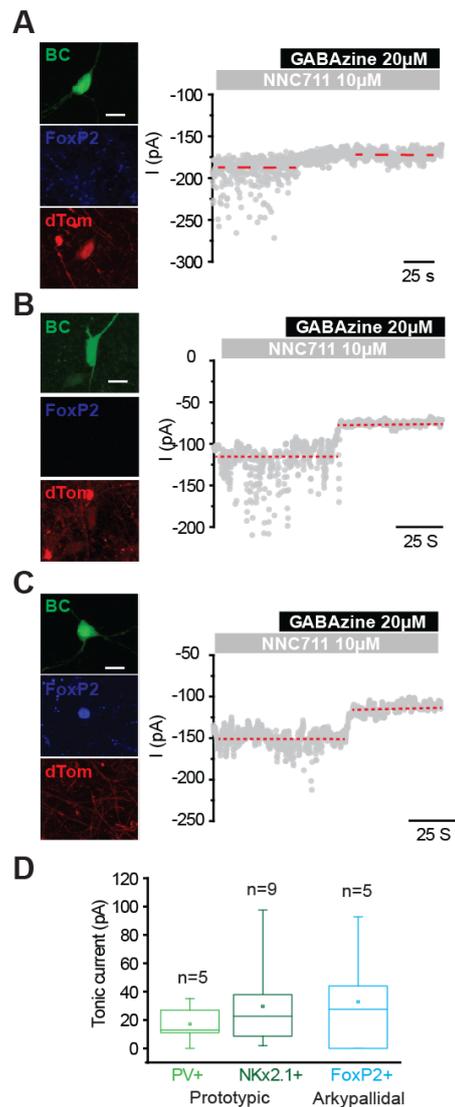


Figure 7: Tonic inhibition is present in prototypic and arky pallidal GPe neurons when GAT-1 is blocked

A, left: Confocal images showing a recorded GPe neuron filled with biocytin (BC) expressing PV (dTom) but not FoxP2. **A, right:** Representative electrophysiological recording showing the presence of a tonic current when extracellular GABA concentration are elevated by the blockade of GAT-1. **B-C:** Same as A, but for a GPe neuron expressing Nkx2.1 and FoxP2, respectively. **D:** Box plots showing the presence of a tonic current in all population of GPe neurons.

IPSC frequency = 14.75; 9.9-24.95 Hz, n=6; p=0.031; WSR test). GPe neurons were recorded in perforated-patch current-clamp in presence of low GABAzine concentration in the bath and subsequently in presence of saturating concentration of GABAzine (20 μ M) in order to determine the effect of tonic inhibition of GPe neuron excitability in dopamine-depleted slices. Incremental current steps were injected under both conditions and frequency-current (f-I) curves

were built showing a significant increase in the firing rate of GPe at depolarized potentials when tonic inhibition was blocked by saturating concentrations of GABAzine (**Fig. 8C-F**). As in gramicidin-based perforated recordings, chloride homeostasis is preserved, these data indicate that tonic inhibition is inhibitory in GPe neurons and participate to the reduction of their activity observed in idiopathic PD.

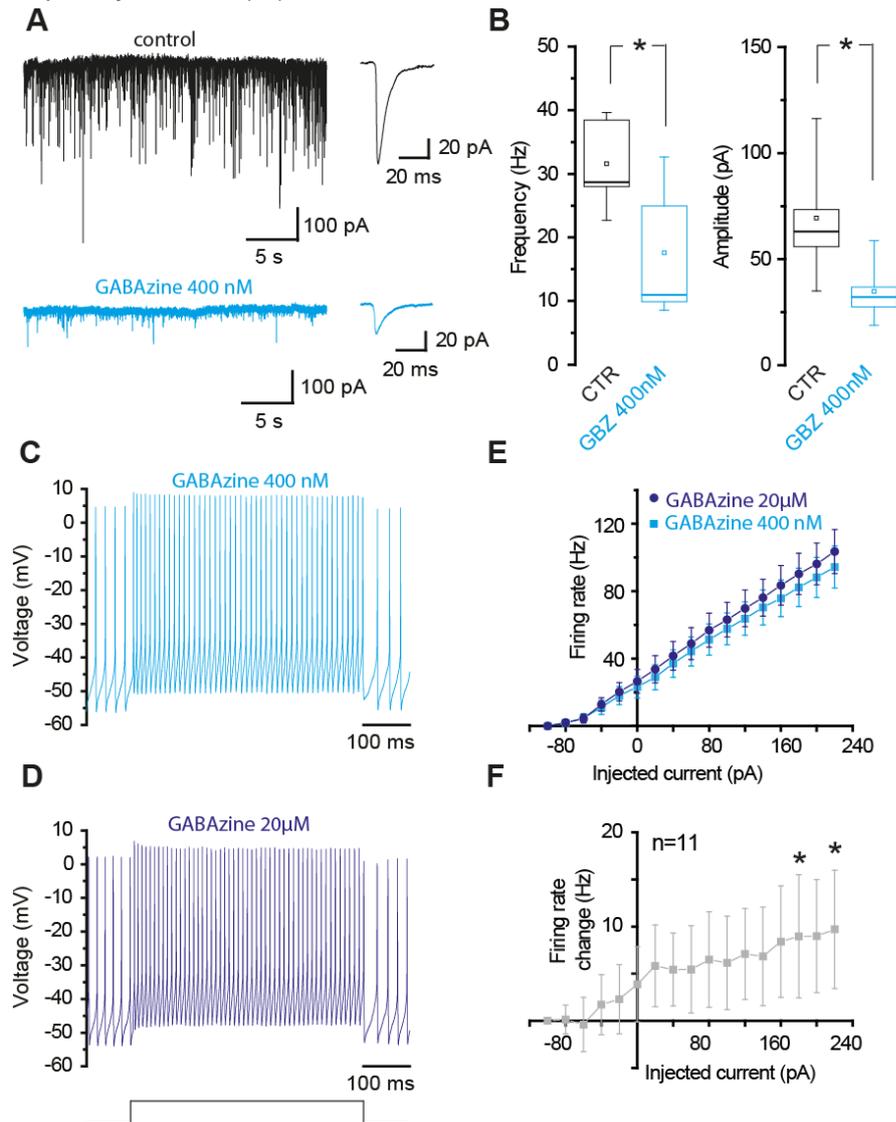


Figure 8: Tonic inhibition reduces GPe neuron excitability

A: Voltage-clamp recordings of spontaneous IPSC recorded in control and in presence of 400nM of GABAzine. **B:** Box plots depicting the significant reduction of frequency and amplitude in presence of 400 nM of GABAzine. **C-D:** Perforated-patch current-clamp recording of a GPe neuron in presence of 400nM and 20 μ M of GABAzine. **E:** f/I curves showing an increase in driven activity of GPe neurons induced by high concentration of GABAzine. **F:** Graph showing the change of firing rate induced by GABAzine 20 μ M

DISCUSSION

Using a combination of electrophysiological and biochemical approaches we demonstrated the presence of a tonic form of GABAergic inhibition in GPe following chronic dopamine-depletion. Our data show that this tonic inhibition is independent of neuronal activity and thus unrelated to indirect striato-pallidal pathway hyperactivity but relies upon GABA uptake deficit due to GAT-3 protein reduced expression which leads to abnormally elevated extracellular GABA concentration in the GPe. Furthermore, we showed that this aberrant tonic inhibition reduces GPe neuron excitability and thus may contribute to pathophysiological hypoactivity and abnormal pattern of activity of the reciprocally connected GPe-STN network in PD.

Nature of extrasynaptic GABA_A receptors involved in tonic inhibition in GPe neurons

In the CNS, tonic inhibition is mediated by extrasynaptic GABA_A receptors composed of particular subunit conferring high affinity for GABA and slow deactivation and desensitization kinetics. These receptors most often contain $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ or δ GABA_A subunits. In the GPe, $\alpha 4$, $\alpha 5$, and δ have been detected at the protein level (Kultas-Illinsky et al, 1998; Pirker et al, 2000; Schwarzer et al, 2001; Waldvogel & Faull, 2015). We have combined pharmacological experiments with δ -knock-out mice ($\delta^{-/-}$) to test for the involvement of this subunit in GPe neuron extrasynaptic receptors. The hypnotic drug THIP has been shown to be selective of δ -containing GABAA receptor at the micromolar concentration (Meera et al, 2011). At this concentration, THIP induced a tonic current in wild-type but not in $\delta^{-/-}$ mice, suggesting that in the GPe this drug is also selective of δ -containing GABAA receptors. Our results suggest that δ -containing GABAA receptors are present in dopamine-intact animals, but are not activated under

basal conditions when the GABA transporters are functional. Furthermore, no tonic currents are detectable in $\delta^{-/-}$ mice suggesting that the presence of this subunit is mandatory to have functional extrasynaptic GABA_A receptors in GPe neurons. Change of expression of δ subunit has been observed both under physiological and pathological conditions (Maguire et al, 2005; Peng et al, 2004). In the GPe, the δ -preferred agonist THIP induced tonic currents of similar magnitude both in DA-intact and DA-depleted animals, which discard the hypothesis of an increased expression of δ subunit following chronic dopamine depletion. We also tested the contribution of $\alpha 5$ which significantly contribute to tonic inhibition in the striatum (Ade et al, 2008), the cortex (Clarkson et al, 2010) and the hippocampus (Bai et al, 2001; Caraiscos et al, 2004; Scimemi et al, 2005). In contrast with these brain areas, the inverse agonist L655,708 fail to reduce the holding current in GPe neurons of 6-OHDA rats which exclude a *de novo* expression of this subunit in the GPe following dopamine depletion.

We have not addressed in this study the nature of the other subunits participating to the formation of extrasynaptic GABAA receptors in the GPe. While $\alpha 4$ is considered as a natural partner of δ in the striatum and the thalamus (Pirker et al, 2000; Sur et al, 1999), native $\alpha 1/\delta$ subunit-containing GABA_A receptors have been described in hippocampal interneurons (Glykys et al, 2007). It is possible that in the GPe $\alpha 4$ or/and $\alpha 1$ co-assemble with δ to form functional extrasynaptic GABA_A receptor. Our analyses of spontaneous IPSC kinetics between wild-type and $\delta^{-/-}$ mice and with or without THIP suggest that δ subunit do not participate to synaptic GABAA receptors in the GPe, which is in agreement with the peri- and extrasynaptic location of this subunit in other brain regions (Wei et al, 2003).

Origins of abnormal tonic inhibition in GPe neurons following the loss of dopamine

Indeed, It has been shown that striato-pallidal synapses morphology is altered and that extracellular GABA concentrations are elevated following dopamine depletion (Galeffi et al, 2003; Ingham et al, 1997; Ochi et al, 2000). The source of these elevated GABA concentrations in GPe under pathological conditions remains uncertain: it could be overflow of vesicular release, deficit of GABA uptake, reverse transport of GABA or GABA release by glial cells. According to the classical direct-indirect basal ganglia model (Albin et al, 1989) but also to experimental data (Callahan et al, In preparation; Kita & Kita, 2011; Mallet et al, 2006) the indirect striato-pallidal pathway becomes hyperactive following dopamine deprivation which contribute to abnormal synchronous activity of GPe neurons. This hyperactivity could result in excessive release and spillover of GABA from striato-pallidal synapses which reach and activate extrasynaptic GABA_A receptors. To test this hypothesis we have performed recordings in presence of TTX which abolishes activity-dependent synaptic release and thus significantly reduces vesicular release and synaptic transmission. Under this reduced neuronal GABA release condition, tonic inhibition was still present in GPe neurons of DA-depleted slices. This result is in contrast with what has been found in the thalamus, hippocampus or striatum, where tonic inhibitory currents are mediated by GABA released from synaptic vesicles responsible for activating phasic inhibition (Ade et al, 2008; Bright & Brickley, 2008; Glykys & Mody, 2007). This finding strongly suggests that pallidal tonic inhibition is independent of indirect-pathway MSN neuron hyperactivity and involves modifications at the level of pallidal GABAergic synapses.

Reverse transport by GAT-3 has been shown to contribute for tonic inhibition in the striatum (Wojtowicz et al, 2013). In the

present study it is unlikely that reverse transport is the mechanism involved in pallidal tonic inhibition as blocking GAT-1 or GAT-3 activity with selective pharmacological agents increases tonic inhibition under normal conditions. Furthermore, while GAT-1 inhibition augmented tonic current magnitude, blockade of GAT-3 did not affect the amount of tonic current in 6-OHDA rat. In the GPe GAT-1 is found mainly on small unmyelinated axons and in a much lesser extent on glia, while GAT-3 is almost exclusively expressed in glial cells processes which are closely apposed to putative GABAergic terminal forming symmetric synapses on GPe neurons (Galvan et al, 2010; Jin et al, 2011b). This differential distribution of GAT-1 and GAT-3 in the GPe suggest that each transporter play a specific role in GABA uptake in this nucleus. Furthermore, our results suggest that neuronal (GAT-1-mediated) GABA uptake function remains normal while glial (GAT-3-mediated) GABA uptake is selectively reduced after chronic dopamine depletion. Our western blot experiments provide evidences that compromised function of GAT-3 is due to a decreased protein level in the GPe. Activity-dependent regulation of GAT levels have been shown in the central nervous system. Pharmacological blockade or reduction of GAT-3 levels in hippocampal astrocytes results in increased extracellular GABA concentrations and increased tonic GABA_A-mediated currents in hippocampal interneurons and dentate granule cells (Kersante et al, 2013; Shigetomi et al, 2012). Reductions of GAT uptake have been reported in the thalamus in absence epilepsy rodent models (Cope et al, 2009) or in the cortex after a stroke (Clarkson et al, 2010) either in reason of a reduced expression of both GAT-1 and GAT-3 (Clarkson et al, 2010) or due to a loss of function of GAT-1 (Cope et al, 2009; Pirttimaki et al, 2013). Dopamine depletion is accompanied by a dramatic increase in astrocyte number and volume supporting an

astrogliosis in the GPe (Charron et al, 2014). Thus, it is possible that changes in the morphology of reactive astrocytes also contribute to the deficit of uptake by GAT-3 through a remodeling of glial coverage and the retraction from GABAergic terminals of fine glial processes.

Functional considerations

Here, we report a GABAergic tonic inhibition in the GPe observed only under dopamine-depleted condition. While alterations of this persistent form of inhibition have been described as contributing to several pathologies such as stroke, absence epilepsies and Alzheimer 's disease (Clarkson et al, 2010; Cope et al, 2009; Wu et al, 2014), this is the first time to our knowledge that tonic inhibition is associated with PD pathophysiology. Tonic inhibition is observed in every GPe neuronal populations suggesting that the operation of this nucleus is affected in its globality by this excess of inhibition. As in other part of the brain, tonic inhibition reduces GPe neuron excitability which can render GPe neurons more sensitive to pathological rhythmic glutamatergic inputs from the STN, and favor abnormal beta-band (10-35Hz) rhythmic activity observed in experimental and idiopathic PD (Mallet et al, 2008a; Mallet et al, 2008b; Sharott et al, 2005).

In summary our data show that GABAergic transmission is altered in the dopamine-depleted GPe, which lead to the development of a persistent form of inhibition reducing GPe neuron excitability. This finding indicates that the hypoactivity and aberrant firing pattern of GPe neurons are not only due to hyperactivity of indirect striato-pallidal pathway, as predicted by the classic direct-indirect model of the BG, but also to an alteration of glial function and clearance of GABA.

REFERENCES

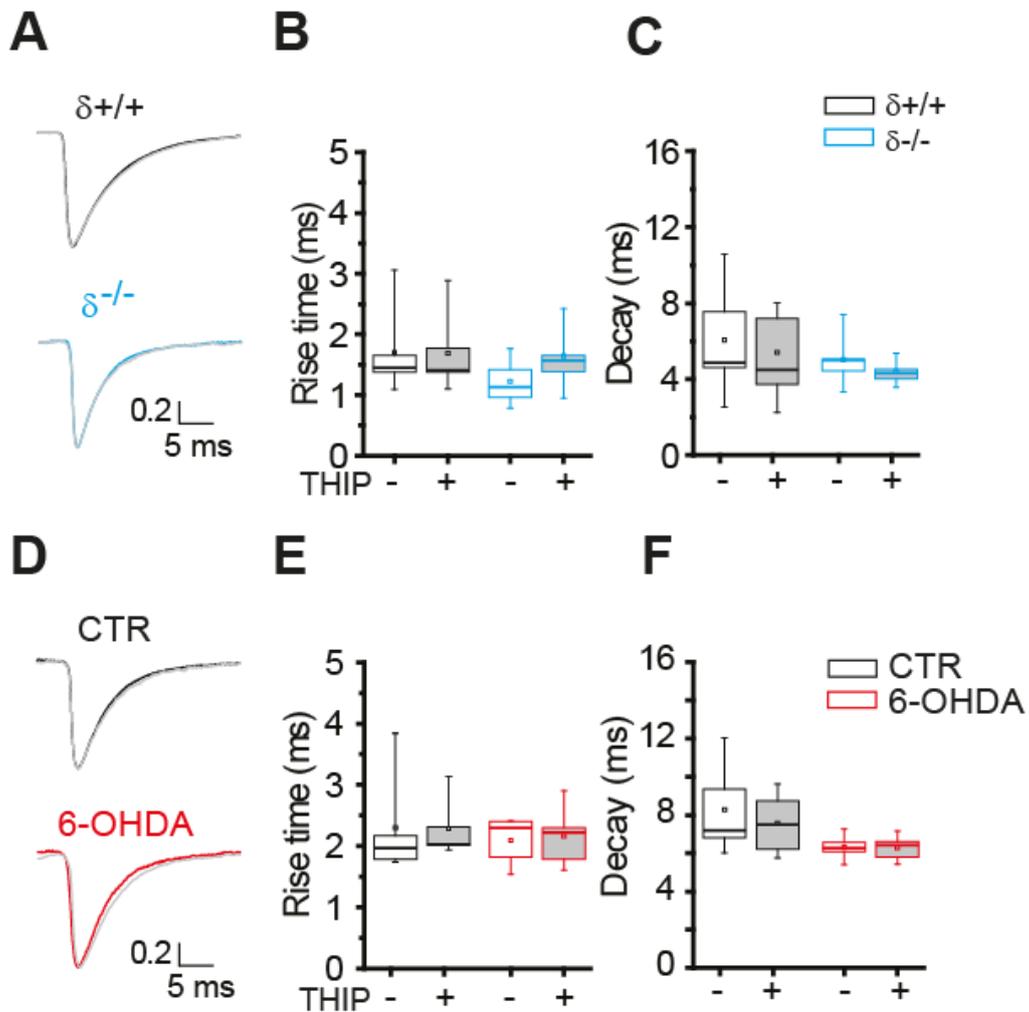
- Abdi A, Mallet N, Mohamed FY, Sharott A, Dodson PD, Nakamura KC, Suri S, Avery SV, Larvin JT, Garas FN, Garas SN, Vinciati F, Morin S, Bezard E, Baufreton J, Magill PJ (2015) Prototypic and arky pallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *J Neurosci* 35:6667-6688.
- Ade KK, Janssen MJ, Ortinski PI, Vicini S (2008) Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 28:1185-1197.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 59:814-824.
- Baufreton J, Atherton JF, Surmeier DJ, Bevan MD (2005) Enhancement of excitatory synaptic integration by GABAergic inhibition in the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25:8505-8517.
- Baufreton J, Kirkham E, Atherton JF, Menard A, Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2009) Sparse but selective and potent synaptic transmission from the globus pallidus to the subthalamic nucleus. *J Neurophysiol* 102:532-545.
- Bianchi MT, Haas KF, Macdonald RL (2001) Structural determinants of fast desensitization and desensitization-deactivation coupling in GABA_A receptors. *J Neurosci* 21:1127-1136.
- Bright DP, Brickley SG (2008) Acting locally but sensing globally: impact of GABAergic synaptic plasticity on phasic and tonic inhibition in the thalamus. *J Physiol* 586:5091-5099.
- Callahan JW, Kovalesky RF, Chu HY, Chazalon M, Wokosin D, Atherton JF, Normand E, Morin S, Chan CS, Surmeier DJ, Baufreton J, Bevan MD (In preparation) Optogenetic interrogation of abnormal subthalamic nucleus-external globus pallidus network activity following the loss of dopamine.
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA (2004) Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3662-3667.
- Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, Lewis AS, Goldberg AB, Tkatch T, Shigemoto R, Fleming SM, Chetkovich DM, Osten P, Kita H, Surmeier DJ (2011) HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 14:85-92.
- Charron G, Doudnikoff E, Canron MH, Li Q, Vega C, Marais S, Baufreton J, Vital A, Oliet SH, Bezard E (2014) Astrocytosis in parkinsonism: considering tripartite striatal synapses in physiopathology? *Frontiers in aging neuroscience* 6:258.
- Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST (2010) Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature* 468:305-309.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75-78.
- Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orban G, Errington AC, Lorincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V (2009) Enhanced tonic GABA_A inhibition in typical absence epilepsy. *Nature medicine* 15:1392-1398.
- Dodson PD, Larvin JT, Duffell JM, Garas FN, Doig NM, Kessar N, Duguid IC, Bogacz R, Butt SJ, Magill PJ (2015) Distinct developmental origins manifest in the specialized encoding of movement by adult neurons of the external globus pallidus. *Neuron* 86:501-513.
- Drasbek KR, Hoestgaard-Jensen K, Jensen K (2007) Modulation of extrasynaptic THIP conductances by GABA_A-receptor modulators in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 97:2293-2300.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.

- Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 42:327-340.
- Galeffi F, Bianchi L, Bolam JP, Della Corte L (2003) The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *Eur J Neurosci* 18:856-868.
- Galvan A, Hu X, Smith Y, Wichmann T (2010) Localization and function of GABA transporters in the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Exp Neurol* 223:505-515.
- Glykys J, Mody I (2007) The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J Physiol* 582:1163-1178.
- Glykys J, Peng Z, Chandra D, Homanics GE, Houser CR, Mody I (2007) A new naturally occurring GABA(A) receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat Neurosci* 10:40-48.
- Gross A, Sims RE, Swinny JD, Sieghart W, Bolam JP, Stanford IM (2011) Differential localization of GABA(A) receptor subunits in relation to rat striatopallidal and pallidopallidal synapses. *Eur J Neurosci* 33:868-878.
- Haas KF, Macdonald RL (1999) GABAA receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABAA receptor currents in mouse fibroblasts. *J Physiol* 514 (Pt 1):27-45.
- Hernandez VM, Hegeman DJ, Cui Q, Kolver DA, Fiske MP, Glajch KE, Pitt JE, Huang TY, Justice NJ, Chan CS (2015) Parvalbumin+ Neurons and Npas1+ Neurons Are Distinct Neuron Classes in the Mouse External Globus Pallidus. *J Neurosci* 35:11830-11847.
- Ingham CA, Hood SH, Mijster MJ, Baldock RA, Arbuthnott GW (1997) Plasticity of striatopallidal terminals following unilateral lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway: a morphological study. *Exp Brain Res* 116:39-49.
- Jin XT, Pare JF, Smith Y (2011) Differential localization and function of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in the rat globus pallidus. *Eur J Neurosci* 33:1504-1518.
- Kaneda K, Kita H (2005) Synaptically released GABA activates both pre- and postsynaptic GABA(B) receptors in the rat globus pallidus. *J Neurophysiol* 94:1104-1114.
- Kersante F, Rowley SC, Pavlov I, Gutierrez-Mecinas M, Semyanov A, Reul JM, Walker MC, Linthorst AC (2013) A functional role for both -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J Physiol* 591:2429-2441.
- Kita H, Kita T (2011) Role of Striatum in the Pause and Burst Generation in the Globus Pallidus of 6-OHDA-Treated Rats. *Front Syst Neurosci* 5:42.
- Kita H, Chiken S, Tachibana Y, Nambu A (2006) Origins of GABA(A) and GABA(B) receptor-mediated responses of globus pallidus induced after stimulation of the putamen in the monkey. *J Neurosci* 26:6554-6562.
- Kultas-Ilinsky K, Leontiev V, Whiting PJ (1998) Expression of 10 GABA(A) receptor subunit messenger RNAs in the motor-related thalamic nuclei and basal ganglia of *Macaca mulatta* studied with in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 85:179-204.
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005) Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8:797-804.
- Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26:3875-3884.
- Mallet N, Pogosyan A, Marton LF, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008a) Parkinsonian beta oscillations in the external globus pallidus and their relationship with subthalamic nucleus activity. *J Neurosci* 28:14245-14258.
- Mallet N, Pogosyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008b) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and

- cerebral cortex. *J Neurosci* 28:4795-4806.
- Mallet N, Micklem BR, Henny P, Brown MT, Williams C, Bolam JP, Nakamura KC, Magill PJ (2012) Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* 74:1075-1086.
- Mastro KJ, Bouchard RS, Holt HA, Gittis AH (2014) Transgenic mouse lines subdivide external segment of the globus pallidus (GPe) neurons and reveal distinct GPe output pathways. *J Neurosci* 34:2087-2099.
- Meera P, Wallner M, Otis TS (2011) Molecular basis for the high THIP/gaboxadol sensitivity of extrasynaptic GABA(A) receptors. *J Neurophysiol* 106:2057-2064.
- 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. *J Physiol* 590:5861-5875.
- Nobrega-Pereira S, Gelman D, Bartolini G, Pla R, Pierani A, Marin O (2010) Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *J Neurosci* 30:2824-2834.
- Ochi M, Koga K, Kurokawa M, Kase H, Nakamura J, Kuwana Y (2000) Systemic administration of adenosine A(2A) receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. *Neuroscience* 100:53-62.
- Peng Z, Huang CS, Stell BM, Mody I, Houser CR (2004) Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 24:8629-8639.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101:815-850.
- Pirttimaki T, Parri HR, Crunelli V (2013) Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures. *J Physiol* 591:823-833.
- Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G (2001) Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol* 433:526-549.
- Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC (2005) Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci* 25:10016-10024.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonic active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27:262-269.
- 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. *Eur J Neurosci* 21:1413-1422.
- Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS (2012) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 15:70-80.
- Sims RE, Woodhall GL, Wilson CL, Stanford IM (2008) Functional characterization of GABAergic pallidopallidal and striatopallidal synapses in the rat globus pallidus in vitro. *Eur J Neurosci* 28:2401-2408.
- Sur C, Farrar SJ, Kerby J, Whiting PJ, Atack JR, McKernan RM (1999) Preferential coassembly of alpha4 and delta subunits of the gamma-aminobutyric acidA receptor in rat thalamus. *Mol Pharmacol* 56:110-115.
- Waldvogel HJ, Faull RL (2015) The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. *Adv Pharmacol* 73:223-264.
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I (2003) Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:10650-10661.
- Wojtowicz AM, Dvorzhak A, Semtner M, Grantyn R (2013) Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. *Frontiers in neural circuits* 7:188.

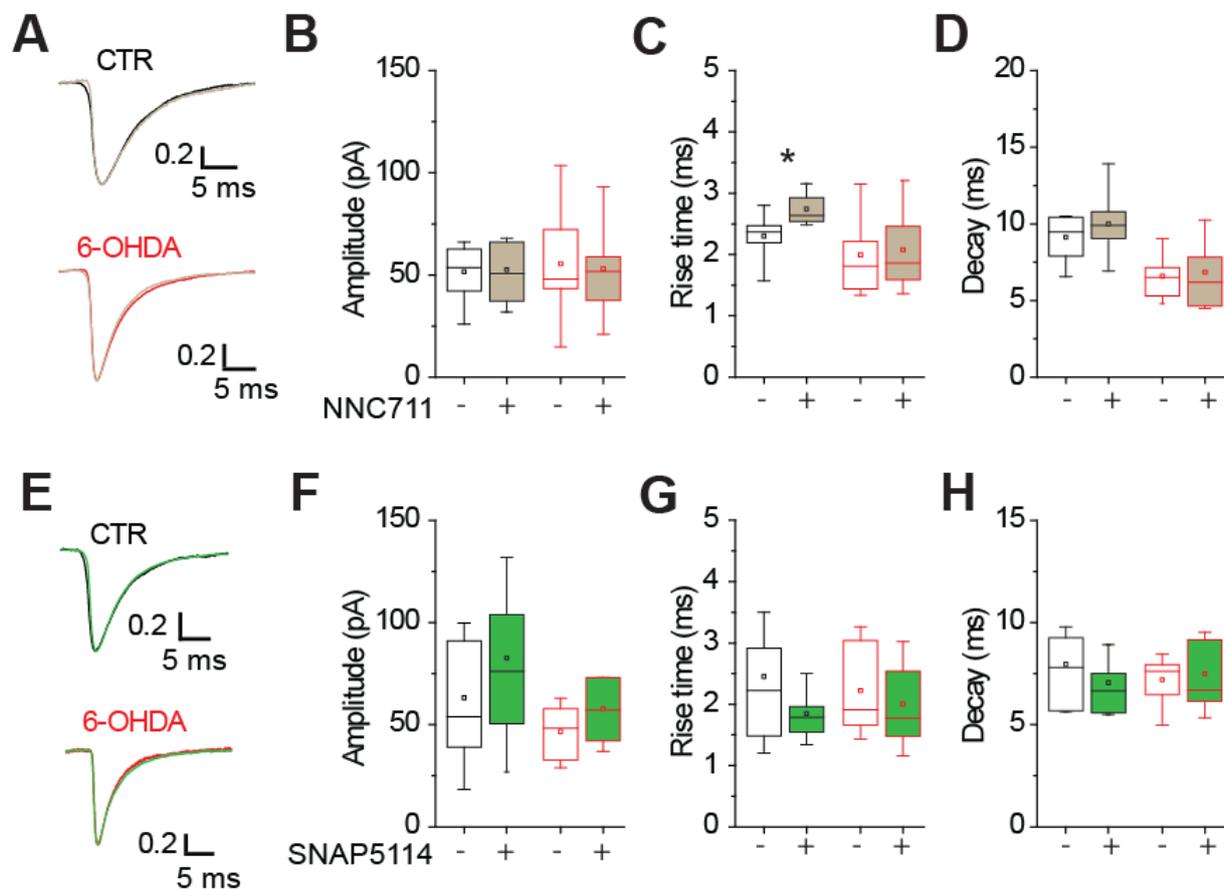
Wu Z, Guo Z, Gearing M, Chen G (2014)
Tonic inhibition in dentate gyrus impairs
long-term potentiation and memory in an
Alzheimer's [corrected] disease model.
Nature communications 5:4159.

SUPPLEMENTAL DATA



Supplemental Figure 1: δ -containing GABAAR do not participate to synaptic GABAAR

A: Superimposed representative traces of GABA_A-mediated spontaneous synaptic currents (IPSCs) obtained under control conditions (black) and in presence of 1 μ M THIP (grey) in wild-type (top traces) and $\delta^{-/-}$ mice (bottom traces). **B-C.** Summary graphs showing the absence of effect of THIP on the IPSC kinetics. **D-F:** Same as A-C but in control and DA-depleted (6-OHDA) rats.



Supplemental Figure 2: The pharmacological blockade of GABA transporters doesn't modify the GABAergic phasic transmission. **A:** Superimposed representative traces of GABA_A-mediated spontaneous synaptic currents (IPSCs) obtained under control conditions (black) and in presence of 50 μM NNC711 (beige) in wild-type (top traces) and 6-OHDA rats (bottom traces). **B-D.** Summary graphs showing the absence of effect of NNC711 on the IPSC kinetics in control and DA-depleted (6-OHDA) rats. **E:** Superimposed representative traces of GABA_A-mediated spontaneous synaptic currents (IPSCs) obtained under control conditions (black) and in presence of 20 μM SNAP5114 (green) in wild-type (top traces) and 6-OHDA rats (bottom traces). **F-H.** Summary graphs showing the absence of effect of SNAP5114 on the IPSC kinetics in control and DA-depleted (6-OHDA) rats.

Données complémentaires à l'article 2:

Résultats complémentaires à l'article 2 :

Dans ce second article en préparation, nous avons montré que l'inhibition tonique pallidale avait pour origine un défaut de recapture du GABA par les transporteurs GAT-3 astrocytaires à cause d'une réduction de leur expression suite à une déplétion dopaminergique. Nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences complémentaires pour essayer de comprendre les mécanismes régulant :

- 1) la fonction des transporteurs GAT-3,
- 2) l'origine neuronale ou gliale du GABA responsable de l'inhibition tonique,
- 3) la modulation de l'IT par la dopamine

I. Régulation de l'expression de GAT-3 à la membrane astrocytaire par la voie TRPA1

Nous avons identifié une réduction des niveaux protéiques de GAT-3 dans le GPe de rats lésés à la 6-OHDA par des expériences de western blots (**article 2, Fig. 6G-H**). Pour conforter ce résultat, nous avons alors réalisé des immunohistochimies utilisant un anticorps dirigé contre la GFAP pour visualiser les astrocytes et un anticorps dirigé contre GAT-3 pour comparer le niveau d'expression de ce transporteur dans le GPe entre des coupes d'animaux contrôles et 6-OHDA. Nos résultats qui sont uniquement qualitatifs, suggèrent une diminution d'expression de GAT-3 chez les animaux déplétés en dopamine ainsi qu'une réduction de la co-localisation de GAT-3 à la surface astrocytaire dans le GPe d'animaux 6-OHDA comparé aux animaux contrôles (**Figure 35**). Ce résultat vient conforter nos expériences de western blots qui montrent une diminution de l'expression de GAT-3 sur les astrocytes en conditions parkinsoniennes.

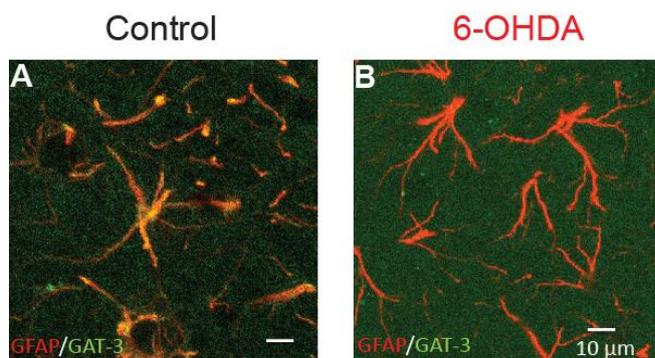


Figure 35 : Réduction de l'expression de GAT-3 dans les astrocytes du GPe après une déplétion en dopamine. Exemple immunohistochimique montrant le marquage de la GFAP (rouge) et du transporteur GAT-3 (vert) dans le GPe de rats contrôle et 6-OHDA. Immunohistochimie révélant une meilleure co-localisation de la GFAP, une protéine exclusivement astrocytaire, et de GAT-3 dans le GPe des animaux contrôles comparée aux animaux 6-OHDA.

Il a été montré récemment au niveau des astrocytes de l'hippocampe que les canaux TRPA1 contrôlent de manière dynamique le cycle d'endocytose-exocytose de GAT-3 à la surface astrocytaire et que leur blocage pharmacologique entraîne un défaut de recapture du GABA (Shigetomi et al, 2012). Nous avons donc testé cette voie de modulation de l'expression membranaire de GAT-3 au niveau du GPe. Nous avons donc décidé de bloquer l'activité des canaux TRPA1 chez les rats témoins avec du Gadolinium (Gd^{3+}), un inhibiteur non spécifique des canaux TRP et avec du HC 030031, un antagoniste spécifique de ces canaux afin de voir l'impact de cette manipulation sur l'inhibition tonique des neurones du GPe. Les résultats que nous avons obtenu montrent que le blocage des canaux TRPA1 par le Gd^{3+} (100 μ M) ou le HC030031 (40 μ M) favorise l'apparition d'une inhibition tonique chez les animaux contrôles (contrôle : $\Delta I = 0$; 0 - 8 pA, (n=23) ; Gd^{3+} $\Delta I = 43,02$; 22,6 - 48,2 pA, (n=6) ; HC030031 ; $\Delta I = 20,75$; 2,4 - 71,4 pA (n=11), Contrôle vs Gd^{3+} ; Contrôle vs HC030031, $p = 0,0006$, Kruskal-Wallis) (Fig. 36A-D).

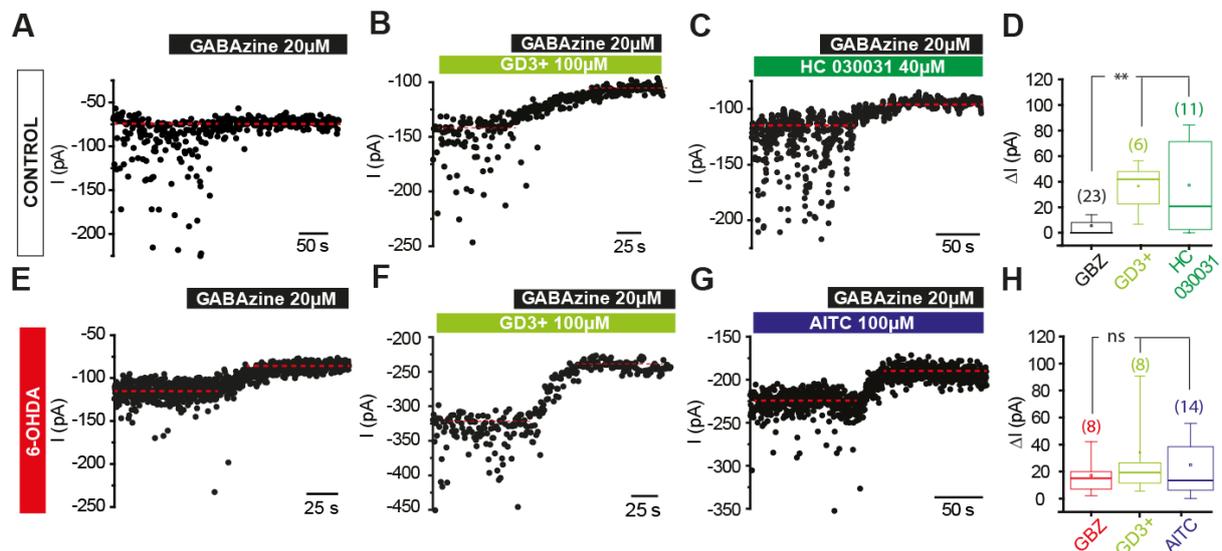


Figure 36 : Modulation de l'inhibition tonique pallidale par les canaux TRPA1.

A-C : Exemple de l'action de la GABAzine sur le courant de maintien des neurones du GPe en condition contrôle (A), après la perfusion de gadolinium (Gd^{3+} 100 μ M, B) ou de HC030031 (40 μ M, C), deux antagonistes des canaux TRPA1. **D :** Boîtes à moustaches montrant l'augmentation significative du courant tonique en présence de Gd^{3+} et de HC030031. **E-G :** Traces montrant que le blocage des canaux TRPA1 par le Gd^{3+} (G) ou leur activation par l'AITC, un agoniste sélectif de ces canaux ne modifie pas l'amplitude du courant tonique chez les animaux 6-OHDA. **H :** Graphe résumant ces données.

Les traces d'électrophysiologie (A-C, E-G) sont filtrées à 2Hz pour avoir une meilleure visualisation des modifications de ligne de base. Les traits pointillés indiquent les valeurs médianes des courants avant et après GABAzine. L'ensemble des enregistrements a été réalisé en présence d'APV (50 μ M), de DNQX (20 μ M) et de CGP55845 (1 μ M) afin de bloquer respectivement la transmission synaptique glutamatergique et les récepteurs GABA_B. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de neurones dans chaque groupe. **, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis.

Ces résultats suggèrent que le blocage des canaux TRPA1 a pour effet de réduire l'exocytose de GAT-3 ce qui a pour conséquence une recapture du GABA moins efficace et l'activation des récepteurs GABA_A extrasynaptiques. Alors que chez les animaux témoins, l'inhibition de TRPA1 induit un courant tonique, le blocage de ces canaux chez des animaux 6-OHDA n'augmente pas de manière significative l'amplitude de l'inhibition tonique (**Fig. 36E-F, H**). Nous avons alors utilisé un agoniste spécifique des canaux TRPA1, l'AITC (100µM) pour tenter de réduire l'inhibition tonique en augmentant la présence de GAT-3 à la membrane des astrocytes. Malheureusement, l'AITC ne permet pas de réduire l'inhibition tonique au niveau des neurones du GPe après une déplétion dopaminergique (6-OHDA : $\Delta I = 15,50; 7 - 20$ pA (n=8) ; AITC : $\Delta I = 16,78; 6,1 - 38,4$ pA (n=14), $p = 0,707$, Mann Whitney test ; **Fig. R2G-H**). Ces résultats suggèrent que l'équilibre entre l'endocytose et l'exocytose de GAT-3 est bien contrôlé par des canaux TRPA1 dans le GPe mais que la manipulation de cette voie de signalisation ne permet pas de réduire les concentrations extracellulaires de GABA par une recapture efficace du neurotransmetteur par les astrocytes.

II. Origine du GABA responsable de l'inhibition tonique dans le GPe

1. Le GABA responsable de l'inhibition tonique dans le GPe n'a pas une origine vésiculaire

Dans le but de discriminer la source de l'IT en conditions parkinsoniennes, nous avons émis l'hypothèse d'une augmentation de la libération de GABA dans l'espace extracellulaire. Cette libération peut être d'origine neuronale ou gliale. Nous avons donc tenté de discriminer les voies de libération de GABA dans le GPe. Après avoir éliminé une augmentation de l'activité des axones striato-pallidaires comme source de libération de GABA responsable de l'IT (**article 2, Fig. 2**), nous avons bloqué toute libération vésiculaire de GABA d'origine neuronale (activité spontanée et miniature) et gliale avec la bafilomycine (4µM), un inhibiteur de l'ATPase de type vacuolaire (ATPase type V). En accord avec des études précédentes (Le Meur et al, 2012; Zhou et al, 2000), nous avons incubé les tranches pendant 1h30 dans une solution d'ACSF contenant 4µM de bafilomycine. Ce traitement entraîne une réduction très importante de la transmission synaptique GABAergique à la fois sur les tranches obtenues d'animaux contrôles et lésés à la 6-OHDA (**Fig. 37A-C, G-I**). Nous avons ensuite testé l'action de la GABAzine sur des neurones traités à la bafilomycine de rats témoins et lésés à la 6-OHDA. Chez les animaux témoins, le traitement à la bafilomycine a pour effet de faire apparaître un courant tonique (contrôle : $\Delta I = 0; 0 - 8$ pA (n=23) ; bafilomycine : ΔI :

14,64; 9,8 - 26,8 pA (n= 12), $p = 0,0018$, Mann-Whitney test ; **Fig. 37D-F**). Chez les animaux 6-OHDA, la bafilomycine produit une augmentation significative de l'amplitude de l'inhibition tonique (6-OHDA : $\Delta I = 15,50$; 7 - 20 pA (n=8) ; bafilomycine $\Delta I = 70,80$; 48,2 - 93,4 pA (n=7), $p = 0,0239$, Mann-Whitney test ; **Fig. 37J-L**). Cette série d'expériences suggère que le GABA responsable de l'IT dans le GPe n'a pas une origine vésiculaire. De plus, nos résultats indiquent que bloquer les ATPase de type vacuolaire a pour effet d'augmenter l'amplitude de l'IT dans le GPe. A notre connaissance, il n'existe pas d'autres exemples dans la littérature d'un tel effet du blocage des ATPase vacuolaire sur l'IT.

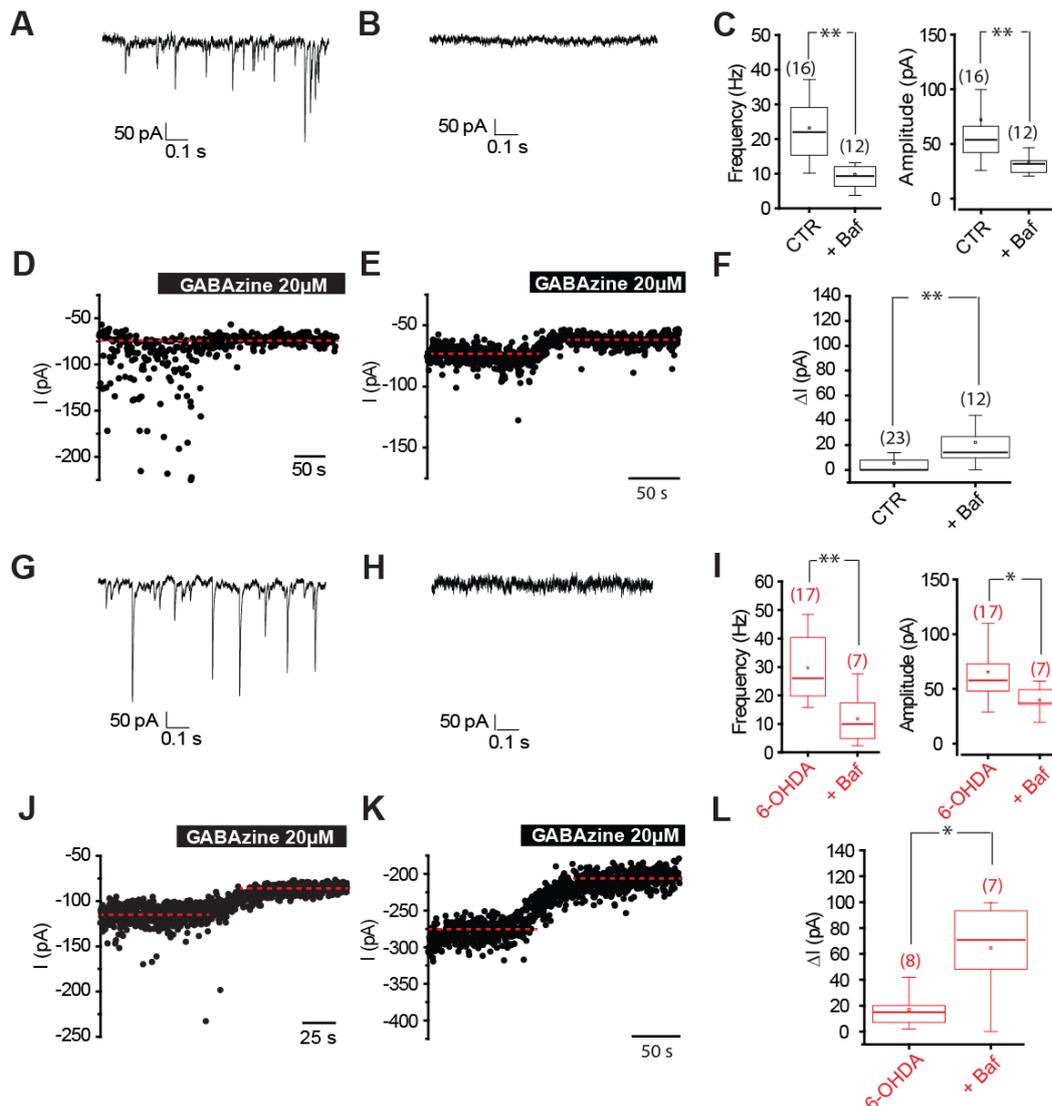


Figure 37 : L'inhibition tonique pallidale n'a pas une origine vésiculaire.

A-B : Exemple de courants synaptiques enregistrés sur des tranches contrôles (A) ou incubées pendant 1h30 dans une solution d'ACSF contenant 4 μ M de bafilomycine (B). **C :** Graphes montrant la réduction drastique de fréquence et d'amplitude des courants synaptiques spontanés en présence de bafilomycine.

D-E : Exemples d'enregistrements montrant l'effet de la GABAzine sur le courant de maintien des neurones du GPe. **F :** Boîtes à moustaches montrant la présence d'un courant tonique suite au traitement à la bafilomycine. **G-L :** Comme A-F, mais chez des rats 6-OHDA. * $p < 0,05$, test de Mann-Whitney.

2. Les bestrophines ne sont pas responsables de la libération gliale de GABA

Nous avons ensuite voulu tester, si comme dans le cervelet (Lee et al, 2010 ; Yoon et al, 2014), le GABA libéré par la glie pouvait avoir une origine non vésiculaire et être libéré par des canaux appelés Bestrophines 1 (BEST-1). Nous avons bloqué les canaux BEST-1 à l'aide du NPPB (50 μ M) appliqué directement dans le bain de perfusion. Alors que dans le cervelet le NPPB réduit de moitié l'amplitude de l'inhibition tonique, au niveau du GPe cet agent pharmacologique augmente de manière surprenante le courant tonique comparé à la situation contrôle (APV 50 μ M, DNQX 20 μ M et CGP55845 1 μ M) chez le groupe d'animaux témoins (contrôle : $\Delta I = 0$; 0 - 8 pA (n=23) ; NPPB : ΔI : 111,08; 56,8 - 136,7 pA (n=5), $p = 0,0003$, test de Mann-Whitney test ; **Fig. 38A-C**). Chez les animaux 6-OHDA, le NPPB a tendance à également augmenter l'amplitude de l'IT mais de manière non significative (6-OHDA : $\Delta I = 15,50$; 7 - 20 pA (n=8) ; NPPB $\Delta I = 40,58$; 9,8 - 81,8 pA (n=6), $p = 0,219$, test de Mann-Whitney test; **Fig. 38B-C**). Ces résultats suggèrent que, dans le GPe, le GABA n'est pas libéré par des canaux bestrophines situés sur les cellules gliales. L'augmentation de l'IT provoquée par le NPPB a aussi été montrée dans le cervelet de façon inexplicable (Diaz et al, 2012), il serait donc nécessaire d'utiliser d'autres agents connus comme inhibiteur de BEST-1 pour confirmer ce résultat.

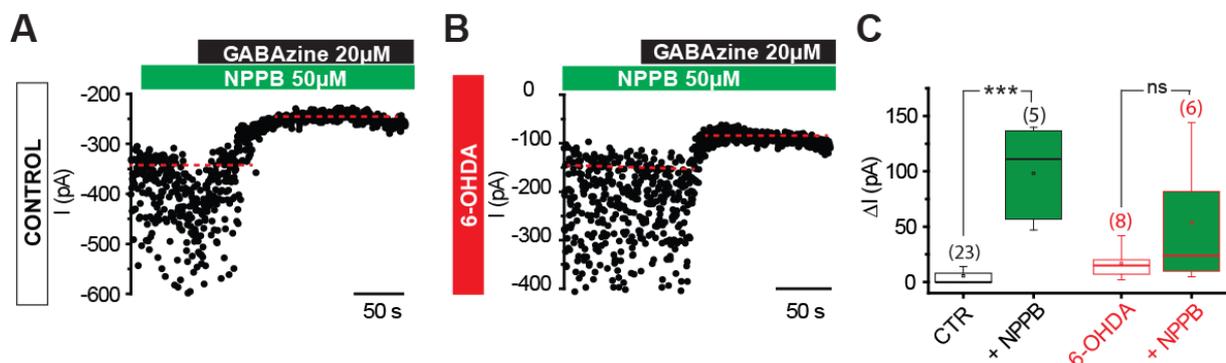


Figure 38 : Les canaux bestrophines ne sont pas responsables de la libération gliale de GABA.

A-B : Tracés montrant l'effet de la GABAzine sur le courant de maintien des neurones du GPe en présence de NPPB (50 μ M), un antagoniste des canaux bestrophines. **C** : Boîtes à moustaches montrant une augmentation significative du courant tonique en présence de NPPB. *, $p < 0.05$, test de Mann-Whitney.

3. La voie des MAOB n'est pas impliquée dans la synthèse de GABA d'origine gliale

Récemment une nouvelle voie de synthèse de GABA astrocytaire a été décrite dans l'hippocampe et le striatum (Jo et al, 2014 ; Yoon et al, 2014). Cette production de GABA par

la glie est dépendante de l'activité de la Monoamine oxydase de type B (MAOB). Dans le but de tester une production de GABA par la glie dépendante de cette voie de synthèse dans le GPe, nous avons incubé les tranches de cerveaux de rats 1h30-2h dans une solution d'ASCF contenant 100 nM de Ségéline, un inhibiteur de la MAOB, avant l'enregistrement des neurones du GPe. Ce traitement n'augmente pas significativement l'amplitude de l'IT chez les animaux témoins (Contrôle : $\Delta I = 0$; $0 - 8$ pA (n=23) ; Ségéline : $\Delta I = 4,27$; $0 - 26,2$ pA (n=7) ; $p = 0,329$, test de Mann-Whitney ; **Fig. 39A-B**) tout comme chez les animaux 6-OHDA (6-OHDA : $\Delta I = 15,50$; $7 - 20$ pA (n=8) ; Ségéline : $\Delta I = 23,19$; $12,8 - 43,9$ pA (n=6), $p = 0,332$, Mann-Whitney ; **Fig. 39C-D**).

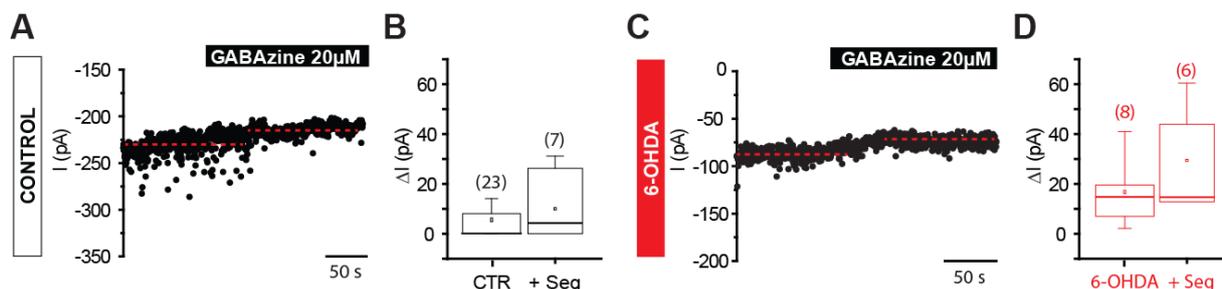


Figure 39 : La voie de la monoamines oxydase B n'est pas impliquée dans la synthèse du GABA responsable de l'inhibition tonique pallidale.

A : Tracés montrant l'effet de la GABAzine sur le courant de maintien des neurones du GPe de tranches contrôles incubées pendant 1h30 à 2h dans 100 nM de ségéline, un antagoniste de l'enzyme MAOB. **B :** Boîtes à moustaches montrant la présence d'un courant tonique malgré le blocage de la voie de synthèse gliale de GABA dépendante des MAOB.

C-D : Comme A-B mais sur des tranches issues de rats 6-OHDA

4. L'intégrité du métabolisme astrocytaire est nécessaire à la régulation de l'inhibition tonique dans le GPe

La densité astrocytaire dans le GPe est très élevée comparée aux autres noyaux des GB (Charron et al, 2014). De plus, il est connu depuis peu qu'il se produit une astrogliose caractérisée par une augmentation du nombre d'astrocytes ainsi que de leur surface dans le GPe en conditions parkinsoniennes chez plusieurs espèces animales comprenant le rat, le singe et l'homme (Charron et al, 2014). Ces données suggèrent une modification du fonctionnement astrocytaire dans le GPe dans la maladie de Parkinson.

Ainsi, nous avons voulu tester l'effet du blocage du métabolisme astrocytaire sur l'inhibition tonique pallidale. Pour cela, nous avons incubé pendant 1h les tranches de cerveaux dans une solution d'ACSF contenant 5 mM de fluoroacétate (FAC), un inhibiteur du cycle de krebs préférentiellement capté par les astrocytes en raison de sa ressemblance chimique avec l'acétate (Clarke et al, 1970 ; Lahiri & Quastel, 1963 ; Waniewski & Martin, 1998) puis enregistré les neurones du GPe en présence de 1mM de FAC dans le bain de perfusion.

Alors que chez les animaux témoins, le FAC ne modifie pas significativement l'amplitude du courant tonique présent en situation contrôle (contrôle : $\Delta I = 0$; $0 - 8$ pA ($n=23$) ; FAC : $\Delta I = 12,81$; $0 - 14$ pA ($n=4$) ; , $p = 0.107$, test de Mann-Whitney) (**Fig. 40A-C**), en situation de déplétion dopaminergique, le blocage du métabolisme astrocytaire augmente significativement l'amplitude du courant tonique (6-OHDA : $\Delta I = 15,50$; $7 - 20$ pA ($n=8$) ; FAC : $\Delta I = 55,84$; $45,8 - 61,6$ pA ($n=4$) , $p = 0,0084$, Mann-Whitney) (**Fig. 40D-F**). Ces résultats suggèrent que chez les animaux lésés à la 6-OHDA, les astrocytes jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie GABAergique.

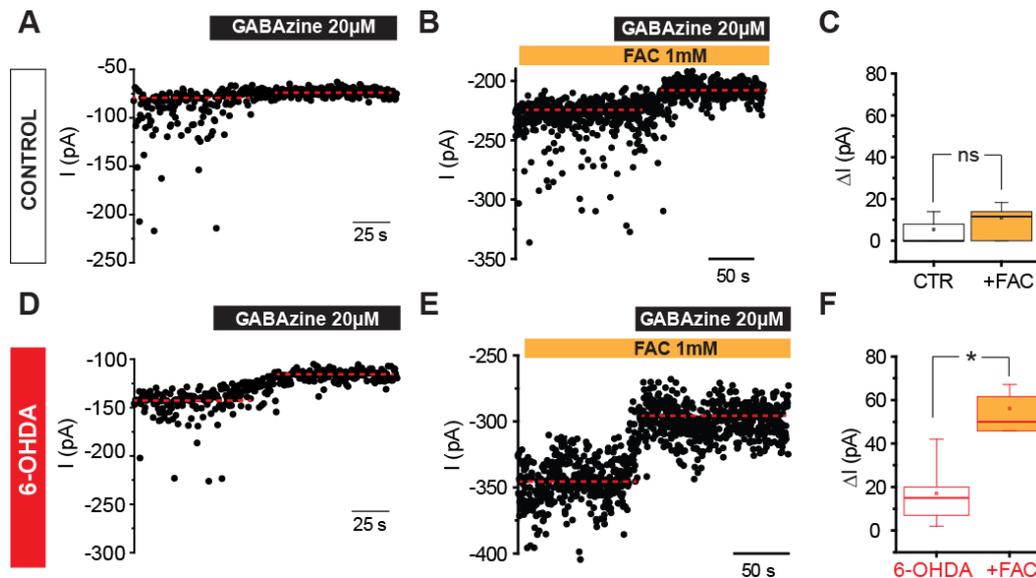


Figure 40 : L'intégrité du métabolisme astrocytaire est nécessaire au contrôle efficace des concentrations de GABA extracellulaire et à la régulation du niveau d'inhibition tonique.

A-B : Tracés montrant l'effet de la GABAzine sur le courant de maintien des neurones du GPe de tranches contrôle (A) et 6-OHDA (B) incubées pendant 1h30 dans 100 nM de ségéline, un antagoniste de l'enzyme MAOB. **C :** Boîtes à moustaches montrant la présence d'un courant tonique malgré le blocage de la voie de synthèse gliale de GABA dépendante des MAOB. * $p < 0.05$, test de Mann-Whitney.

Enfin, nous avons combiné l'inhibition du métabolisme astrocytaire avec le blocage pharmacologique des transporteurs GAT-1 et GAT-3. Nos résultats montrent que l'inhibition de GAT-1, mais pas de GAT-3, augmente significativement l'amplitude du courant tonique induit par le FAC seul chez les animaux témoins (FAC : $\Delta I = 12,81$; $0 - 14$ pA ($n=4$), FAC + NNC : $\Delta I = 104,37$; $78,7 - 127,6$ pA ($n=4$), FAC + SNAP : $\Delta I = 23,19$; $20,1 - 25,6$ pA ($n=5$) ; FAC vs FAC+NNC, $p = 0,018$, Kruskal-Wallis) (**Fig. 41A-D**). Concernant les animaux 6-OHDA, il n'y a aucune différence significative de courant tonique induit par le blocage des transporteurs GAT-1 ou GAT-3 suite au blocage du métabolisme astrocytaire (FAC : $\Delta I = 55,84$; $45,8 - 61,6$ pA ($n=4$); FAC+NNC : $\Delta I = 90,33$; $55,5 - 166$ pA ($n=6$) ; FAC+SNAP : $\Delta I = 58,59$; $53,1 - 81,2$ pA ($n=5$), $p = 0.56$, Kruskal-Wallis) (**Fig. 41D-F**). Ces résultats suggèrent

que chez les animaux témoins, les niveaux extracellulaires de GABA dans le GPe sont principalement contrôlés par les transporteurs GAT-1 alors que chez les rats déplétés en dopamine, les astrocytes jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie GABAergique.

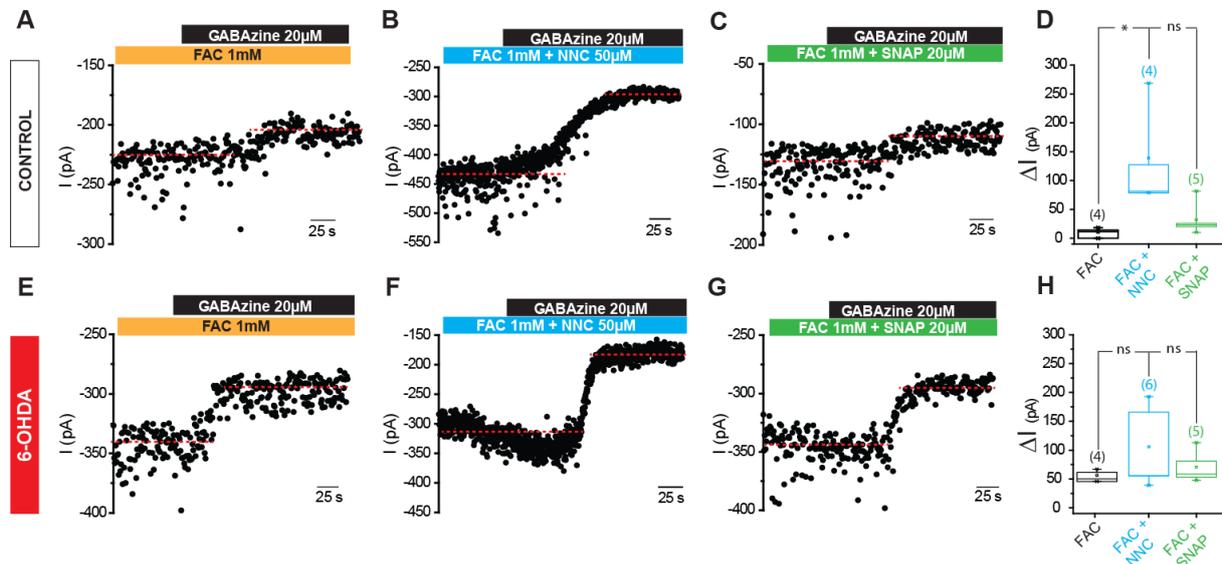


Figure 41 : Le blocage du métabolisme astrocytaire associé au blocage des transporteurs augmente l'amplitude de l'inhibition tonique pallidale.

A-C : Tracés montrant l'effet de la GABAzine sur le courant de maintien des neurones du GPe de tranches incubées dans le FAC 1mM (A), incubées dans FAC puis perfusées avec du NNC711 (B) ou avec du SNAP5114 (C) pour bloquer respectivement les transporteurs GAT-1 ou GAT-3. **D :** Boîtes à moustaches résumant les effets de ces traitements pharmacologiques sur le courant tonique. **E-H :** Comme en A-D, mais sur des tranches de cerveaux de rats 6-OHDA. * $p < 0.05$, test Kruskal-Wallis.

III. Contrôle dopaminergique de l'inhibition tonique pallidale

Dans le réseau des ganglions de la base, l'inhibition tonique a principalement été étudiée dans le striatum. Il a été montré en particulier, que la dopamine module de manière différentielle l'amplitude des courants toniques dans les dMSN et les iMSN. En effet, l'activation des récepteurs D1 augmente l'amplitude de l'IT dans les dMSN alors que les récepteurs D2 la réduisent dans les iMSN (Janssen et al, 2009). Dans le but de savoir si l'inhibition tonique (IT) GABAergique que nous observons dans le GPe des rats suite à une déplétion dopaminergique, est réversible par l'action de la dopamine, nous avons testé l'effet de 10 μ M de dopamine sur les tranches aiguës de cerveau de rats. Suite à l'application de GABAzine, nous avons constaté que l'amplitude du courant tonique est augmentée par l'application de dopamine (10 μ M) mais n'est pas significativement différente de celle

retrouvée chez les rats 6-OHDA (6-OHDA : $\Delta I = 15,50$; 7 - 20 pA (n=8) ; Dopamine : $\Delta I = 29,90$; 26,2 - 97,6 pA (n=3) ; $p = 0,082$, test de Mann Whitney) (**Fig. 42A-B, D**). Les récepteurs dopaminergiques D2 ont une action inhibitrice sur l'IT dans le striatum. Donc dans le but de savoir si l'IT pallidale apparaît de par l'absence d'activation des récepteurs D2 chez les animaux déplétés en dopamine, nous avons utilisé le quinpirole (agoniste spécifique des récepteurs D2) sur nos préparations. Tout comme les résultats précédents, l'amplitude du courant tonique n'est pas significativement différente en présence de quinpirole (2 μ M) de celle présente chez les rats 6-OHDA (6-OHDA $\Delta I = 15,50$; 7 - 20 pA (n=8) ; Quinpirole $\Delta I = 31,12$; 24,4 - 34,8 pA (n=5) ; $p = 0,0504$, Mann Whitney test) (**Fig. 42A-C, D**).

Ces résultats suggèrent que bien que l'IT dans le GPe apparaisse suite à une déplétion dopaminergique, ce phénomène engendre des modifications à long terme ne pouvant pas être reversées par l'application aiguë de dopamine.

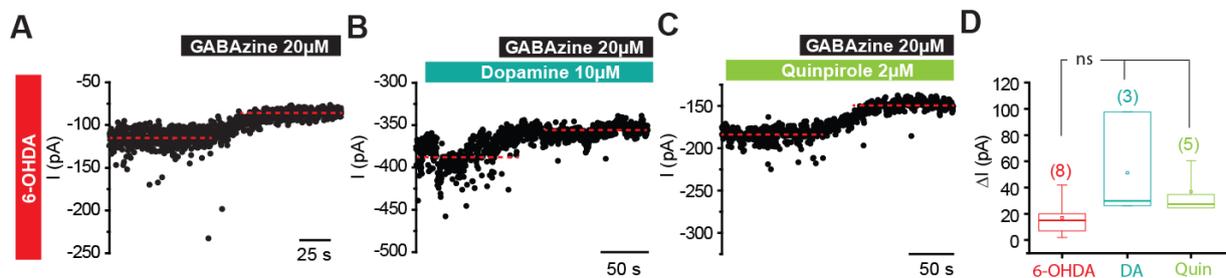


Figure 42 : La dopamine ne réduit pas l'inhibition tonique pallidale.

A-C : Tracés montrant l'effet de la GABAzine sur le courant de maintien des neurones du GPe de tranches contrôle (A), en présence de dopamine (10 μ M, B) et en présence de quinpirole (2 μ M, C), un agoniste sélectif des récepteurs dopaminergiques de la famille D2. **D** : Boîtes à moustaches montrant que ni la dopamine, ni le quinpirole ne réduisent l'amplitude du courant tonique chez les rats 6-OHDA. * $p < 0,05$, test Kruskal-Wallis.

Pour conclure, nous avons donc testé plusieurs pistes, 1) pour comprendre l'origine du GABA responsable de l'inhibition tonique pallidale, et 2) pour tenter de réduire cette IT, sans succès cependant pour le moment.

Ces résultats préliminaires suggèrent que les astrocytes jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'inhibition tonique en particulier en conditions parkinsoniennes où ils semblent dysfonctionner mais de futures expériences restent à réaliser pour rechercher plus en détails la nature de ces dysfonctionnements dans la MP.

Discussion des résultats complémentaires:

I. Régulation de l'expression membranaire de GAT-3

Il est connu que le niveau d'expression de GAT-3 à la membrane plasmique des astrocytes est dynamique et régulé par les variations de calcium intracellulaire impliquant les canaux TRPA1. Ce mécanisme du contrôle de l'exocytose à la membrane plasmique de GAT-3 a été mis en évidence dans l'hippocampe (Shigetomi et al, 2012). De plus, il est connu que dans le STR et le GPe se produit une astrogliose au cours de la MP suggérant une modification du fonctionnement astrocytaire induite par une déplétion dopaminergique.

Nous avons dès lors réalisé des immunohistochimies où les astrocytes sont visualisables en rouge grâce au marquage de la GFAP (Glial fibrillary acidic protein), une protéine uniquement astrocytaire, et GAT-3 en vert. Nous pouvons remarquer une diminution de la co-localisation de GAT-3 à la surface astrocytaire dans le GPe d'animaux 6-OHDA en comparaison aux animaux contrôles (**Figure 35**). Ce résultat suggère une diminution de l'expression de GAT-3 sur les astrocytes en conditions parkinsoniennes. Ce résultat bien qu'uniquement qualitatif vient conforter nos expériences de western blots. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au rôle des astrocytes dans la régulation de la concentration de GABA extracellulaire ($[GABA]_{ext}$) au niveau du GPe. Nous avons ainsi réalisé des expériences d'inhibition du métabolisme glial avec le Fluoroacetate (FAC) (**Figure 40-41**). Cette manipulation met en évidence une IT en situation contrôle ce qui confirme le rôle critique de la glie dans la régulation des $[GABA]_{ext}$ et de l'IT dans le GPe (**Figure 40**). Chez les animaux 6-OHDA, le blocage des astrocytes entraîne une IT d'une amplitude très importante notamment quand le FAC est associé au blocage des transporteurs du GABA (**Figure 41**). Contrairement à l'hippocampe où il a été montré que le FAC prévient l'IT en inhibant la libération de D-serine (Zhang et al, 2008), nos expériences révèlent que dans le GPe, l'utilisation du FAC augmente les $[GABA]_{ext}$ engendrées par le blocage des transporteurs GATs. Ces résultats suggèrent que le blocage du métabolisme glial ne prévient pas l'excès de GABA présent en conditions parkinsoniennes mais qu'à l'inverse, la glie participe activement à limiter l'excès de GABA au niveau du GPe en conditions physiopathologiques. Ces résultats montrent le rôle primordial de la glie dans le contrôle de l'homéostasie GABAergique pallidale. Bien qu'étant spécifique du blocage du métabolisme

astrocytaire et ayant peu d'effets sur les neurones, le FAC va entraîner un arrêt de la production d'ATP par les astrocytes ce qui peut changer leur fonctionnement et l'environnement neuronal. Il a notamment été montré que l'exocytose d'ATP en provenance des astrocytes modulait l'inhibition GABAergique phasique et tonique dans le cortex (Lalo et al). De plus, l'ATP peut moduler les vagues Ca²⁺ astrocytaires (Bowser & Khakh, 2007) qui peuvent jouer sur l'expression des transporteurs GAT-3 à la surface membranaire. Ces éléments laissent à penser que le FAC peut produire des effets indirects sur l'IT en affectant le fonctionnement astrocytaire. C'est pourquoi, nous avons voulu impacter spécifiquement l'expression de GAT-3 à la surface astrocytaire par la modulation de l'activité des canaux TRPA1 astrocytaires avec le GD³⁺ et le HC 030031, des antagonistes de ces canaux, et l'AITC, un agoniste des canaux TRPA1 (**Figure 36**). L'application de GD³⁺ et HC 030031 entraîne l'apparition d'une IT chez les animaux contrôles suggérant que les canaux TRPA1 sont bien impliqués dans la régulation de l'expression de GAT-3 et de fait dans la régulation des [GABA]_{ext}. Chez les animaux 6-OHDA, l'application de GD³⁺ et AITC ne modifie pas significativement l'amplitude de l'IT présente dans le GPe (**Figure 36**). Ces résultats suggèrent que les canaux TRPA1 sont bien responsables de l'expression membranaire de GAT-3 comme ce qui a été démontré dans l'hippocampe (Shigetomi et al, 2012). En revanche, la réduction d'expression de GAT-3 à la surface astrocytaire chez les animaux 6-OHDA ne semble pas être la conséquence d'un défaut d'exocytose du transporteur mais plutôt d'une réduction de l'expression du transporteur GAT-3.

II. Origine du GABA responsable de l'inhibition tonique dans le GPe:

1. Production et libération gliale de GABA :

Les astrocytes peuvent directement influencer l'activité neuronale par la libération de neurotransmetteurs variés et notamment de GABA. Nous avons donc voulu tester si l'excès de GABA extracellulaire dans le GPe pouvait être la conséquence d'une libération de GABA d'origine gliale.

Il existe trois modes de libération de GABA d'origine gliale :

- 1. Vésiculaire
- 2. Non vésiculaire :
- 3. Due au fonctionnement inversé des transporteurs du GABA.

Nous pouvons exclure l'hypothèse d'un fonctionnement en mode inversé de GAT-3, puisque si cela avait été le cas, nos expériences d'électrophysiologie visant à bloquer pharmacologiquement ces transporteurs auraient réduit l'amplitude du courant tonique présent dans le GPe d'animaux lésés à la 6-OHDA.

Afin de bloquer toute libération de GABA vésiculaire, nous avons incubé les tranches 1h30 avec de la bafilomycine (4 μ M) comme dans les expériences réalisées par d'autres auteurs dans l'hippocampe (Le Meur et al, 2012) afin de mettre en évidence une libération de GABA astrocytaire. La bafilomycine en bloquant l'ATPase à protons H⁺ (neuronale et gliale) va empêcher l'entrée des neurotransmetteurs dans les vésicules de libération synaptiques. Il semble que ce traitement ait fonctionné, puisque nous avons observé une réduction significative de la fréquence et de l'amplitude des IPSCs. Cependant, nous avons aussi observé que la bafilomycine avait provoqué l'apparition d'une IT chez les animaux témoins et une augmentation significative de l'IT chez les animaux 6-OHDA (**Figure 37**). Nous n'avons trouvé aucun résultat similaire dans la littérature permettant d'expliquer cet effet stimulant de la bafilomycine sur l'IT dans le GPe.

Le GABA astrocytaire peut être libéré par des canaux appelés Bestrophines présents sur la glie. Des expériences réalisées dans l'hippocampe (Jo et al, 2014) et le cervelet (Lee et al, 2010 ; Yoon et al, 2014) montrent que le blocage des canaux bestrophines réduit l'amplitude du courant tonique dans ces régions où se produit une libération de GABA par des astrocytes réactifs en conditions pathologiques. Les auteurs ont observés également que le GABA libéré par les astrocytes est produit par une voie de biosynthèse du GABA dépendante de l'activité enzymatique de la MAOB. Nous avons donc testé ces deux hypothèses d'une part en appliquant du NPPB (50 μ M) de manière aiguë sur nos tranches de cerveau de rats afin de bloquer une potentielle libération de GABA par des canaux bestrophines dans le GPe (**Figure 38**) et d'autre part en incubant les tranches dans la séléginine afin de bloquer la voie de biosynthèse du GABA dépendante de la MAOB (**Figure 39**). Nous avons observé que l'application de NPPB entraîne l'apparition d'une IT chez les animaux témoins et une augmentation significative de l'IT chez les animaux 6-OHDA (**Figure 38**). L'altération de la transmission GABAergique par le NPPB a également été montrée dans le cervelet où l'amplitude du courant tonique et le temps de décroissance des IPSCs sont augmentés par cette drogue (Diaz et al, 2012). Même s'il n'y a pas d'explication fonctionnelle à l'heure actuelle, il serait possible que le NPPB potentialise la transmission GABAergique par d'autres actions que le blocage des bestrophines ce qui pourrait expliquer l'augmentation du courant tonique que nous observons suite à son utilisation. Le résultat de cette expérience suggère que le GABA extracellulaire présent en excès dans le GPe

d'animaux déplétés en dopamine ne provient pas d'une libération par les canaux Bestrophines.

Nous n'avons pas non plus observé de différence significative entre l'amplitude du courant tonique présent sur les tranches incubées dans la séléginine et celles non traitées. Ces expériences montrent que le GABA d'origine gliale dans le GPe n'implique pas la voie de biosynthèse dépendant de l'activité enzymatique de la MAOB. (**Figure 39**).

III. Dopamine et inhibition tonique :

Il a été montré en particulier dans le striatum, que la dopamine module de manière différentielle l'amplitude des courants toniques dans les D1-MSN et les D2-MSN. En effet, l'activation des récepteurs D1 augmente l'amplitude de l'IT dans les MSN de la voie directe alors que les récepteurs D2 la réduisent dans les MSN de la voie indirecte (Janssen et al, 2009). Comme l'IT apparaît dans le GPe suite à une lésion du système dopaminergique, nous avons voulu tester si cette inhibition pouvait être reversée par l'ajout de dopamine sur nos préparations. Nous avons constaté que l'amplitude du courant tonique est augmentée par l'application de dopamine (10 μ M) mais n'est pas significativement différente de celle retrouvée chez les rats 6-OHDA (**Figure 42A-B,D**). Les récepteurs dopaminergiques D2 ont une action inhibitrice sur l'IT dans le striatum (Janssen et al, 2009). Dans le but de savoir si l'IT pallidale apparaît en raison de l'absence d'activation des récepteurs D2 chez les animaux déplétés en dopamine, nous avons testé l'action du quinpirole (agoniste spécifique des récepteurs D2) sur l'IT. Tout comme pour la dopamine, l'amplitude du courant tonique n'est pas significativement différente en absence et en présence de quinpirole (2 μ M) chez les rats 6-OHDA (**Figure 42A-C, D**). Ces résultats suggèrent que, bien que l'IT dans le GPe apparaisse suite à une déplétion dopaminergique, ce phénomène engendre des modifications à long terme ne pouvant pas être reversées pas l'application aigüe de dopamine, ni d'agoniste D2. Néanmoins, il serait intéressant de savoir si une administration répétée de L-DOPA chez le rat lésé à la 6-OHDA pourrait prévenir l'apparition de l'IT pallidale. Si ce phénomène n'est cependant pas corrigé par l'administration de L-DOPA, ni par des agonistes des récepteurs D2 classiquement attribués au traitement de la MP, il serait possible que l'IT soit une adaptation du GPe aux changements d'activité du réseau, notamment pour contrebalancer l'hyperactivité des neurones du NST. En effet, les entrées cortico-sous-thalamiques ajustent l'activité du réseau NST-GPe par une action sur les récepteurs NMDA situés dans le NST (Chu et al, 2015). Suite à la perte de dopamine, l'activation excessive des récepteurs NMDA par les entrées corticales augmente l'excitation du NST sur le GPe contribuant à l'émergence d'une activité corrélée pathologique entre ces deux noyaux. Ce mécanisme conduirait à une augmentation du nombre de synapses

fonctionnelles GPe-NST, donnant lieu à une augmentation des entrées inhibitrices GPe-NST (Chu et al, 2015). Ce phénomène n'est pas reversé par l'ajout de dopamine dans le système. Il a donc été suggéré que ce mécanisme adaptatif serait présent pour compenser l'hyperactivité des neurones du NST (Fan et al, 2012). De la même façon, nous pouvons donc nous demander si l'IT ne se développe pas en réponse à un excès d'excitation en provenance du NST. Ainsi, il est envisageable que des mécanismes homéostatiques se mettent en place pour tenter de compenser cette excitation excessive. Pour répondre spécifiquement à cette question, il serait possible de réaliser des expériences sur des animaux ayant subi une lésion dopaminergique combinée avec une lésion du NST. Si l'IT disparaît dans le GPe chez ces animaux, cela signifierait que l'IT pallidale est un phénomène compensatoire que les traitements à la L-DOPA ne peuvent à priori pas corriger.

Résultats II :

Modification de la transmission GABAergique au niveau
du GPe dans la maladie de Huntington.

Article 3

**Early GABAergic transmission defects in the external
globus pallidus and rest/activity rhythm alteration in a
mouse model of Huntington's disease**

Soumis au journal "Neuroscience"

Early GABAergic transmission defects in the external globus pallidus and rest/activity rhythm alteration in a mouse model of Huntington's disease

Zhuowei DU^{1,2}, Marine CHAZALON^{3,4}, Emma BESTAVEN^{1,2}, Thierry LESTE-LASSERRE^{5,6}, Jérôme BAUFRETON^{3,4}, Jean-René CAZALETS^{1,2}, Yoon H. CHO^{1,2}, Maurice GARRET^{1,2, a}

¹Univ. Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France

² CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33000 Bordeaux, France

³ Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux

⁴CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

⁵INSERM, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, U862, F-33000 Bordeaux, France

⁶University of Bordeaux, Neurocentre Magendie, Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, U862, F-33000 Bordeaux, France

^a corresponding author: Maurice Garret, CNRS UMR 5287, Université de Bordeaux, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. Tel. (33)557571686 Fax. (33)556901421 Email : maurice.garret@u-bordeaux.fr

Abstract

Huntington's disease (HD) is characterized by progressive motor symptoms preceded by cognitive deficits and is regarded as a disorder that primarily affects the basal ganglia. The external globus pallidus (GPe) has a central role in the basal ganglia, projects directly to the cortex, and is majorly modulated by GABA. To gain a better understanding of the time course of HD progression and gain insight into the underlying mechanisms, we analysed GABAergic neurotransmission in the GPe of the R6/1 mouse model at pre- and post-symptomatic stages (i.e., 2 and 6 months). Western blot and quantitative PCR analyses revealed alterations in the GPe of male R6/1 mice compared with wild type littermates. Expression of proteins involved in pre- and post-synaptic GABAergic compartments as well as synapse number were severely decreased at 2 and 6 months. At both ages, patch clamp electrophysiological recordings showed a decrease of spontaneous and miniature inhibitory post-synaptic currents suggesting that Huntington's disease mutation has an early effect on the GABA signalling in the brain. Therefore, we performed continuous locomotor activity recordings from 2 to 4 months of age. Actigraphy analyses revealed rest/activity fragmentation alterations that parallel GABAergic system impairment at 2 months, while the locomotor deficit is evident only at 3 months in R6/1 mice. Our results reveal early deficits in Huntington's disease and support the growing number of evidence showing a critical role for the GPe in physiological and pathophysiological states. We suggest that actimetry may be used as a non-invasive tool to monitor early disease progression.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disease characterized by a progressive decline of motor abilities, cognitive functions, and sleep/wake regulation. Some post-mortem studies in human have shown only limited signs of cell loss in the brain, despite overt clinical symptoms of HD (Caramins et al, 2003; Mizuno et al, 2000), suggesting that neuronal and synaptic dysfunction, rather than cell death, may underlie early behavioural manifestations of the HD mutation (Cayzac et al, 2011; Morton, 2013).

HD is caused by a dominant mutation of the gene that encodes the huntingtin protein. The expression of the huntingtin protein is ubiquitous, and the mutation affects virtually all brain structures. Alterations are most obvious in the striatum, which is the focus of the majority of studies (Cayzac et al, 2011; Francelle et al, 2014). The striatum is the main input nucleus of the basal ganglia which is involved in cognitive and motivational functions in addition to motor control through direct- and indirect-pathways (Tepper et al, 2007). Tightly connected to the striatum in the indirect pathway, the external globus pallidus (GPe) is considered as a GABAergic hub within the basal ganglia (Abdi et al, 2015). It receives GABAergic collaterals from the direct pathway (Cazorla et al, 2014), glutamatergic projections from the subthalamic nucleus, and some dopaminergic inputs from the substantia nigra pars compacta (Gittis et al, 2014). The efferent of the GPe virtually projects to all of the basal ganglia components, including the striatum (Mallet et al, 2012). Interestingly, direct GABAergic connections with the cortex have been recently described (Chen et al, 2015a; Saunders et al, 2015a). Therefore, the GPe may play an integrative role coordinating neuronal activity across the basal ganglia with direct links with the cortex. Moreover, the GPe is overactive in HD (Reiner, 2004), and GPe deep brain stimulation experiments

have been shown to circumvent motor and cognitive dysfunctions in human patients and a rat model of HD (Beste et al, 2015; Ligot et al, 2011; Nagel et al, 2015; Temel et al, 2006).

HD progression and symptoms are recapitulated in transgenic mouse models (Pouladi et al, 2013) such as the R6/1 mouse line that is widely used because of adult onset, slow disease progression and early cognitive deficits beginning at 3 months of age followed by later motor impairments (Crook & Housman, 2011; Lebreton et al, 2015; Milnerwood et al, 2006; Pang et al, 2009). Moreover, various genome-wide gene expression analyses in the striatum of human and mouse models have shown that a number of differentially expressed genes are involved in neurotransmission, including GABAergic signalling (Kuhn et al, 2007; Seredenina & Luthi-Carter, 2012). GABAergic pathways dominate information processing in most areas of the basal ganglia (Galvan & Wichmann, 2007). Diversity in GABAergic signalling is due to several pre- and post-synaptic factors and GABA handling in and around the synapse (Buddhala et al, 2009; Mortensen et al, 2011). However, although alteration of this system is linked to several neurological and neurodevelopmental disorders (Braat & Kooy, 2015; Luscher et al, 2011; Rudolph & Mohler, 2013), GABAergic signalling alteration in HD at the molecular level and outside the striatum is essentially unknown (Cepeda et al, 2013).

Therefore, we analysed the extent of GABAergic system alterations in the R6/1 mouse model at 2 months of age when the animals are defined as asymptomatic and at 4 or 6 months when they are symptomatic. The expression of genes involved in GABAergic signalling as well as inhibitory synaptic transmission were analysed in the GPe. We found dramatic changes in the pallidal GABAergic inhibition already in 2-month-old R6/1 mice. Then, to correlate these early changes with HD symptoms, we continuously monitored mice in their home cages from 2 to 4 months of age. We show

that while locomotor activity is not affected at 2 months, the rest/activity rhythm is already altered at this young age. Taken together, we show that alteration of the GABAergic system and rest/activity pattern are early markers of HD, and suggest that they could be associated with sleep and cognitive disorders that appear before the onset of motor symptoms.

Methods

Male R6/1 transgenic mice and the age-matched male wild type littermates were used in the experiments. They were from the crossbreeding of male R6/1 (C57/BL6 background) and female C57/BL6 mice. This R6/1 line expresses exon 1 of human huntingtin gene with an expanded 116-126 CAG trinucleotide repeats. All animals were genotyped by PCR with DNA extracted from tail specimens. The animals were housed with 12-12 hour light-dark cycle (light on at 8 a.m.) and unlimited food/water access.

Electrophysiology

Slice preparation Twenty four mice were used for the electrophysiological recordings. Animals were anaesthetized with ketamine/xylazine and perfused transcardially with ice-cold modified artificial cerebrospinal fluid (ACSF), equilibrated with 95% O₂-5% CO₂, containing (in mM): 230 sucrose, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 10 MgSO₄, and 10 glucose. The brain was removed, submerged in ice-cold modified ACSF and sectioned into 350 μm thick slices with a vibratome (VT1200S; Leica Microsystems, Germany) in the parasagittal plane. Slices containing GPe were then stored in ACSF equilibrated with 95% O₂-5% CO₂, and containing (in mM): 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄ and 10 glucose.

Whole-cell voltage-clamp recordings Single slices were transferred to a recording chamber, which was perfused continuously with modified ACSF heated to 32-34°C,

equilibrated with 95% O₂-5% CO₂, and containing (in mM): 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.6 CaCl₂, 1.5 MgSO₄ and 10 glucose. GPe neurons were visualized with infrared gradient contrast video microscopy (Eclipse workstation; Nikon, Japan) and a x63 water-immersion objective (E600FN, Nikon, Japan). Somatic patch clamp recordings were made using pipettes (impedance, 3-7 MΩ) prepared from borosilicate glass capillaries (G150-4; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) with a micropipette puller (P-97; Sutter Instruments, Novato, CA, USA) and were filled with CsCl-based internal solution (in mM): 135 CsCl, 3.6 NaCl, 1 MgCl₂, 10 Hepes, 0.1 EGTA, 0.4 Na₂GTP, and 2 Mg_{1.5}ATP, 2 QX-314 (pH 7.2, 294 mosmol l⁻¹) for the recording of miniatures and spontaneous IPSCs in voltage clamp mode.

Data were recorded using a Multiclamp 700B amplifier controlled by Clampex 9.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Signals were digitized at 20 kHz and low-pass filtered at 6 kHz, respectively. Junction potential of CsCl-based internal solution filled electrodes was of 4 mV and was not corrected. Miniatures and spontaneous IPSCs were recorded at a holding potential of -60 mV. Series resistance was monitored by a step of -5 mV every 50 s. Data were discarded when the series resistance increased by >20%. Control (25.4 ± 1.10 MΩ, n= 61) and R6/1 (25.6 ± 2.53 MΩ, n= 61) groups of recordings had similar values for series resistances (P > 0.05; Mann-Whitney U-test). Recordings were performed in the presence of 1 μM (2S)-3-[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl(phenylmethyl)phosphinic acid (CGP55845; Tocris Bioscience, Bristol, UK), 50 μM d(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV; Ascent Scientific, Cambridge, UK), 20 μM 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX; Ascent Scientific) to block GABA_B, NMDA and AMPA/kainate receptors, respectively. Miniatures IPSCs recordings were performed in the presence of 0.5-1 μM of tetrodotoxin (TTX, Ascent Scientific). In

some recordings, 20 μ M 4-[6-imino-3-(4-methoxyphenyl)pyridazin-1-yl]butanoic acid hydrobromide (GABA_Azine/SR-95531) was applied to confirm that the remaining synaptic events were indeed sensitive to a selective GABA_AR antagonist. Recordings and analyses of the data were done blind to the genotype of mice. IPSCs were detected and analysed off-line with the in-house software MiniDetection.

Western blot

350 μ m acute slices from 3 to 4 animals of the same age and genotype were prepared as described above to dissect out and pool the GPe under a Nikon SMZ800 bright field microscope with SCHOTT KL1500 LCD illuminator. The RIPA buffer (Sigma-Aldrich, R0278) with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, 11836153001) was used for protein extraction at a ratio of 20 μ L per milligram of tissue. The brain tissues were disrupted and homogenized by a sonicator (Ultrasons, Annemasse, France) on ice. The homogenates were centrifuged (1-15k, Sigma) at 13000 rpm for 30 minutes at 4 °C. The supernatants were collected as the total cell lysates. Protein concentration was measured with RC DC™ protein assay kit (BIO-RAD) according to manufacturer instructions. Samples were divided into 15 μ g protein aliquots and kept frozen until used. Samples were supplemented with loading buffer, proteins were separated on SDS-PAGE and revealed by Western blotting using specific antibodies (see below), and analysed as described (Chaumont et al, 2013).

Antibodies. See supplementary table 1

Quantitative real-time PCR (q-PCR)

Globus pallidus tissue samples were homogenized in Tri-reagent (Euromedex, France) and RNA was isolated using a standard chloroform/isopropanol protocol (Chomczynski & Sacchi, 1987). RNA was processed and analysed following an adaptation of published methods (Bustin et al, 2009). cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using RevertAid Premium

Reverse Transcriptase (Fermentas) and primed with oligo-dT primers (Fermentas) and random primers (Fermentas). q-PCR was performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Meylan, France). qPCR reactions were done in duplicate for each sample, using transcript-specific primers, cDNA (4 ng) and LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) in a final volume of 10 μ L. The PCR data were exported and analyzed in an informatics tool (Gene Expression Analysis Software Environment) developed at the NeuroCentre Magendie. For the determination of the reference gene, the Genorm method was used (Bustin et al, 2009). We analyzed multiple reference genes for normalization of the qPCR data: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), actin-beta (Actb), hydroxymethylbilane synthase (Hbms), ribosomal protein L13a (Rpl13a), succinate dehydrogenase complex, subunit A (Sdha), ubiquitin C (Ubc), tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta (Ywhaz), eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (Eef1a1), peptidylprolyl isomerase A (Ppia), tubulin, alpha 4a (Tuba4a), non-POU domain containing, octamer-binding (Nono), glucuronidase, beta (Gusb). Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against Gapdh and Ppia genes that were the most stably expressed. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (Livak & Schmittgen, 2001). Primer sequences are reported in supplementary table 2.

Immunohistochemistry

350 μ m thick-slices prepared as described for electrophysiology were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes and processed into 16 μ m-thick sections collected on gelatin-coated slides as described (Moragues et al, 2002; Schneider Gasser et al, 2006). For synapse quantification in the GPe, all 350 μ m thick-slices containing the GPe of one animal (4-5

slices) were collected. The slices from the same hemisphere were cut in order into 16 μm thick sections on gelatin coated slides, one section each slide (60-80 sections for one hemisphere). All the sections were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used. One slide every 10 were chosen for multiple-labelling of the presynaptic protein Vgat, postsynaptic α_1 GABA_AR subunit. Counts were carried out on brains obtained from 3 mice for each age and each genotype.

After 1 hour incubation in blocking solution containing phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, 4% donkey serum and 0.3% Triton X-100 (Sigma), slides were incubated overnight at room temperature in primary antibodies (supplementary Table 1) diluted with the blocking solution. They were then rinsed in PBS and incubated for one hour in blocking solution containing a cocktail of secondary antibodies conjugated to fluorescent probes (Alexa-488, -568, or -647-conjugated donkey anti-mouse, -rabbit, -guinea pig, or goat antibody; Jackson Immunoresearch). Sections were washed and coverslipped. Observation and acquisition were performed with Leica DM6000B microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with a Qimaging RETIGA EXI camera. The confocal microscope was a Leica SP8 WLL2 on an upright stand DM6000, using objective HCX Plan Apo CS2 63X oil NA 1.40. The confocal microscope was equipped with a white light laser 2 (WLL2) with freely tunable excitation from 470 to 670 nm (1 nm steps). The scanning was done using either a conventional scanner (10Hz to 1800 Hz) or a resonant scanner (8000Hz). The microscope was composed of 2 internal PMT, 2 internal hybrid detectors and 1external PMT for transmission. For the quantification of synapses in the GPe, the mosaic scanning mode was chosen. The image stacks were made of 5 images spaced 0.29 μm in depth. To increase acquisition speed and sensitivity, the resonant scanning mode was used with two hybrid detection system and the 488 nm and 647 nm fluorescent probes were scanned the same time as there is no

over-lap with these two channels. The stitched mosaic images were deconvolved with "Huygens professional" (Scientific Volume Imaging, The Netherlands) and analysed with "Imaris" (Bitplane scientific software, Switzerland). The quantification of synapses was performed as described before (Fogarty et al, 2013). During the analysis, "Spots detection" was used with "Estimated Diameter" at 0.5 μm (estimated diameter of synaptic compartment). In order to normalize different slides and make comparison between wild-type and R6/1 mice, a fixed percentage of intensity median was applied to all of the images. When both of the pre- and post-synaptic "spots" were calculated, the function of "colocalize spots" was applied to quantify the number of colocalized particle pairs. The distance of particles from two different channels was set at less than 0.5 μm (estimated distance between pre- and post- synaptic regions) from the centers. These colocalized particle pairs were considered as synapses. All mosaic stacks from the same brain were used to calculate the average density of synapses by the equation: $D = (\sum N_i) / (d * \sum S_i)$. D is the average density; N_i is the number of synapses from each mosaic stack; d is the depth of each stack; S_i is the area of the GPe on each mosaic stack.

Motion capture

Passive retro-reflective markers (diameter 7.9mm, weight <0.5g; B&L Engineering, Santa Ana, CA) were attached to each mouse that was single-housed in their home cage. Acquisition (5 Hz frequency) was performed using three OptiTrack Flex3 cameras (Natural Point, Corvallis, OR) allowing to continuously record the position of each animal during dark and light phases. Acquisition and automated tracking software were obtained from MouvTech (Bayonne, France). Throughout the study, had unrestricted access to water and food, and were subjected to a daytime-night cycle of 12 h / 12 h.

Off-line analysis was performed using homemade software developed with Matlab

(Mathworks, Natick, MA). Activity/rest analysis from actigraphy data was performed using the MotionWare software (Cambridge Neurotechnology, Cambridge, UK) that applies existing published algorithms for actigraphy data measurements. The variables of interest included the fragmentation index (FI) which is an indication of the degree of fragmentation of the sleep period (Cosin et al, 2014). Furthermore, we also used the function of Non-Parametric Circadian Rhythm Analysis (NPCRA) which is included in the MotionWare software to analyse full-days of data over several days.

Statistical analyses

All data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analysed statistically with Graph-Pad Prism (GraphPad Software Inc.). In whole-cell voltage-clamp recording experiments, composite cumulative distributions of mIPSCs and sIPSCs were compared using Kolmogorov-Smirnov (K-S) test and population data were analysed by two-tailed Mann-Whitney U (M-WU) test. In motion capture experiments, Two-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test were performed. In Western blot, qPCR, image, brain weight, body weight, GPe volume analyses, unpaired two-tailed Student's t-test was applied to compare difference between two groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$.

Results

The expression of proteins involved in GABAergic neurotransmission is altered in R6/1 mice

To evaluate GABAergic neurotransmission during HD progression, we quantified expression levels of several indicators essential for GABAergic synaptic function using western blot on protein extracted from

the GPe. Note that our data are representative of four (sometimes three) independent western blot analyses. Moreover, each individual analysis was performed with pooled GPe from at least 3 mice of the same age and genotype. Therefore, we believe that our data represents the average protein expression of the different groups of mice and avoids individual variability.

The expression level of the GABA_AR $\alpha 1$ subunit showed a significant decrease to $67.6 \pm 9.2\%$ in the GPe of R6/1 mice at 2 months (Fig. 1A). At 6 months, the decrease was $59.7 \pm 5.8\%$. To corroborate this finding in the R6/1 model, we used the HdhQ111 knock-in mouse that is genetically distinct from the R6/1 model and has a different disease progression phenotype (Crook & Housman, 2011; Pouladi et al, 2013). Western blot analysis on 8-month-old HdhQ111 mice reveals a statistically significant decrease to $78.2 \pm 5.8\%$ of the $\alpha 1$ subunit expression level in the GPe (Fig. 1B) in accord with data from the R6/1 mouse model. GABA_ARs are pentameric complexes that contain $\beta 1-3$ as mandatory subunits. Therefore, the expression of these subunits may reflect the expression level of GABA_ARs as a whole. We then analysed $\beta 2$, which displays considerably stronger expression than $\beta 1$ and $\beta 3$ in the GPe (Boyes & Bolam, 2007; Hortnagl et al, 2013). A significant decrease of $\beta 2$ was measured in the GPe of 2- and 6-month-old R6/1 mice ($70.9 \pm 10.4\%$ and $49.6 \pm 8.4\%$, respectively, Fig. 1C). GABA_ARs present in synapses are associated with $\gamma 2$ subunits (Luscher et al, 2011). Expression of this subunit (Fig. 1D) showed a trending decrease in the GPe.

Western blot analysis is an accurate way to assess gene expression downstream of transcriptional and translational regulation (Tian et al, 2004). However, this technique is hampered by the amount of tissue required and limitations of suitable antibodies. To validate and extend our findings, we performed quantitative PCR on mRNAs extracted from the GPe of 6-month-old mice. These data show a significant decrease in

the expression of the $\alpha 1$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ subunits in the GPe, in agreement with western blot data (Fig. 1E). The expression of the $\gamma 1$ subunit that is abundant in the GPe (along with $\alpha 1$, $\beta 2$ and $\gamma 2$) is not modified as found for the moderately expressed $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits or the slightly expressed $\alpha 5$, $\beta 1$ and $\beta 3$ subunits (Fig. 1E). These data therefore validate and extend the results obtained by western blot analyses, suggesting a decrease of the number of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ receptors in the GPe.

Because GABAergic neurotransmission is also regulated by presynaptic mechanisms, the expression level of proteins involved in GABA synthesis or release was measured. The level of GAD 65 was significantly decreased in the GPe of symptomatic R6/1 mice ($47.9 \pm 4.3\%$ Fig. 2A) while no significant changes were detected at 2 months. The expression of GAD 67 was largely reduced in the GPe of both 2- and 6-month-old R6/1 mice ($43.3 \pm 5.7\%$ and $65.8 \pm 7.7\%$, respectively, Fig. 2B). In addition, these data were corroborated with an antibody recognizing both GABA synthesizing enzymes GAD 65 and 67 showing a significant decrease in the GPe at 6 months ($51.8 \pm 7.4\%$, Fig. 2C). Expression of GAD 65 showed a trending decrease ($84.1 \pm 10.2\%$) and the expression of GAD 67 was significantly reduced ($54.9 \pm 9.5\%$) in the GPe of Hdhq111 mice, in line with data from the R6/1 mouse model (Fig. 2D, E). We also performed quantitative PCR on mRNAs extracted from the GPe of 6-month-old mice showing a decreased expression of GAD 65 and GAD 67 in the GPe of R6/1 mice (Fig. 2F).

The immunoreactivity of the vesicular transporter Vgat showed a significant reduction in the GPe of 2-month-old R6/1 mice and a trending increase at 6 months (Fig. 2G). Gephyrin and neuroligin 2 are predominantly associated with inhibitory synapses (Fritschy et al, 2008; Pouloupoulos et al, 2009). Our results showed that the expression of gephyrin was significantly decreased in the GPe of asymptomatic and symptomatic R6/1 mice ($63.8 \pm 1.7\%$, $71.4 \pm$

10.0% , respectively; Fig. 2H). The expression level of NL2 was significantly decreased in the GPe at 2 months ($72.5 \pm 9.6\%$) and at 6 months ($60.3 \pm 7.0\%$; Fig. 2I).

Thus, our analyses of GABA_AR subunit expression and pre- and post-synaptic proteins of inhibitory synapses revealed an overall reduction of GABAergic markers in the GPe of presymptomatic and symptomatic R6/1 mice.

GABAergic synaptic transmission is impaired in GPe neurons at 2 and 6 months in R6/1 mice

To determine whether there was an alteration in GABA_AR-mediated synaptic transmission in the GPe of R6/1 mice, we recorded post-synaptic currents (IPSCs) in 2-month- and 6-month-old R6/1 animals and aged-matched WT mice.

First, we investigated action potential-dependent GABAergic synaptic transmission by recording spontaneous IPSCs (sIPSCs). We found a significant decrease in the frequency and amplitude of spontaneous IPSCs in R6/1 mice compared with WT animals at 2 months and 6 months (Fig. 3). Cumulative distributions of sIPSCs inter-event intervals were significantly shifted to the right (Fig. 3C, I), suggesting a reduction in the frequency of sIPSCs, and cumulative distributions of amplitude were significantly shifted to the left, indicating a reduction of the sIPSC amplitude (Fig. 3D, J). The significant reduction in sIPSC frequency and amplitude in 2- and 6-month-old R6/1 mice was also observed in population data (Fig. 3E-F, K-L). These results show an alteration of GABAergic synaptic transmission in the GPe of R6/1 mice and suggest that this alteration is present before the appearance of overt motor deficits and involves both pre- and post-synaptic elements.

To determine if the alteration of GABAergic transmission was dependent on neuronal activity, we investigated quantal GABAergic transmission. Miniature post-synaptic currents (mIPSCs) were recorded in WT and

R6/1 animals at 2 and 6 months in the presence of tetrodotoxin (TTX), which blocks voltage-dependent sodium channels (Na_v). Under these recording conditions, we found a significant decrease in the frequency but not the amplitude of mIPSCs in 2- (Fig. 4A-F) and 6-month-old (Fig. 4I-N) R6/1 mice. Cumulative distribution plots showed a significant increase in mIPSC inter-event intervals (Fig. 4C, K) but no change in amplitude (Fig. 4D, L) in R6/1 mice compared with WT mice at both ages. The reduction in frequency but not in the amplitude of mIPSCs in 2- and 6-month-old R6/1 mice was also observed at the population level (Fig. 4E-F, M-N). We also analysed the kinetic parameters of mIPSCs and found that the decay was significantly slower in asymptomatic R6/1 mice compared with WT (Fig. 4G-H). Taken together, these results show an alteration of GABAergic neurotransmission that precedes the appearance of motor deficiencies. The alteration in frequency, amplitude and IPSC kinetics suggest both presynaptic and postsynaptic changes.

To further analyse the anatomical basis for alteration in GABAergic neurotransmission in the GPe, the expression of Vgat and $\alpha 1$ were analysed using high resolution microscopy. Neurotransmission relies on several factors including the number of synapses and connectivity pattern (Brickley & Mody, 2012). To appraise synapses in the GPe, we developed a strategy that combines multiple fluorescent labelling, high resolution imaging and image analyses of the entire GPe (Fig. 5A). We used these high resolution mosaic images (Fig. 5B) to quantify the number of GABA_A synapses in WT and R6/1 mice in the entire GPe. Analyses (Fig. 5C) rely on the identification of Vgat- and $\alpha 1$ -labelling as pre- and post-synaptic objects, respectively. Compared with WT, the number of $\alpha 1$ objects at 2 months in R6/1 mice decreased to $80.2 \pm 1.4\%$ while the number of Vgat objects was not significantly different ($94 \pm 8.8\%$). The number of $\alpha 1$ adjacent to Vgat or conversely Vgat to $\alpha 1$ decreased to $73.6 \pm 2.8\%$ and

$73.8 \pm 2.8\%$, respectively. In 6-month-old R6/1 mice, the number of $\alpha 1$ and Vgat objects decreased to $57.9 \pm 6.3\%$ and $67.3 \pm 29.1\%$, respectively, and the number of $\alpha 1$ adjacent to Vgat or conversely Vgat to $\alpha 1$ decreased to $63.6 \pm 12.0\%$ and $58.8 \pm 11.6\%$, respectively. These data suggest no change in the synaptic input (Vgat clusters) but rather a decrease of synapse density (Vgat/ $\alpha 1$) in the GPe of R6/1 mice both at 2 and 6 months.

Altered phenotypes of R6/1 mice

Because GABAergic neurotransmission, a major signalling system in the brain, was already altered at 2 months, we searched for measures that could be associated with this alteration. Brain weight (Fig. 6A) of R6/1 was slightly but significantly reduced at 2 months (91% that of WT; WT: 0.435 ± 0.006 g; R6/1: 0.400 ± 0.004 g; n=5) and at 6 months (75% that of WT; WT: 0.447 ± 0.006 g; R6/1: 0.336 ± 0.043 g; n=8) in agreement with in vivo magnetic resonance imaging (Ratray et al, 2013). Using acetylcholinesterase (AChE) staining, we found that in R6/1 mice, the volume of the GPe (Fig. 6B) was significantly decreased at 6 months (90% that of WT; WT: 0.908 ± 0.025 mm³, R6/1: 0.816 ± 0.027 mm³ n=8) but not at 2 months (WT= 0.684 ± 0.015 mm³, R6/1= 0.720 ± 0.02 mm³ n=5). Decrease in body weight is also a hallmark of Huntington's disease both in human and animal models (Lazar et al, 2015; Pouladi et al, 2013). Mice (n=8, each genotype) were weighted from P46 and body weight gain was assessed from P60 to P114. P60 (WT: 3.648 ± 0.5021 g; R6/1: 3.633 ± 0.3857 g), P74 (WT: 4.973 ± 0.5810 ; R6/1: 4.683 ± 0.2508), P87 (WT: 5.448 ± 0.6018 ; R6/1: 5.383 ± 0.3439), P100 (WT: 5.835 ± 0.6525 ; R6/1: 5.558 ± 0.5475), P114 (WT: 6.591 ± 0.6675 ; R6/1: 4.633 ± 0.5988). These data (Fig. 6C) show a significant difference between WT and R6/1 mice between 3 and 4 months suggesting that early metabolic deficits in HD (Lazar et al, 2015) are not present at 2 months in R6/1 mice.

Alteration of locomotor activity and rest/activity are pathological hallmark of HD. We continuously recorded 2-month-old WT and R6/1 mice for a 2 month period in their home cages. This allowed us to avoid stress linked to frequent human interference and environmental changes and to monitor the activity of individual animals second by second (Fig. 7). For each animal, the daily activity could be visualized in actigrams, as presented in Figure 7A. The analysis of the total distance travelled during the dark period (Fig. 7B) indicated that the locomotor activity of R6/1 mice was not impaired as compared to WT littermates at 2 months. However, the total distance travelled was significantly reduced from 3 months of age and beyond. The total distance travelled during the light period was not significantly different between the genotypes (Fig. 7B). Interdaily stability, which quantifies the degree of regularity in the rest/activity pattern, was not different at 2 months (WT: 0.732 ± 0.029 , $n=13$; R6/1: 0.666 ± 0.048 , $n=10$) but was significantly reduced at 3 months (WT: 0.760 ± 0.037 , $n=9$; R6/1: 0.550 ± 0.054 , $n=9$) and 4 months (WT: 0.713 ± 0.043 , $n=8$; R6/1: 0.390 ± 0.042 , $n=8$; Fig. 7C). In contrast, the fragmentation index (Cosin et al, 2014), which indicates the degree of fragmentation of the rest/activity periods, was significantly altered in 2-month-old R6/1 mice (WT: 65.14 ± 1.23 , $n=11$; R6/1: 73.48 ± 1.42 , $n=10$) and worsened at 3 months (WT: 64.55 ± 1.63 , $n=9$; R6/1: 79.51 ± 1.92 , $n=9$) and 4 months (WT: 61.20 ± 2.13 , $n=8$; R6/1: 80.36 ± 2.07 , $n=8$; Fig. 8D). Taken together, these data showed that while locomotor, body weight, and circadian parameters were not yet affected, rest/activity parameters were already altered at 2 months. All of these parameters were altered at 4 months.

Discussion

To identify functional alteration associated with HD, we used molecular and electrophysiological tools and demonstrated decreased inhibitory synaptic currents and

synapse number in the GPe showing that the GABAergic neurotransmission is impaired in this nucleus. Interestingly, alterations were evident as early as 2 months and concomitant with significant changes of active/rest rhythm. Together, these data suggest that alterations of GABAergic neurotransmission may be instrumental in the early pathology of the disease.

The major GABA_AR in the brain is believed to consist of two $\alpha 1$ -, two $\beta 2$ -, and one $\gamma 2$ -subunits (Luscher et al, 2011). These three subunits are highly expressed in human and rodent GPe (Gross et al, 2011; Hortnagl et al, 2013; Waldvogel et al, 1999). Our Western blot or qPCR analyses show decreased expression of $\alpha 1$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ in the GPe of R6/1 mice suggesting a decrease in the number of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -receptors. In addition, expression of enzymes involved in GABA synthesis (namely GAD-65 and -67) is also decreased. We similarly used HdhQ111 mice. This HD mouse model has been developed in a genetic context different from that of R6/1 and it displays a mild phenotype and slow progression of the disease (Pouladi et al, 2013). It is of note that expression of $\alpha 1$ subunit and GAD 67 are also decreased in the GPe of 8-month-old HdhQ111 mice when cognitive, but not motor deficits are detected (Menalled, 2005; Yhnell et al, 2015). Western blot analyses on R6/1 mice revealed also a decreased expression of the vesicular transporter Vgat involved in the synaptic release of GABA (Buddhala et al, 2009). The expression of gephyrin and NL2, both involved in inhibitory synapse formation (Luscher et al, 2011) is also decreased. Eighty percent of pallidal GABAergic synapses arise from the striatopallidal pathway (Kita, 1994) and thus constitute the main source of inhibition of the GPe. Functional analyses of GABAergic currents in GPe neurons of R6/1 mice showed a reduction of sIPSCs and mIPSCs frequency suggesting a defect in the pre-synaptic release of GABA in 2- and 6-month-old R6/1 mice. This reduction could be due, at least in

part, to the decreased expression of Vgat in 2-month-old HD mice. However, in 2-month-old and in 6-month old R6/1 animals our data suggest GABAergic (putatively striatopallidal) synapses are eliminated. First, we show a reduced expression of gephyrin and NL2 which are localized in post-synaptic and pre-synaptic terminals, respectively. Second, the amplitude of mIPSCs is not altered, suggesting that the number or receptors in individual synapses is not decreased. Lastly, the number of pairs of pre- and post-synaptic markers is decreased. Taken together, our results show a reduction of GABAergic synaptic transmission of the indirect pathway due to the addition of a functional deficiency of striatopallidal GABAergic input and a decreased number of synapses. Moreover, the decreased expression of $\alpha 1$ -, $\beta 2$ -, and $\gamma 2$ -subunits and the modification of mIPSC kinetics in 2-month-old R6/1 mice suggest post-synaptic alterations of GABA_AR subunit composition (Mody & Pearce, 2004). Our data in the GPe from R6/1 and HdhQ111 mouse models are at odds with immunohistolabelling from human GPe (Allen et al, 2009). This difference could be due

to the fact that human brain tissues are obtained after the fatal outcome of the disease following decades of pharmacological treatments. Moreover, the GPe is thought to be hyperactive in animal models and human HD (Starr et al, 2008; Temel et al, 2006). Our data are in line with this hypothesis and indicate that impairment of the GABAergic inhibition might be involved in this hyperactivity. Interestingly, these data show that at 2 months, when R6/1 mice are assumed to be in a pre-symptomatic phase, the GABAergic system is altered in the GPe suggesting that alteration in the GPe precedes the appearance of overt symptoms in the R6/1 mouse model of HD.

The finding that alterations of molecular and functional GABAergic transmission are already present at 2 months in the GPe of the R6/1 model is

surprising because cognitive deficits have been revealed only at 3 months (Brooks et al, 2012; Desplats et al, 2006; Milnerwood & Raymond, 2010; Rattray et al, 2013; Smith et al, 2006). Therefore, to link this alteration with behavioural changes and since a body of evidence suggests that the GPe has a central role in several brain functions, we monitored home cage activity over 2 months starting at 2 months of age. This condition is devoid of stress by novel test environments and human manipulation and may reveal the natural state of the animal model. The spatial resolution of this recording system enable the analysis of locomotor activity assessed by measuring distance travelled. These analyses showed that locomotor activity was decreased in 3 month-old R6/1 mice suggesting that hypokinesia co-occurs with cognitive dysfunction as observed in human HD (Reedeker et al, 2010).

The high temporal and spatial resolution of this videotracking system also enables the analysis of the rest/activity rhythm. It is established that assessment of activity/inactivity is well correlated with assessment of sleep by electroencephalogram and electromyogram (Fisher et al, 2012; Pack et al, 2007). The rest/activity rhythm was appraised in the present study using the fragmentation index applied in humans to provide reliable indication of sleep quality (Cosin et al, 2014). As expected, the fragmentation index was decreased in 3- and 4-month-old R6/1 mice. This alteration of activity/rest rhythm is similar to disturbed sleep patterns found in HD patients and mouse models (Fisher et al, 2013; Goodman et al, 2011; Kantor et al, 2013; Kudo et al, 2011; Morton et al, 2005; Wiegand et al, 1991). In addition, we have shown that when electroencephalograms are recorded in 11-week-old R6/1 mice, fragmented sleep with increased sleep-wake transitions are observed (Lebreton et al, 2015). Surprisingly, at 2 months of age, 1 month before locomotor impairment are detected, R6/1 mice exhibited a clear alteration of activity/rest rhythm suggesting that sleep is altered very early in this mouse

model of HD. It is of note that a very recent analysis have shown that sleep disturbance is an early symptom in premanifest human HD (Lazar et al, 2015). Even if we cannot establish a direct link between early alteration of GABAergic neurotransmission in the GPe and early rest/activity alteration, it is tempting to speculate that both changes are not independent. Indeed, recent findings establish a role for basal ganglia in the sleep/wake regulation (Lazarus et al, 2013), and lesions of the GPe in rat have a profound effect on sleep/wakefulness fragmentation (Qiu et al, 2010). Therefore, early alterations of GABAergic neurotransmission in the GPe and sleep disturbance, at the very least, may

contribute to HD symptoms (Lebreton et al, 2015; Morton, 2013; Wulff et al, 2010).

To our knowledge, changes in the GABAergic system, and hence in GABAergic neurotransmission, are the first major system alterations identified at such an early stage of HD. Consequently, the GABA system may be a target to prevent sleep alteration and reduce the cognitive and psychiatric symptoms of this neurodegenerative disease (Mohler, 2011; Wulff et al, 2010). In addition, we suggest that for the early diagnosis or as a follow-up to initial medical care and to assess the efficacy of therapeutics, actigraphy in humans might be a useful and non-invasive biomarker of HD progression (Goncalves et al, 2015; Morton, 2013; Ross et al, 2014).

Acknowledgements: This work was supported by the 7th frame-work Program Marie Curie European ITN “SyMBaD”. The authors thank Anna Delprato for grammatical correction of the manuscript; Philippe Ciofi and Frederique Varoquaux for gifts of antibodies; Daniel Choquet and Frédéric Saudou for HdhQ111 mice; Gilles Courtand, Christophe Halgand, and Willy Mayo for scientific discussions; Magali Cabanas, Laura Cardoit, Florance Darlot, Delphine Gonzales for technical assistance. This work has benefited from the facilities and expertise of Christel Poujol and Sebastien Marais at the Bordeaux Imaging Center; and the imagery platform Imag’In (www.incia.u-bordeaux1.fr), which is supported by the CNRS and Région Aquitaine.

References

- Abdi A, Mallet N, Mohamed FY, Sharott A, Dodson PD, Nakamura KC, Suri S, Avery SV, Larvin JT, Garas FN, Garas SN, Vinciati F, Morin S, Bezard E, Baufreton J, Magill PJ (2015) Prototypic and arkypallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:6667-6688.
- Allen KL, Waldvogel HJ, Glass M, Faull RL (2009) Cannabinoid (CB(1)), GABA(A) and GABA(B) receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. *Journal of chemical neuroanatomy* 37:266-281.
- Beste C, Muckschel M, Elben S, C JH, McIntyre CC, Saft C, Vesper J, Schnitzler A, Wojtecki L (2015) Behavioral and neurophysiological evidence for the enhancement of cognitive control under dorsal pallidal deep brain stimulation in Huntington's disease. *Brain structure & function* 220:2441-2448.
- Boyes J, Bolam JP (2007) Localization of GABA receptors in the basal ganglia. *Progress in brain research* 160:229-243.
- Braat S, Kooy RF (2015) The GABA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* 86:1119-1130.
- Brickley SG, Mody I (2012) Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73:23-34.
- Brooks SP, Janghra N, Workman VL, Bayram-Weston Z, Jones L, Dunnett SB (2012) Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in R6/1 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice. *Brain research bulletin* 88:94-103.
- Buddhala C, Hsu CC, Wu JY (2009) A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochemistry international* 55:9-12.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55:611-622.
- Caramins M, Halliday G, McCusker E, Trent RJ (2003) Genetically confirmed clinical Huntington's disease with no observable cell loss. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74:968-970.
- Cayzac S, Delcasso S, Paz V, Jeantet Y, Cho YH (2011) Changes in striatal procedural memory coding correlate with learning deficits in a mouse model of Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:9280-9285.
- Cazorla M, de Carvalho FD, Chohan MO, Shegda M, Chuhma N, Rayport S, Ahmari SE, Moore H, Kellendonk C (2014) Dopamine D2 receptors regulate the anatomical and functional balance of basal ganglia circuitry. *Neuron* 81:153-164.
- Cepeda C, Galvan L, Holley SM, Rao SP, Andre VM, Botelho EP, Chen JY, Watson JB, Deisseroth K, Levine MS (2013) Multiple sources of striatal inhibition are differentially affected in Huntington's disease mouse models. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:7393-7406.
- Chaumont S, Andre C, Perrais D, Boue-Grabot E, Taly A, Garret M (2013) Agonist-dependent endocytosis of gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors revealed by a gamma2(R43Q) epilepsy mutation. *The Journal of biological chemistry* 288:28254-28265.
- Chen MC, Ferrari L, Sacchet MD, Foland-Ross LC, Qiu MH, Gotlib IH, Fuller PM, Arrigoni E, Lu J (2015) Identification of a direct GABAergic pallidocortical pathway in rodents. *The European journal of neuroscience*.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162:156-159.

- Cosin C, Sibon I, Poli M, Allard M, Debruxelles S, Renou P, Rouanet F, Mayo W (2014) Circadian sleep/wake rhythm abnormalities as a risk factor of a poststroke apathy. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*.
- Crook ZR, Housman D (2011) Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? *Neuron* 69:423-435.
- Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, Stanwood GD, Woodward EL, Head SR, Sutcliffe JG, Thomas EA (2006) Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* 96:743-757.
- Fisher SP, Godinho SI, Potheary CA, Hankins MW, Foster RG, Peirson SN (2012) Rapid assessment of sleep-wake behavior in mice. *Journal of biological rhythms* 27:48-58.
- Fisher SP, Black SW, Schwartz MD, Wilk AJ, Chen TM, Lincoln WU, Liu HW, Kilduff TS, Morairty SR (2013) Longitudinal analysis of the electroencephalogram and sleep phenotype in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain : a journal of neurology* 136:2159-2172.
- Fogarty MJ, Hammond LA, Kanjhan R, Bellingham MC, Noakes PG (2013) A method for the three-dimensional reconstruction of Neurobiotin-filled neurons and the location of their synaptic inputs. *Frontiers in neural circuits* 7:153.
- Francelle L, Galvan L, Brouillet E (2014) Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:295.
- Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in neurosciences* 31:257-264.
- Galvan A, Wichmann T (2007) GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders. *Progress in brain research* 160:287-312.
- Gittis AH, Berke JD, Bevan MD, Chan CS, Mallet N, Morrow MM, Schmidt R (2014) New roles for the external globus pallidus in Basal Ganglia circuits and behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:15178-15183.
- Goncalves B, Adamowicz T, Louzada FM, Moreno CR, Araujo JF (2015) A fresh look at the use of nonparametric analysis in actimetry. *Sleep medicine reviews* 20C:84-91.
- Goodman AO, Rogers L, Pilsworth S, McAllister CJ, Shneerson JM, Morton AJ, Barker RA (2011) Asymptomatic sleep abnormalities are a common early feature in patients with Huntington's disease. *Current neurology and neuroscience reports* 11:211-217.
- Gross A, Sims RE, Swinny JD, Sieghart W, Bolam JP, Stanford IM (2011) Differential localization of GABA(A) receptor subunits in relation to rat striatopallidal and pallidopallidal synapses. *The European journal of neuroscience* 33:868-878.
- Hortnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, Kirchmair E, Sieghart W, Sperk G (2013) Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience* 236:345-372.
- Kantor S, Szabo L, Varga J, Cuesta M, Morton AJ (2013) Progressive sleep and electroencephalogram changes in mice carrying the Huntington's disease mutation. *Brain : a journal of neurology* 136:2147-2158.
- Kita H (1994) Parvalbumin-immunopositive neurons in rat globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Brain research* 657:31-41.
- Kudo T, Schroeder A, Loh DH, Kuljis D, Jordan MC, Roos KP, Colwell CS (2011) Dysfunctions in circadian behavior and physiology in mouse models of Huntington's disease. *Experimental neurology* 228:80-90.
- Kuhn A et al. (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human molecular genetics* 16:1845-1861.
- Lazar AS, Panin F, Goodman AO, Lazic SE, Lazar ZI, Mason SL, Rogers L, Murgatroyd PR, Watson LP, Singh P, Borowsky B, Shneerson JM, Barker RA (2015) Sleep deficits but no metabolic deficits in premanifest Huntington's disease. *Annals of neurology* 78:630-648.
- Lazarus M, Chen JF, Urade Y, Huang ZL (2013) Role of the basal ganglia in the control of sleep and wakefulness. *Current opinion in neurobiology* 23:780-785.

- Lebreton F, Cayzac S, Pietropaolo S, Jeantet Y, Cho YH (2015) Sleep Physiology Alterations Precede Plethoric Phenotypic Changes in R6/1 Huntington's Disease Mice. *PloS one* 10:e0126972.
- Ligot N, Krystkowiak P, Simonin C, Goldman S, Peigneux P, Van Naemen J, Monclus M, Lacroix SF, Devos D, Dujardin K, Delmaire C, Bardinnet E, Delval A, Delliaux M, Defebvre L, Yelnik J, Blond S, Destee A, De Tieghe X (2011) External globus pallidus stimulation modulates brain connectivity in Huntington's disease. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31:41-46.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL (2011) GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70:385-409.
- Mallet N, Micklem BR, Henny P, Brown MT, Williams C, Bolam JP, Nakamura KC, Magill PJ (2012) Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* 74:1075-1086.
- Menalled LB (2005) Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2:465-470.
- Milnerwood AJ, Raymond LA (2010) Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease. *Trends in neurosciences* 33:513-523.
- Milnerwood AJ, Cummings DM, Dallerac GM, Brown JY, Vatsavayai SC, Hirst MC, Rezaie P, Murphy KP (2006) Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 15:1690-1703.
- Mizuno H, Shibayama H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G, Iwata H, Kobayashi H, Yamada K, Iwai K, Takeuchi T, Hashimoto N, Ishihara R, Ibuki Y, Ogasawara S, Ozeki M (2000) An autopsy case with clinically and molecular genetically diagnosed Huntington's disease with only minimal non-specific neuropathological findings. *Clinical neuropathology* 19:94-103.
- Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends in neurosciences* 27:569-575.
- Mohler H (2011) The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology* 60:1042-1049.
- Moragues N, Ciofi P, Tramu G, Garret M (2002) Localisation of GABA(A) receptor epsilon-subunit in cholinergic and aminergic neurones and evidence for co-distribution with the theta-subunit in rat brain. *Neuroscience* 111:657-669.
- Mortensen M, Patel B, Smart TG (2011) GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones. *Frontiers in cellular neuroscience* 6:1.
- Morton AJ (2013) Circadian and sleep disorder in Huntington's disease. *Experimental neurology* 243:34-44.
- Morton AJ, Wood NI, Hastings MH, Hurelbrink C, Barker RA, Maywood ES (2005) Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:157-163.
- Nagel SJ, Machado AG, Gale JT, Lobel DA, Pandya M (2015) Preserving cortico-striatal function: deep brain stimulation in Huntington's disease. *Frontiers in systems neuroscience* 9:32.
- Pack AI, Galante RJ, Maislin G, Cater J, Metaxas D, Lu S, Zhang L, Von Smith R, Kay T, Lian J, Svenson K, Peters LL (2007) Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiological genomics* 28:232-238.
- Pang TY, Du X, Zajac MS, Howard ML, Hannan AJ (2009) Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 18:753-766.
- Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR (2013) Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature reviews Neuroscience* 14:708-721.
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F (2009) Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63:628-642.

- Qiu MH, Vetrivelan R, Fuller PM, Lu J (2010) Basal ganglia control of sleep-wake behavior and cortical activation. *The European journal of neuroscience* 31:499-507.
- Rattray I, Smith EJ, Crum WR, Walker TA, Gale R, Bates GP, Modo M (2013) Correlations of behavioral deficits with brain pathology assessed through longitudinal MRI and histopathology in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. *PloS one* 8:e84726.
- Reedeker N, Van Der Mast RC, Giltay EJ, Van Duijn E, Roos RA (2010) Hypokinesia in Huntington's disease co-occurs with cognitive and global dysfunctioning. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25:1612-1618.
- Reiner A (2004) Can lesions of GPe correct HD deficits? *Experimental neurology* 186:1-5.
- Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, Langbehn DR, Long JD, Warner JH, Scahill RI, Leavitt BR, Stout JC, Paulsen JS, Reilmann R, Unschuld PG, Wexler A, Margolis RL, Tabrizi SJ (2014) Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature reviews Neurology* 10:204-216.
- Rudolph U, Mohler H (2013) GABA Receptor Subtypes: Therapeutic Potential in Down Syndrome, Affective Disorders, Schizophrenia, and Autism. *Annual review of pharmacology and toxicology*.
- Saunders A, Oldenburg IA, Berezovskii VK, Johnson CA, Kingery ND, Elliott HL, Xie T, Gerfen CR, Sabatini BL (2015) A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex. *Nature*.
- Schneider Gasser EM, Straub CJ, Panzanelli P, Weinmann O, Sassoe-Pognetto M, Fritschy JM (2006) Immunofluorescence in brain sections: simultaneous detection of presynaptic and postsynaptic proteins in identified neurons. *Nature protocols* 1:1887-1897.
- Seredenina T, Luthi-Carter R (2012) What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiology of disease* 45:83-98.
- Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, Englund E, Liu YJ, Roos RA, Faull RL, Brundin P, Li JY (2006) Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Human molecular genetics* 15:3119-3131.
- Starr PA, Kang GA, Heath S, Shimamoto S, Turner RS (2008) Pallidal neuronal discharge in Huntington's disease: support for selective loss of striatal cells originating the indirect pathway. *Experimental neurology* 211:227-233.
- Temel Y, Cao C, Vlamings R, Blokland A, Ozen H, Steinbusch HW, Michelsen KA, von Horsten S, Schmitz C, Visser-Vandewalle V (2006) Motor and cognitive improvement by deep brain stimulation in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Neuroscience letters* 406:138-141.
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP (2007) Basal ganglia macrocircuits. *Progress in brain research* 160:3-7.
- Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H, Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood LE (2004) Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3:960-969.
- Waldvogel HJ, Kubota Y, Fritschy J, Mohler H, Faull RL (1999) Regional and cellular localisation of GABA(A) receptor subunits in the human basal ganglia: An autoradiographic and immunohistochemical study. *The Journal of comparative neurology* 415:313-340.
- Wiegand M, Moller AA, Lauer CJ, Stolz S, Schreiber W, Dose M, Krieg JC (1991) Nocturnal sleep in Huntington's disease. *Journal of neurology* 238:203-208.
- Wulff K, Gatti S, Wettstein JG, Foster RG (2010) Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nature reviews Neuroscience* 11:589-599.
- Yhnell E, Dunnett SB, Brooks SP (2015) The utilisation of operant delayed matching and non-matching to position for probing cognitive flexibility and working memory in mouse models of Huntington's disease. *Journal of neuroscience methods*.

FIGURES

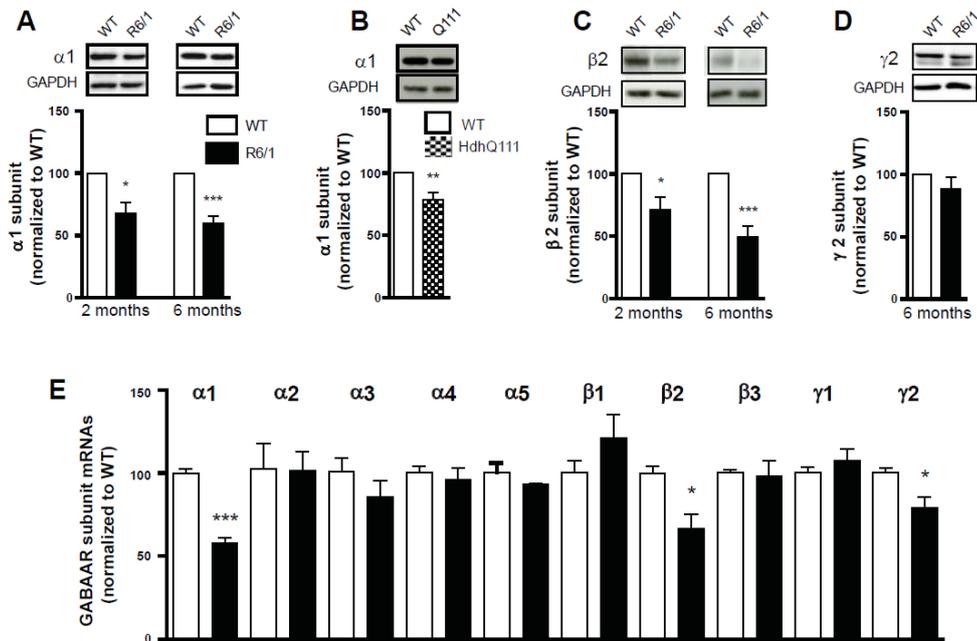


Figure 1. Western blotting analysis and quantitative PCR of mRNAs performed on GPe extracts from 2 month- or 6 month-old mice. (A-D) Western blot visualized with GABA_AR subunit antibodies. Membrane preparations extracted from globus pallidus were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted. **A**, Representative Western blot (out of four) shows $\alpha 1$ subunit immunoreactivity (top panel). The blot was also probed for GAPDH as loading control. The bar graphs represent the means of four independent experiments and show $\alpha 1$ subunit expression after normalization to the corresponding expression of GAPDH; ratio measurement in wild type (WT, unfilled bars) was set at 100% compared to ratio in R6/1 mice (black bars). **B**, Expression of $\alpha 1$ subunit in the GPe of 8-month-old HdhQ111 mice (n=4). **C**, Expression level of $\beta 2$ subunit in 2-month- and 6-month-old R6/1 mice (n=4). **D**, Expression of $\gamma 2$ subunit in the GPe of 6-month-old R6/1 mice (n=3). **E**, The expression of mRNAs encoding $\alpha 1-5$, δ , $\beta 1-3$, and $\gamma 1-2$ GABA_AR subunits in 6-month old WT and R6/1 mice was normalized against GAPDH and peptidylprolyl isomerase A expression. Results are expressed as relative expression of R6/1 versus WT. Data are

means with SEM values of 3 WT and 3 R6/1 performed in duplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

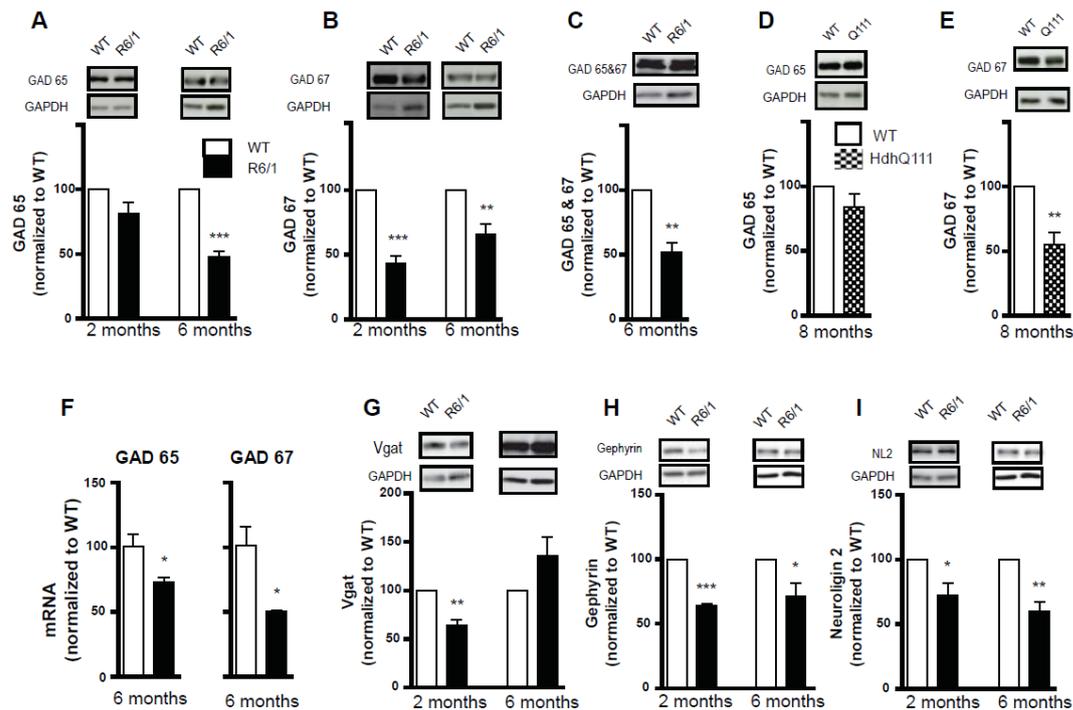


Figure 2. Western blotting analysis on GPe extracts from 2 month- or 6 month-old mice with pre-synaptic marker or adhesion protein antibodies. Membrane preparations were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted. **A**, Representative Western blot out of four shows GAD 65 immunoreactivity (top panel). The bar graphs represent the means of four independent experiments and show GAD 65 expression after normalization to the corresponding expression of GAPDH; ratio measurement in wild type (WT, unfilled bars) was set at 100% compared to ratio in 2-month-old R6/1 mice (n=4) and at 6 months (n=4). **B**, Expression of GAD 67 in the GPe of 2- and 6-month-old R6/1 mice (n=4). **C**, labelling with an antibody recognizing both GABA synthetizing enzymes GAD 65 and 67 (n=3). **D, E**, Expression of GAD 65 and GAD 67 in the GPe of 8 month old WT and HdhQ111 (hatched bars) mice (n=4). **F**, Quantitative PCR of mRNAs on GPe extracts from 6-month-old WT and R6/1 mice. The expression of mRNAs encoding GAD 65, GAD 67, Vgat, Gephyrin, and Neuroigin 2 (NL2) was normalized against GAPDH and peptidylprolyl isomerase A expression. **G**, Vesicular transporter Vgat immunoreactivity experiments in 2-month-old mice (n=4) and 6-month-old R6/1 mice (n=4). **H**, Anchoring protein gephyrin immunoreactivity in 2- (n=4) and 6-month-old (n=3) R6/1 mice. **I**, Labelling with an antibody recognizing neuroigin 2 in the GPe of 2- and 6-month-old mice (n=3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

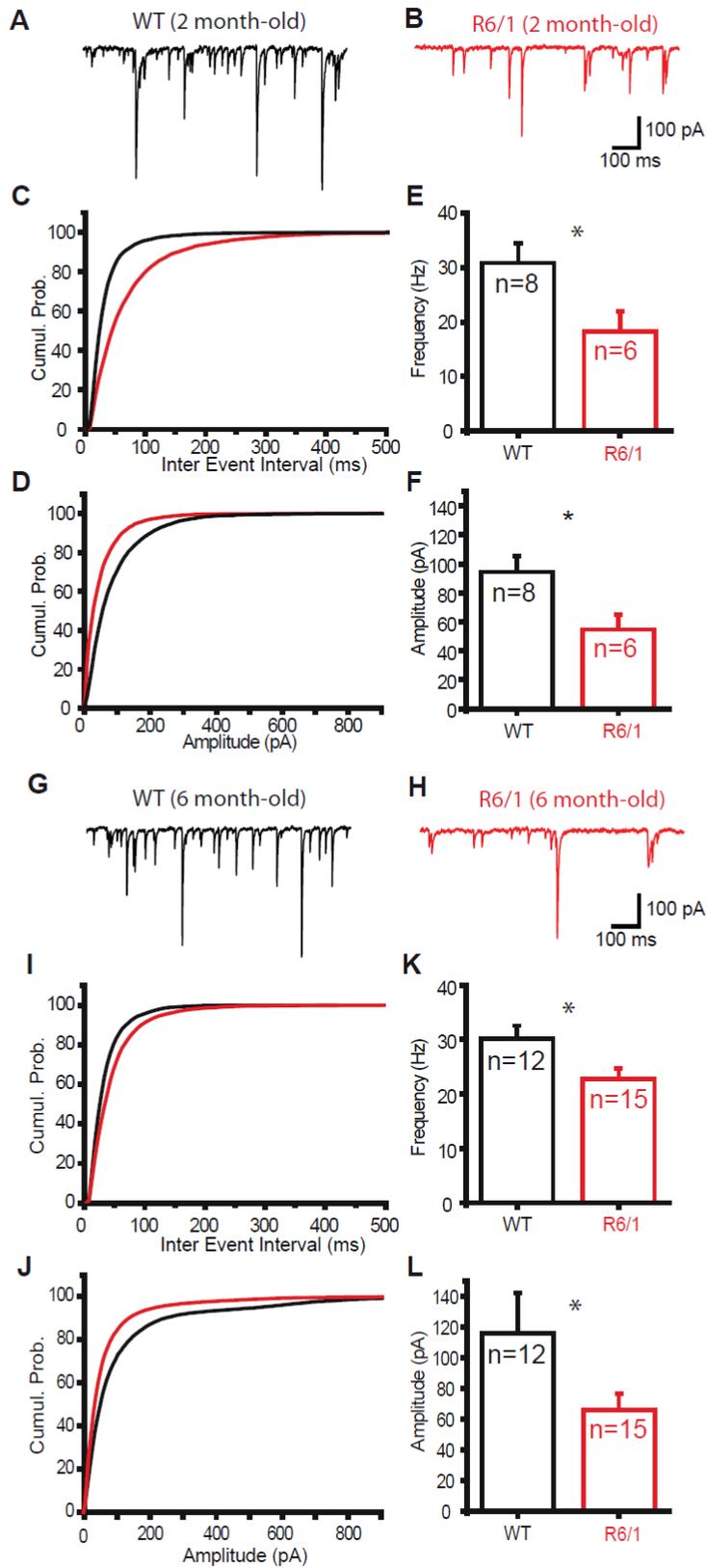


Figure 3. Spontaneous GABAergic transmission in GPe neurons is altered in R6/1 mice at 2 and 6 months. A-B, Representative traces showing spontaneous Inhibitory post-synaptic currents (sIPSCs) recorded in GPe neurons from WT (**A**) and R6/1 (**B**) mice aged of 2 months. **C,D,** Composite distributions indicating that there is a significant increase ($p < 0.05$) in sIPSCs interevent intervals (**C**) and a significant reduction in amplitude (**D**) in R6/1 mice (red traces) compared to WT mice (black traces) at 2 months. **E-F,** Population data summarizing the reduction of frequency and amplitude of sIPSC in R6/1 mice aged of 2 months. **G-H,** Representative traces showing sIPSCs recorded in GPe neurons from WT (**G**) and R6/1 (**H**) mice aged of 6 months. **I-J,** Composite cumulative distributions indicating that there is a significant increase ($p < 0.05$) in interevent intervals in sIPSCs from R6/1 mice (red trace) compared to WT mice (black trace) at 6 months **J.** The cumulative probability of sIPSC amplitude depicting that there is a significant decrease ($p < 0.05$) in the amplitude of sIPSCs from R6/1 mice (red trace) compared to WT mice (black trace) at 6 months **K-L,** Population data summarizing the reduction of frequency and amplitude of sIPSC in R6/1 mice aged of 6 months.

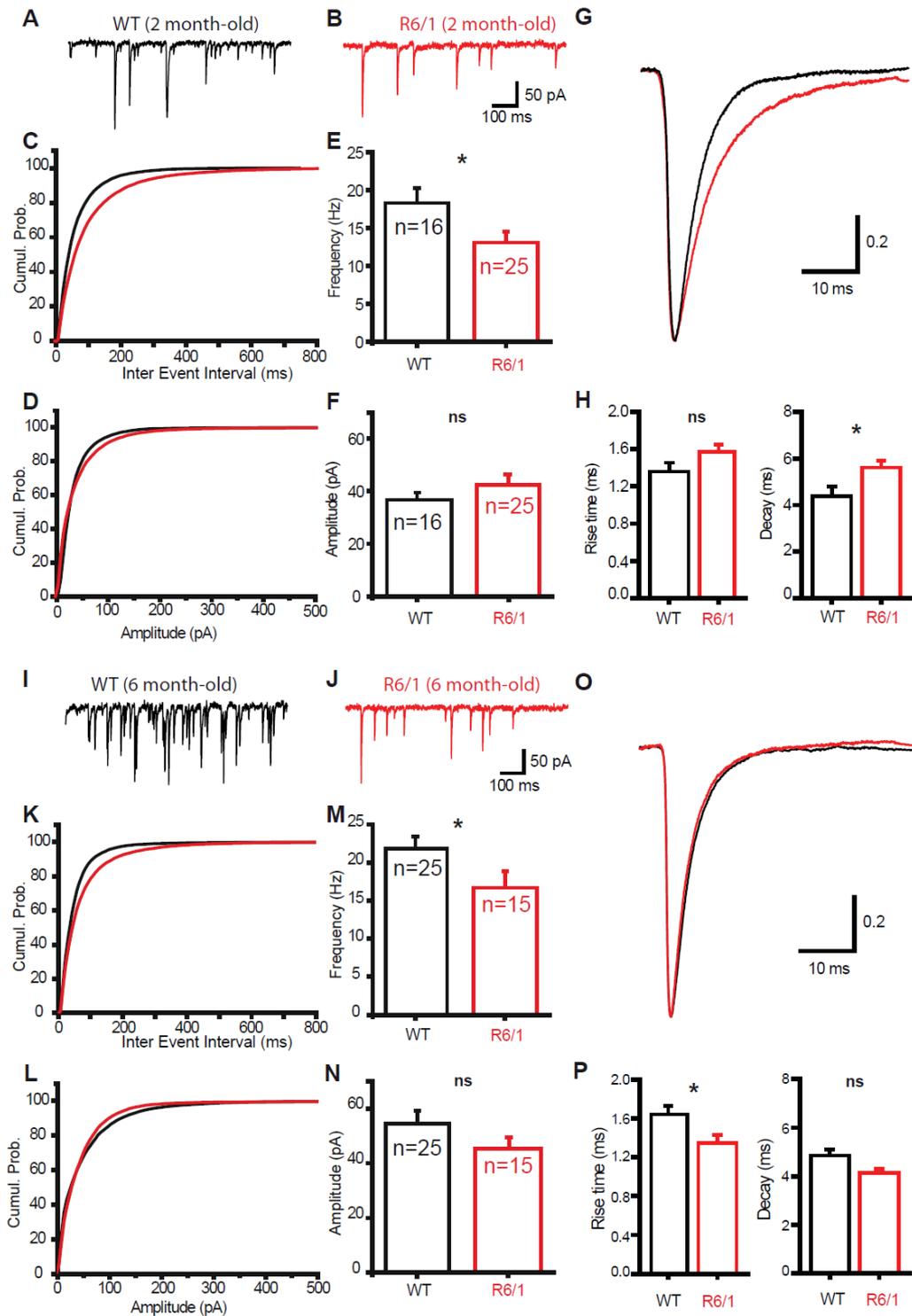


Figure 4. Quantal GABAergic transmission in GPe neurons is reduced in R6/1 mice at 2 and 6 months. A-B,. Representative examples of miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs) recorded in GPe neurons from WT (A) and asymptomatic R6/1 (B) mice aged of 2 months. C, D. Composite cumulative distributions indicating that there is a

significant increase ($p < 0.05$) in mIPSCs interevent intervals in R6/1 mice (red trace) compared to WT mice (black trace) at 2 months (**C**) but no difference in mIPSCs amplitude (**D**). **E-F**, Population graphs showing the significant reduction in mIPSCs frequency ($p < 0.05$) and the absence of modification of mIPSCs amplitude between R6/1 and WT mice aged of 2 months. **G**: Superimposed traces of normalized mIPSCs obtained from 2 month-old WT (black) and R6/1 (red) mice. **H**: Graph summarizing mIPSCs kinetics. **I-J**, Representative examples of miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs) recorded in GPe neurons from WT (**I**) and symptomatic R6/1 (**J**) mice aged of 6 months. **K-L**. Composite cumulative distributions showing that there is a significant increase ($p < 0.05$) in mIPSCs interevent intervals in R6/1 mice (red trace) compared to WT mice (black trace) at 6 months (**K**) but no difference in mIPSCs amplitude (**L**). **M, N**. Population graphs showing the significant reduction in mIPSCs frequency ($p < 0.05$) and the absence of modification of mIPSCs amplitude between R6/1 and WT mice aged of 6 months. **O**: Superimposed traces of normalized mIPSCs obtained from 6 month-old WT (black) and R6/1 (red) mice. **P**: Graph summarizing mIPSCs kinetics. The numbers of recorded neurons are indicated in the column bars.

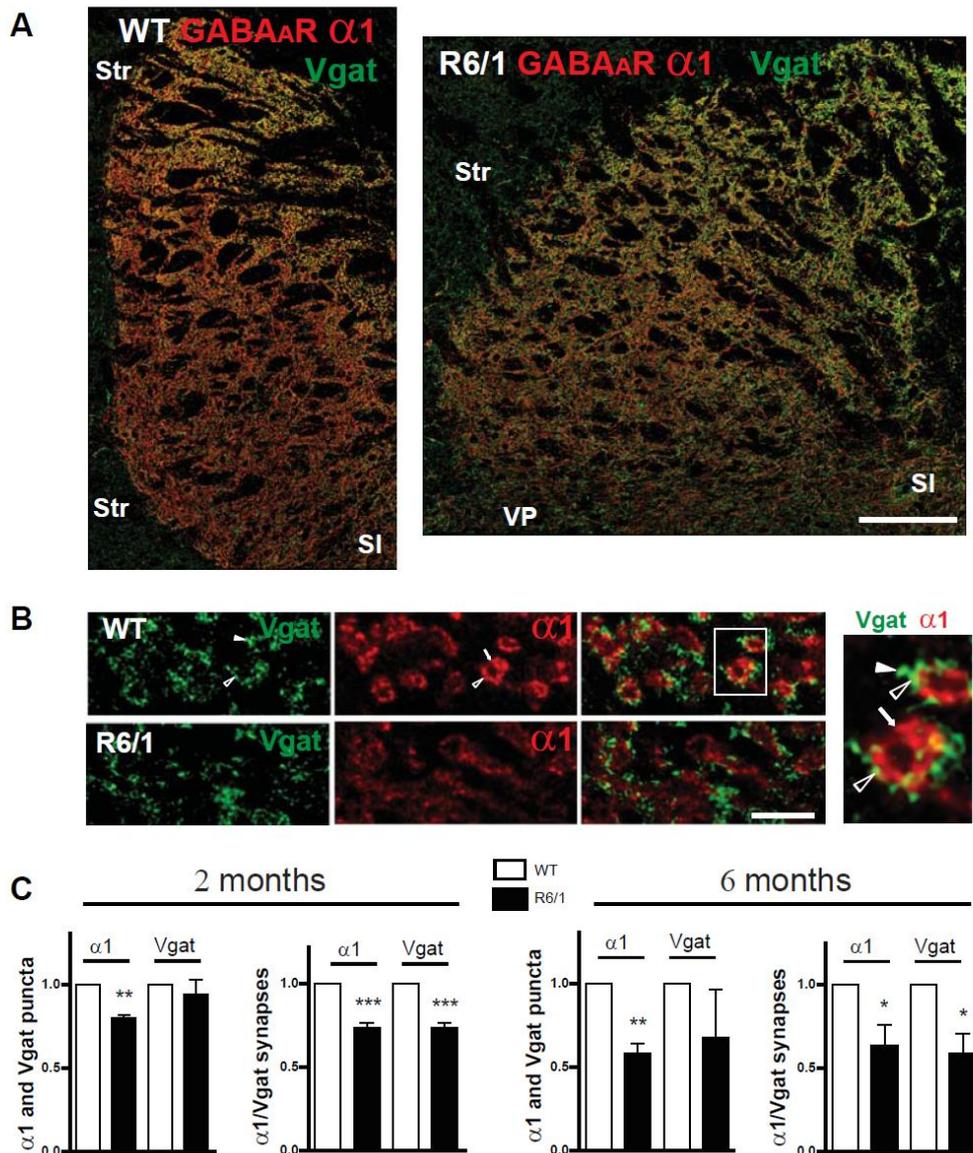


Figure 5. High resolution imaging of the whole GPe and quantitative analysis of the number of GABAergic synapses. Fluorescent double-labelling for GABA_AR α 1 subunit (α 1, red) and vesicular transporter (Vgat, green) in sagittal sections of mouse brain. **A**, the whole GPe in brain sections from 2-month-old WT and R6/1 mice imaged by creating a mosaic of high resolution images. **B**, zoom in images from mosaic images (shown in A) display Vgat-, α 1-, and merge-labelling (white frame detailed in far-right inset). Clusters of Vgat (arrowhead) or α 1 (arrow) were identified as green or red puncta, respectively; synapses were identified as juxtaposed Vgat- α 1 puncta (empty arrowheads). **C**, Quantitative analysis of α 1, Vgat puncta (left panels) and α 1 juxtaposed to Vgat or Vgat juxtaposed to α 1 (right panels). Str, Striatum, SI, Substantia innominate, VP, ventral pallidum. Scale bars, 200 μ m (A) or 5 μ m (B). * p < 0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

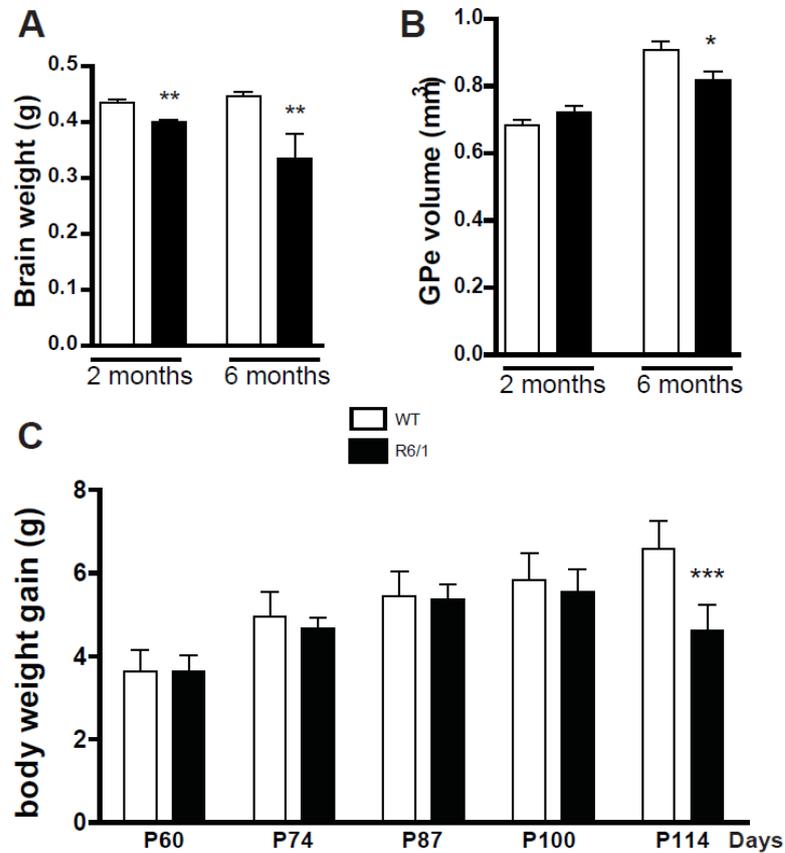


Figure 6. Phenotypic alteration of R6/1 mice. **A**, brain weight of 2- (WT n=5, R6/1 n=5) and 6-month-old (n=8) mice. **B**, Acetylcholinesterase labelling was used to measure the GPe volume of 2-month-old WT (n=5) and R6/1 littermates (n=8) as well as of 6-month-old WT and R6/1 littermates (n=7). **C**, Mice were weighted from P46 and body weight gain was assessed from P60 to P114. A significant difference between WT and R6/1 mice was revealed at 4 months. \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

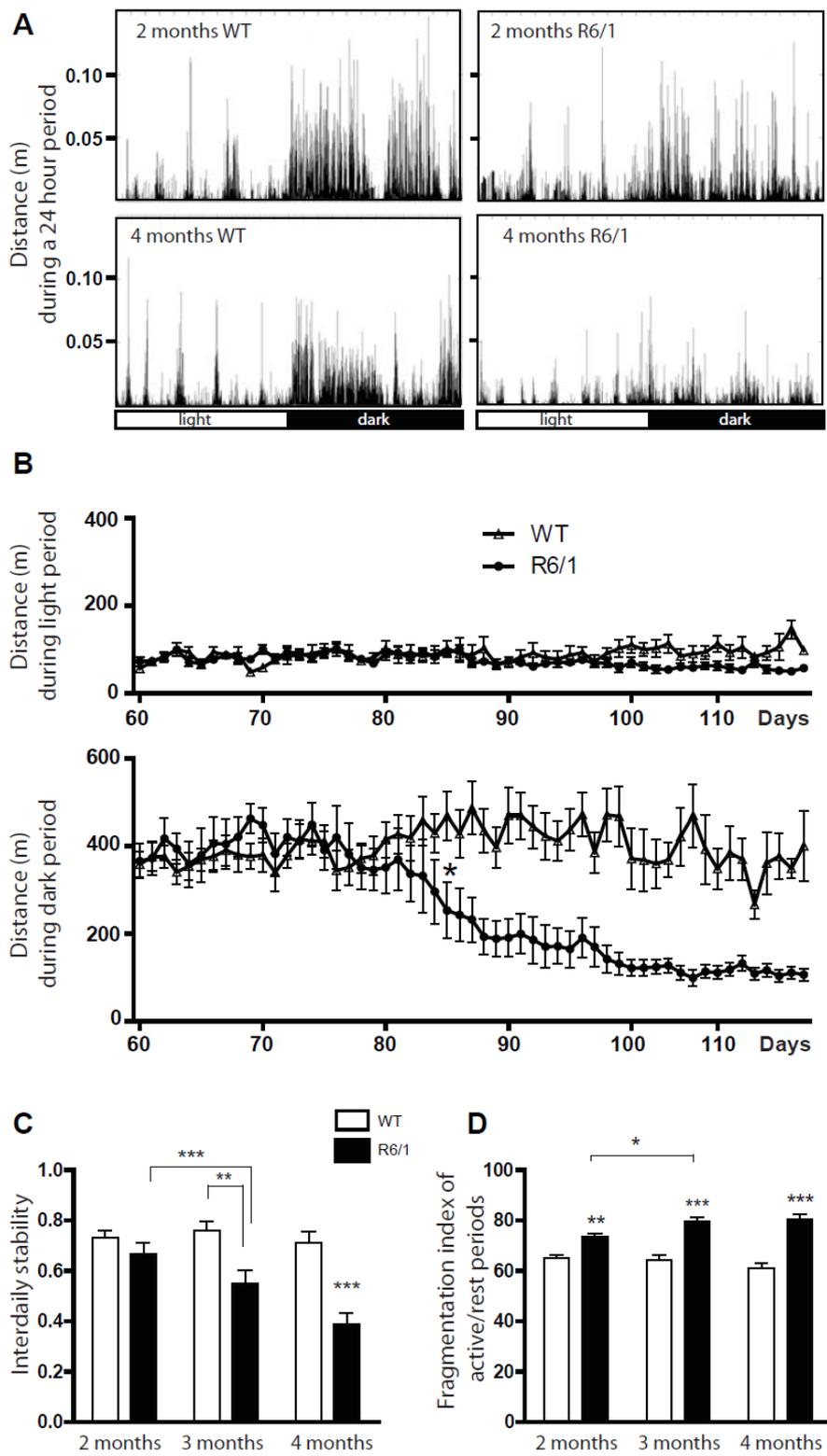


Figure 7. Locomotor activity and rest/activity rhythm. Individual animal activity was continuously recorded from 2 to 4 months of age. **A**, Representative instantaneous activity patterns during a 24 hours (12-12 hour light-dark) period of 2- and 4-month-old WT and R6/1

mice. Sample bins on the X axis were 1 s. **B**, Locomotor activity was assessed as the mean distance travelled during the light- or dark-period (upper and bottom panels, respectively) of WT and R6/1 mice. Normal locomotor activity of R6/1 mice was significantly lost during dark periods at the age of 85 days (indicated by an asterisk) and beyond. **C**, Interdaily stability; full-days of data over several days were used to quantify the degree of regularity in the Activity-Rest pattern. A value of 0 indicates a total lack of rhythm and a value of 1 indicates a perfectly stable rhythm. **D**, The fragmentation index is an indication of the degree of fragmentation of the sleep period, and is used as an indication of sleep quality. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Discussion générale et Perspectives:

Discussion générale et Perspectives :

L'objectif global de ma thèse a été d'étudier les changements moléculaires du système GABAergique dans le GPe pouvant participer aux modifications de l'activité des neurones pallidaires observées dans différentes pathologies caractérisées par des symptômes moteurs hypokinétiques comme dans la MP ou hyperkinétiques comme dans la MH.

Dans un premier temps, les données de la littérature suggèrent que des modifications de la transmission GABAergique sont responsables de l'hypoactivité du GPe dans la MP. Cependant il n'existe à ce jour que peu de données dans la littérature supportant cette hypothèse. L'objectif principal de mon travail de doctorat a donc été d'étudier la transmission GABAergique au niveau du GPe dans un modèle animal de la MP, le rongeur 6-OHDA, afin d'identifier les mécanismes synaptiques responsables de l'hypoactivité des neurones du GPe.

I. Origine de l'hypoactivité du GPe durant la MP:

Pour commencer, la MP est caractérisée par une hypoactivité des neurones du GPe dont l'origine n'est cependant pas connue. Plusieurs données supportent une augmentation de la transmission GABAergique dans ce noyau pouvant expliquer cette diminution de décharge pallidale. Ces études relatent une augmentation de décharge des neurones D2-MSNs striato-pallidaires (Kita & Kita ; Mallet et al, 2006), un élargissement des synapses striato-pallidales (Ingham et al, 1997) ainsi qu'une augmentation de la puissance de transmission synaptique entre les neurones pallidaires sans modification du fonctionnement des synapses STR-GPe (Miguelé et al, 2012). Les concentrations de GABA extracellulaires sont également anormalement élevées dans le GPe (Ochi et al, 2000) et le patron et la fréquence de décharge pallidale sont largement modifiés (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015 ; Mallet et al, 2012). En effet, alors que chez les animaux témoins l'activité pallidale globale est relativement régulière et non corrélée, l'activité des neurones du GPe diminue et devient synchronisée donnant lieu à l'émergence d'ondes β entre le GPe et le NST suite à une déplétion du système dopaminergique. L'ensemble de ces données sont en faveur d'une augmentation de transmission GABAergique au sein du GPe dans la MP. De manière alternative, il a également été montré que la déplétion dopaminergique provoque une réduction significative de l'excitabilité des neurones du GPe (Chan et al, 2011). Nous avons donc voulu, dans un premier temps, comprendre l'origine du changement d'activité pallidale

durant la MP en testant d'une part la perte d'excitabilité des neurones pallidaux prototypiques et d'autre part un changement des entrées inhibitrices extrinsèques en provenance du STR.

1. Altérations intrinsèques

Hypothèse 1 : La perte d'excitabilité des neurones du GPe peut-elle être la cause d'une hypoactivité pallidale en condition parkinsonienne?

Pour ce premier point, il a fallu tout d'abord tenir compte du fait que le globus pallidus est composé de 2 populations neuronales majoritaires, les neurones prototypiques et les neurones arkypallidaux, dont l'activité est différemment affectée suite à une déplétion dopaminergique. En effet, alors que les neurones arkypallidaux subissent peu de changements d'activité suite à la déplétion en dopamine, les neurones prototypiques ont un taux de décharge plus lent et moins régulier accompagné d'un changement important de leur patron d'activité. En effet, alors qu'ils ont une activité régulière tonique faiblement couplée aux ondes lentes corticales chez le rat contrôle anesthésié, ils présentent un patron de décharge composé de pause et avec un couplage en anti-phase avec les ondes lentes corticales (SWA) chez le rat 6-OHDA (Abdi et al, 2015; Dodson et al, 2015 ; Mallet et al, 2012). La population des neurones prototypiques est donc celle dont l'activité est la plus affectée par la déprivation dopaminergique. Nos enregistrements de l'activité spontanée des neurones PV+ du GPe, qui représentent 80% des neurones prototypiques, sur tranches aigües de souris témoins et lésées à la 6-OHDA montrent que ces neurones ne perdent pas leur caractère pacemaker après une déplétion dopaminergique. Nos résultats révèlent plutôt que les neurones prototypiques PV+ enregistrés chez les souris lésées, ont une fréquence de décharge qui est augmentée comparée à celle des souris contrôles. Ces données suggèrent donc que la diminution de fréquence et le patron de décharge rythmique et synchronisé des neurones PV+ du GPe qui apparaissent suite à la déplétion en dopamine ne sont pas la conséquence d'une perte de leurs propriétés de décharge autonome. A l'inverse, nous remarquons que la décharge spontanée de ces neurones est augmentée *in vitro* après une lésion dopaminergique, suggérant la mise en place de mécanismes homéostatiques visant à compenser leur réduction de décharge *in vivo*. Une publication récente (Hernandez et al, 2015) est en accord avec ce résultat et suggère que ce serait les neurones exprimant le facteur de transcription NPas1 (soit les neurones arkypallidaux) qui subiraient une perte d'excitabilité après une déplétion dopaminergique.

2. Modifications extrinsèques

Hypothèse 2 : L'hyperactivité striatale peut-elle expliquer l'hypoactivité pallidale en conditions parkinsoniennes ?

Etant donné que les principales entrées inhibitrices du GPe proviennent du STR, nous avons testé si l'augmentation de décharge striatale pouvait expliquer l'hypoactivité pallidale. Afin d'adresser cette question, nous avons collaboré avec le laboratoire du Dr Bevan à Chicago, qui a réalisé des enregistrements extracellulaires dans le striatum et le GPe. Pour identifier les neurones MSN de la voie indirecte, la méthode de « tagging » optogénétique a été utilisée. Cette méthode consiste à utiliser l'activation des opsines pour identifier la nature des neurones enregistrés. En effet dans notre cas, nous avons utilisé la lignée de souris DRD2Cre transfectée avec un vecteur viral cre-dépendant exprimant ArchT, une pompe à proton dont l'activation par une lumière jaune inhibe l'activité neuronale (Han, 2012 ; Kandori, 2015). Ainsi, les MSN peuvent être caractérisés en fonction de leur réponse à la lumière. Les enregistrements réalisés ont permis de révéler une hyperactivité des neurones D2-MSN après une lésion dopaminergique. A notre connaissance, c'est la première fois que l'hyperactivité des neurones D2-MSN est mise en évidence sur le plan expérimental. Ensuite, nous avons montré que l'inhibition des D2-MSNs par ArchT conduit à une élévation de fréquence et de régularité de la décharge des neurones prototypiques PV+ chez les souris 6-OHDA et restaure ainsi un patron d'activité régulier identique aux souris témoins. Cette expérience démontre ainsi le lien entre l'hyperactivité des neurones striataux de la voie indirecte et l'activité pathologique des neurones prototypiques du GPe. Ces données suggèrent que chez les animaux déplétés en dopamine, l'augmentation de l'inhibition des MSNs de la voie indirecte sur les neurones PV+ du GPe est une cause majeure de leur changement d'activité (**Figure 43**).

3. L'inhibition tonique pallidale :

A. Découverte d'une inhibition tonique GABAergique dans le GPe en condition parkinsonienne :

Nous avons également mis en évidence la présence d'une inhibition tonique GABAergique dans les neurones du GPe uniquement chez les animaux ayant subi une déplétion du système dopaminergique. Cela suggère que le GABA extracellulaire connu pour être anormalement élevé dans le GPe en condition parkinsonienne, déborde de la fente synaptique. La conséquence est une activation des récepteurs GABA_A extra-synaptiques qui donne lieu à une inhibition tonique GABAergique aberrante dans cette structure. Un tel

phénomène a déjà été montré dans d'autres structures comme le le STR et le thalamus en condition physiologique et pathologique (Ade et al, 2008; Cope et al, 2009)

A1 Caractérisation moléculaire de l'inhibition tonique pallidale observée en condition parkinsonienne:

De manière intéressante, nos résultats révèlent que cette IT est indépendante de l'activité neuronale puisque cette dernière persiste en présence de tétrodothine (TTX), un inhibiteur de canaux sodique dépendant du potentiel. Ces données suggèrent que l'IT que nous observons, n'est pas la conséquence de l'augmentation de libération de GABA due à l'hyperactivité STR-GPe ou en provenance des synapses pallidales, mais est plutôt la conséquence de modifications à l'échelle des synapses GABAergiques pallidales. Nous avons alors décidé de tester des modifications fonctionnelles de ces synapses telles qu'une surexpression des récepteurs GABA_A extra-synaptiques ou un défaut de fonctionnement des transporteurs du GABA (Cope et al, 2009). Bien que nos expériences d'électrophysiologie révèlent que l'IT pallidale n'est pas due à une sur-expression des récepteurs GABA_A, nous démontrons par ces manipulations que l'IT que nous observons est médiée par des récepteurs GABA_A- δ comme c'est souvent le cas dans beaucoup de structures cérébrales. Contrairement au striatum (Ade et al, 2008; Janssen et al, 2009) et au cortex (Clarkson et al, 2010) où l'IT peut également être médiée par des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité $\alpha 5$, nos résultats suggèrent que dans le GPe, les récepteurs GABA_A- $\alpha 5$ ne sont pas impliqués dans l'apparition du courant tonique. De plus, nos données suggèrent également que les récepteurs GABA_A- δ sont présents sur les neurones du GPe en condition physiologique mais qu'ils ne sont pas activés. En revanche, chez les animaux 6-OHDA, le THIP (1 μ M) n'induit pas d'augmentation de l'amplitude du courant tonique ce qui indique que l'IT que nous observons n'est pas due à une sur-expression des récepteurs GABA_A- δ extra-synaptiques. Les données de la littérature sont controversées quant à la présence de la sous-unité δ dans le GPe de souris (Hortnagl et al, 2013 ; Waldvogel & Faull, 2015). Il est possible que le niveau d'expression de cette sous-unité soit sous le seuil de détection immunohistochimique. De plus, lors de nos expériences, nous avons utilisé le THIP, un agoniste des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ (GABA_A- δ) à une concentration de 1 μ M ainsi que des souris transgéniques où la sous-unité δ a été invalidée (souris $\delta^{-/-}$). Une concentration \leq au micromolaire est considérée comme sélective des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ (Drasbek et al, 2007; Meera et al, 2011). Après avoir identifié la nature des récepteurs GABA_A responsables de l'IT dans le GPe, nous avons entrepris de manipuler les systèmes de recapture du GABA afin de déterminer leur implication dans

l'apparition de l'IT chez les animaux déplétés en dopamine. Les transporteurs du GABA (GATs) recyclent le GABA vers le neurone présynaptique et la glie, évitant ainsi une activation excessive des récepteurs GABA_A synaptiques et extra-synaptiques. De manière intéressante, l'IT a été décrite une seule fois dans le GPe suite au blocage pharmacologique des GATs en condition physiologique (Jin et al, 2011a) ce qui suggère leur rôle primordial dans le maintien des concentrations extracellulaires de GABA au niveau de ce noyau. Dans le GPe, GAT-1 est retrouvé au niveau des terminaisons pré-synaptiques et aussi au niveau de la glie alors que GAT-3 est exclusivement localisé sur la glie. Nos expériences de blocage pharmacologique des transporteurs neuronaux (GAT-1) et gliaux (principalement GAT-3) du GABA indiquent que l'IT pallidale est sous le contrôle de ces transporteurs chez des animaux contrôles et que leur fonctionnement est dérégulé chez les rats 6-OHDA. Les expériences de recapture du GABA suggèrent que la fonction de GAT-1 n'est pas altérée chez les rats 6-OHDA. A l'inverse, il se produit une augmentation de l'activité de GAT-1 montrant qu'il recapture plus efficacement le GABA. Ce résultat suggère la mise en place d'un mécanisme compensatoire visant à contrebalancer l'excès de GABA pallidal. En ce qui concerne GAT-3, alors que le blocage de son activité révèle une IT en condition contrôle, cette manipulation ne modifie pas l'amplitude de l'IT chez les rats parkinsoniens, ce qui suggère que le système de recapture glial est défaillant. Ce résultat électrophysiologique a été conforté par nos expériences de Western blot montrant une diminution significative du niveau d'expression de GAT-3 dans le GPe des rats 6-OHDA. Ce résultat est cohérent avec de précédentes études montrant qu'un défaut de recapture des transporteurs du GABA est responsable d'une IT au niveau des noyaux thalamiques ventraux de rats épileptiques, bien que dans ce cas, il s'agisse d'un défaut de recapture de GABA par GAT-1 (Cope et al, 2009 ; Pirttimaki et al, 2013). L'ensemble de ces résultats nous laisse à penser que l'IT observée dans le GPe en condition parkinsonienne est due à l'accumulation de GABA dans l'espace extra-synaptique à cause d'un défaut de recapture par le transporteur glial GAT-3 donnant lieu à l'activation des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ . Pour apporter une preuve supplémentaire et indéniable, il serait maintenant intéressant d'enregistrer directement le courant GABAergique à travers les transporteurs GAT-3 en allant patcher les astrocytes, comme cela a été fait dans le thalamus pour les épilepsies (Pirttimaki et al, 2013). De surcroît, il est également connu que dans le GPe de différents modèles animaux et de patients parkinsoniens, il se produit une astrogliose (Charron et al, 2014) suggérant une glie réactive. De plus, le taux d'adénosine provenant de la consommation d'ATP notamment produit par la glie, est élevé dans le GPe et le blocage du récepteur à l'adénosine A2A réduit le taux anormalement élevé de GABA extracellulaire et les symptômes moteurs chez les rats 6-OHDA ajoutant un argument en faveur d'une réaction astrocytaire. De ce fait, il serait également prometteur de pousser les investigations sur la morphologie des astrocytes.

L'utilisation de la microscopie STED (stimulated-emission-depletion ou déplétion par émission stimulée) pourrait nous permettre d'identifier un changement morphologique de la synapse tripartite due à une potentielle rétractation des pieds astrocytaires participant à l'accumulation de GABA dans l'espace extracellulaire par l'éloignement des transporteurs GAT-3.

A2. Implication fonctionnelle de l'IT dans l'excitabilité des neurones pallidaux :

Notre équipe a mis en évidence l'existence de plusieurs populations neuronales dans le GPe (Abdi et al, 2015), et nous nous sommes demandés si tous les types neuronaux du GPe pouvaient avoir une IT. Nous avons donc enregistré le courant tonique dans les différentes populations neuronales pallidales identifiées. Les données obtenues chez les souris témoins révèlent que le courant tonique est présent à la fois dans les neurones prototypiques et arkypallidaux suite à l'augmentation artificielle du niveau de GABA extracellulaire par le blocage des transporteurs GAT-1. Ce résultat suggère ainsi que toutes les populations neuronales possèdent des récepteurs GABA_A extra-synaptiques capables d'engendrer un courant tonique. Maintenant, il serait intéressant de réaliser ces expériences sur des souris 6-OHDA et de comparer l'amplitude du courant tonique présent dans les différentes populations neuronales en condition pathologique. Pour finir, afin de connaître l'impact de l'IT sur l'excitabilité pallidale, nous avons enregistré en patch perforé l'activité électrique des neurones du GPe en réponse à des créneaux dépolarisants. Le patch perforé permet d'enregistrer l'activité neuronale sans modifier le milieu intracellulaire du neurone. De plus, nous avons utilisé comme antibiotique la gramicidine qui forme des pores uniquement perméables aux cations monovalents, ce qui permet de préserver les concentrations de chlorures intracellulaires intactes. En comparant la fréquence de décharge en situation contrôle et suite au blocage du courant tonique par l'application de GABAzine, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la fréquence de décharge des neurones du GPe en réponse à des créneaux de courants dépolarisants. Ces données suggèrent que l'IT a une action inhibitrice dans le GPe, contrairement à ce qui a été observé dans l'hippocampe, où elle peut avoir une action excitatrice (Song et al, 2011). En revanche, le même type d'action inhibitrice de l'IT a été mise en évidence dans le striatum, où l'amplitude du courant tonique présent physiologiquement dans les D1-MSNs et D2-MSNs réduit leur excitabilité neuronale (Ade et al, 2008). Le potentiel d'inversion du chlore dans les neurones pallidaux est d'environ -80mV (Miguel et al, 2012) et comme le potentiel de repos des neurones du GPe est d'environ -60 mV, l'activation des récepteurs GABA_A entraîne une entrée de chlore dans les neurones du GPe et a donc une action

hyperpolarisante et inhibitrice sur l'activité de ces neurones . En conclusion, nos résultats montrent que le courant tonique participe à l'hypoactivité des neurones du GPe chez les animaux déplétés en dopamine (**Figure 43**).

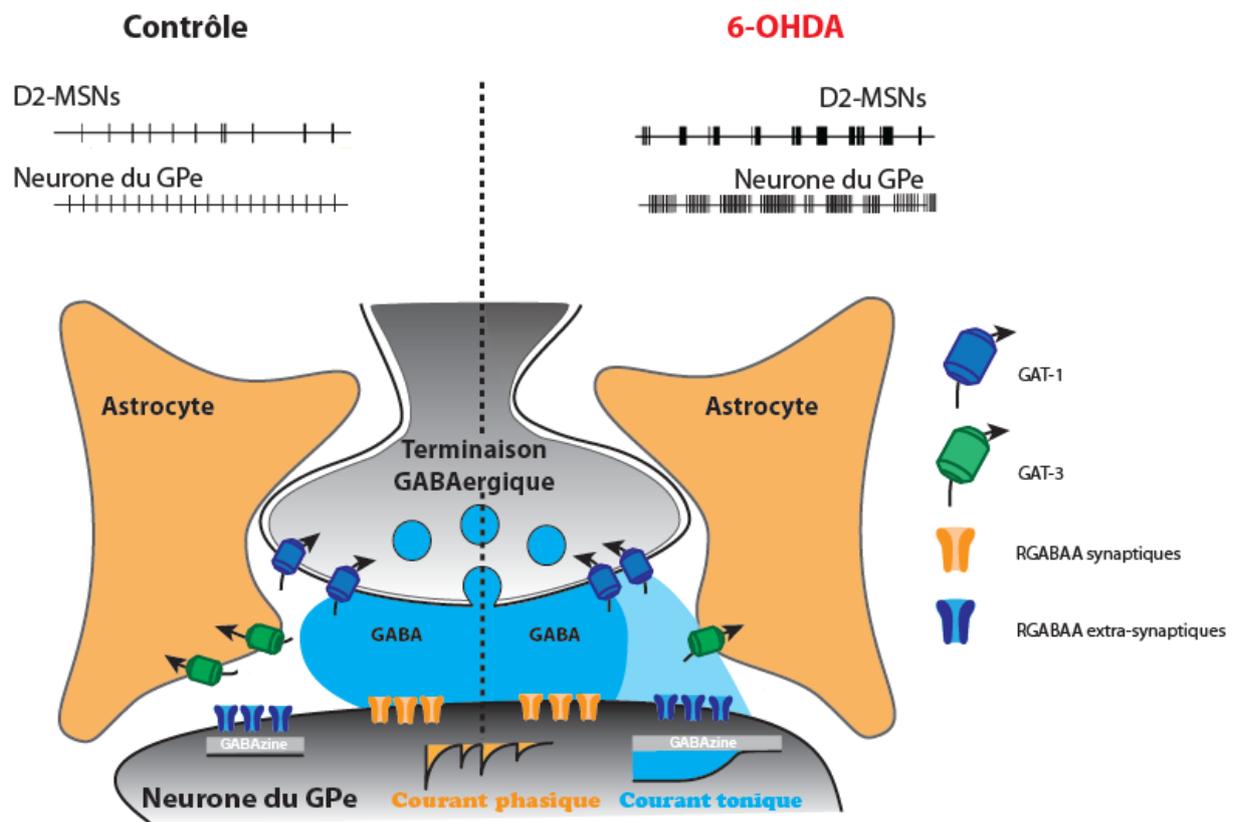


Figure 43: Schéma récapitulatif des résultats obtenus (Article 1 et 2) montrant les modifications se produisant à l'échelle du réseau et des synapses GABAergiques dans le GPe chez des modèles animaux de la MP, les rongeurs lésés à la 6-OHDA

II. Modifications GABAergiques dans le GPe chez les souris R6-1, modèle de la MH :

Dans le contexte de ma thèse, j'ai également réalisé une collaboration avec le Dr Maurice Garret où nous avons démontré par l'utilisation de l'électrophysiologie *in vitro*, des modifications de transmission GABAergique dans le GPe de souris R6/1, une souris transgénique modèle de la maladie de Huntington.

La MH est une maladie neurodégénérative caractérisée par des mouvements anormaux nommés « chorées » et une akinésie (Browne & Beal, 2004; Martin & Gusella, 1986). Ces symptômes sont à mettre en lien avec la lésion fondamentale de la MH qui est la

dégénérescence des MSNs striataux notamment ceux de la voie indirecte des GB, projetant sur le GPe (Deng et al, 2004; Graveland et al, 1985a ; Reiner et al, 1988). Certaines altérations caractéristiques de la MH ont été observées chez les patients et les souris transgéniques, modèles de la MH incluant les souris R6/1 que nous avons utilisées pour cette étude. Cependant, les modèles animaux présentent peu de mort neuronale. C'est grâce à cette observation, qu'il a été suggéré que les troubles comportementaux ne proviendraient non pas de la mort neuronale, ou du moins pas dans les phases précoces de la maladie, mais dans un premier temps d'un dysfonctionnement des circuits neuronaux. De nombreuses données corroborent maintenant cette hypothèse. Etant donné que le STR et le GPe sont majoritairement composés de neurones GABAergiques, nous nous sommes concentrés sur l'altération de la transmission GABAergique entre ces deux noyaux. Comme la MH est une maladie neurodégénérative progressive, il pourrait être bénéfique de comparer les altérations entre les stades pré-symptomatiques et symptomatiques. C'est pourquoi, nous avons utilisé ce modèle de souris R6-1 qui présente un grand avantage. L'apparition des premiers symptômes se produit vers l'âge de 4 mois et les souris sont complètement symptomatiques à l'âge de 6 mois. Leur durée de vie est supérieure à 8 mois, ce qui nous a permis de mettre en lien des modifications précoces du système GABAergique se conservant à l'âge symptomatique, avec l'apparition des premiers symptômes moteurs. En raison de l'étroite connectivité entre le STR et le GPe, une altération de fonctionnement des MSNs striataux dans la MH peut potentiellement affecter les propriétés des neurones pallidiaux. De plus, le GPe semble être une cible d'étude prometteuse dans la MH puisque sa manipulation peut améliorer les symptômes moteurs et cognitifs de la maladie (Ayalon et al, 2004 ; Ligot et al, 2011).

Dans cette étude nous avons mis en évidence de nombreux changements du système GABAergique aux stades pré-symptomatiques et symptomatiques de la MH chez les souris R6-1. Nous pouvons notamment noter suite aux expériences de Western blot, des modifications de l'expression des sous-unités composant les récepteurs GABA_A telle qu'une diminution d'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 2$ dans le GPe aux stades pré-symptomatiques (2 mois) et symptomatiques (6 mois). Comme ces sous-unités sont les plus abondantes dans le GPe, cette constatation indique que le nombre de récepteurs GABA_A peut éventuellement être réduit même à l'âge pré-symptomatique. Il est cependant possible que la diminution de ces sous-unités soit compensée par d'autres sous-unités qui pourraient remplacer les sous-unités manquantes dans les récepteurs GABA_A. De manière contradictoire, Il a été reporté dans le cerveau post-mortem de patients atteints de la MH, que l'expression des sous-unités $\alpha 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ dans le GPe est considérablement augmentée, tandis que celle de la géphyrine est inchangée (Allen et al, 2009 ; Thompson-

Vest et al, 2003 ; Waldvogel & Faull, 2015). Nous avons aussi constaté la réduction de l'expression de protéines post-synaptiques spécifiques des synapses GABAergiques telles que la neuroligin 2 (NL2) et la géphyrine à 2 mois et 6 mois. La géphyrine est la principale protéine d'échafaudage permettant l'ancrage des récepteurs synaptiques au niveau des synapses inhibitrices et NL2 est une protéine d'adhésion cellulaire permettant la formation et la maintenance des synapses. D'autre part, nous avons également détecté une réduction d'expression de GAD67 dans le GPe de souris R6/1 à 2 et 6 mois et de GAD65 plutôt à 6 mois, indiquant que la synthèse de GABA semble réduite même à un âge pré-symptomatique. Ce résultat correspond à une étude d'hybridation *in situ* qui a montré une diminution de l'ARNm de GAD67 dans le GPe de souris R6/2 (Gourfinkel-An et al, 2003). En outre, nous avons observé un changement biphasique d'expression de VGAT dans le GPe de souris R6/1: une réduction significative de l'expression à 2 mois, suivie d'une tendance à la hausse à 6 mois. Le mécanisme de cette modification de VGAT n'est pas clair en raison des liens complexes et des divers sous-types de neurones dans le GPe. La diminution de l'expression de VGAT à l'âge pré-symptomatique peut être associée à une diminution de la GAD67; l'augmentation de VGAT à 6 mois peut être due à un mécanisme de compensation de la réduction de GAD65 car il est rapporté que la GAD65 peut former un complexe avec VGAT pour la régulation de la synthèse et de libération de GABA (Jin et al, 2003).

Nous avons également réalisé des expériences d'électrophysiologies sur tranches aigües de cerveaux de souris R6-1 à 2 mois et 6 mois dans l'optique de corrélérer les changements moléculaires obtenus à des changements de transmission GABAergique. Nos analyses électrophysiologiques ont montré une diminution significative de la fréquence et de l'amplitude de sIPSCs (courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés) dans le GPe des souris R6/1 par rapport aux souris témoins à 2 mois et 6 mois. Cette observation indique que l'altération de la transmission synaptique GABAergique est présente dans le GPe avant l'apparition des symptômes moteurs. De plus, cette altération semble impliquer les éléments à la fois pré et post-synaptiques. Ceci est en accord avec nos résultats de Western blot suggérant une diminution d'expression des récepteurs GABA_A et de réduction de la capacité de synthèse du GABA. Nous avons également étudié les mIPSCs (courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures) dans le GPe de souris R6/1. Les résultats ont montré une diminution de la fréquence, mais pas d'amplitude des mIPSCs aux deux âges, pré-symptomatiques et symptomatiques. Ces données indiquent que l'altération de la neurotransmission GABAergique dans le GPe de souris R6/1 semble principalement due à des altérations pré-synaptiques même si nous remarquons également une modification des paramètres cinétiques des mIPSCs impliquant alors des modifications de l'élément post-synaptique, probablement liés à la modification de la nature des récepteurs GABA_A synaptiques.

Afin de déterminer d'éventuelles modifications des connexions synaptiques GABAergiques dans le GPe, nous avons combiné des expériences immunohistochimies avec l'imagerie confocale et la juxtaposition d'image mosaïque afin de quantifier le nombre de synapses GABAergiques dans les deux types de souris, contrôles et R6/1. Par la co-localisation du marquage de la sous-unité $\alpha 1$ (étant exclusivement post-synaptique) et de VGAT (étant exclusivement pré-synaptique), nous avons défini les synapses GABAergiques du GPe. Les observations semblent indiquer que le nombre total de synapses GABAergiques est réduit dans le GPe de souris R6/1 à 2 mois et à 6 mois. Cela correspond aux observations que nous avons pu faire par les expériences de Western blot et d'électrophysiologie où l'on montre une diminution générale de la transmission GABAergique dans le GPe. Dans leur ensemble, ces résultats montrent que la transmission GABAergique dans le GPe est réduite de manière précoce, à un stade asymptotique chez les souris R6/1 et que cette réduction est maintenue au stade symptomatique. Cette réduction de transmission GABAergique semble due à une réduction du nombre de synapses GABAergiques.

Bibliographie:

Bibliographie

- Abdi A, Mallet N, Mohamed FY, Sharott A, Dodson PD, Nakamura KC, Suri S, Avery SV, Larvin JT, Garas FN, Garas SN, Vinciati F, Morin S, Bezard E, Baufreton J, Magill PJ (2015) Prototypic and arky pallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 6667-6688
- Abedi PM, Delaville C, De Deurwaerdere 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
- Accorsi-Mendonca D, Zoccal DB, Bonagamba LG, Machado BH (2013) Glial cells modulate the synaptic transmission of NTS neurons sending projections to ventral medulla of Wistar rats. *Physiological reports* **1**: e00080
- Ade KK, Janssen MJ, Ortinski PI, Vicini S (2008) Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 1185-1197
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 9430-9444
- Akaike N, Yakushiji T, Tokutomi N, Carpenter DO (1987) Multiple mechanisms of antagonism of gamma-aminobutyric acid (GABA) responses. *Cellular and molecular neurobiology* **7**: 97-103
- 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
- Allen KL, Waldvogel HJ, Glass M, Faull RL (2009) Cannabinoid (CB(1)), GABA(A) and GABA(B) receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. *Journal of chemical neuroanatomy* **37**: 266-281
- An JJ, Bae MH, Cho SR, Lee SH, Choi SH, Lee BH, Shin HS, Kim YN, Park KW, Borrelli E, Baik JH (2004) Altered GABAergic neurotransmission in mice lacking dopamine D2 receptors. *Molecular and cellular neurosciences* **25**: 732-741
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters* **565**: 23-29
- Andrew S, Theilmann J, Almqvist E, Norremolle A, Lucotte G, Anvret M, Sorensen SA, Turpin JC, Hayden MR (1993) DNA analysis of distinct populations suggests multiple origins for the mutation causing Huntington disease. *Clinical genetics* **43**: 286-294

- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 2443-2450
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences* **22**: 208-215
- Arslan A, von Engelhardt J, Wisden W (2014) Cytoplasmic domain of delta subunit is important for the extra-synaptic targeting of GABAA receptor subtypes. *Journal of integrative neuroscience* **13**: 617-631
- Ayalon L, Doron R, Weiner I, Joel D (2004) Amelioration of behavioral deficits in a rat model of Huntington's disease by an excitotoxic lesion to the globus pallidus. *Experimental neurology* **186**: 46-58
- Aylward EH, Codori AM, Barta PE, Pearlson GD, Harris GJ, Brandt J (1996) Basal ganglia volume and proximity to onset in presymptomatic Huntington disease. *Archives of neurology* **53**: 1293-1296
- Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Molecular pharmacology* **59**: 814-824
- Barakat L, Bordey A (2002) GAT-1 and reversible GABA transport in Bergmann glia in slices. *Journal of neurophysiology* **88**: 1407-1419
- Barakat L, Wang D, Bordey A (2002) Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. *The Journal of physiology* **541**: 753-767
- Baranauskas G, Tkatch T, Surmeier DJ (1999) Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 K(+) channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 6394-6404
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological reviews* **50**: 291-313
- Barres BA, Koroshetz WJ, Swartz KJ, Chun LL, Corey DP (1990) Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron* **4**: 507-524
- Baufreton J, Atherton JF, Surmeier DJ, Bevan MD (2005a) Enhancement of excitatory synaptic integration by GABAergic inhibition in the subthalamic nucleus. *J Neurosci* **25**: 8505-8517
- 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**: 2121-2142
- Baufreton J, Kirkham E, Atherton JF, Menard A, Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2009) Sparse but selective and potent synaptic transmission from the globus pallidus to the subthalamic nucleus. *J Neurophysiol* **102**: 532-545

- Baufreton J, Zhu ZT, Garret M, Bioulac B, Johnson SW, Taupignon AI (2005b) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *FASEB J* **19**: 1771-1777
- Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovin H, Abeles M, Vaadia E (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends in neurosciences* **21**: 32-38
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* **249**: 1436-1438
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of neurophysiology* **72**: 507-520
- Bernard V, Bolam JP (1998) Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: co-localization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *The European journal of neuroscience* **10**: 3721-3736
- Bernardinelli Y, Magistretti PJ, Chatton JY (2004) Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 14937-14942
- Berthele A, Laurie DJ, Platzer S, Zieglgansberger W, Tolle TR, Sommer B (1998) Differential expression of rat and human type I metabotropic glutamate receptor splice variant messenger RNAs. *Neuroscience* **85**: 733-749
- Bertran-Gonzalez J, Herve D, Girault JA, Valjent E (2010) What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front Neuroanat* **4**
- Beste C, Muckschel M, Elben S, C JH, McIntyre CC, Saft C, Vesper J, Schnitzler A, Wojtecki L (2015) Behavioral and neurophysiological evidence for the enhancement of cognitive control under dorsal pallidal deep brain stimulation in Huntington's disease. *Brain structure & function* **220**: 2441-2448
- Bevan MD, Booth PA, Eaton SA, Bolam JP (1998) Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 9438-9452
- Bevan MD, Magill PJ, Hallworth NE, Bolam JP, Wilson CJ (2002) Regulation of the timing and pattern of action potential generation in rat subthalamic neurons in vitro by GABA-A IPSPs. *Journal of neurophysiology* **87**: 1348-1362
- Bezzi P, Volterra A (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Current opinion in neurobiology* **11**: 387-394
- Bianchi MT, Haas KF, Macdonald RL (2001) Structural determinants of fast desensitization and desensitization-deactivation coupling in GABA_A receptors. *J Neurosci* **21**: 1127-1136
- Billings LM, Marshall JF (2003) D2 antagonist-induced c-fos in an identified subpopulation of globus pallidus neurons by a direct intrapallidal action. *Brain research* **964**: 237-243
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism & related disorders* **14 Suppl 2**: S124-129

- Blomqvist A, Broman J (1988) Light and electron microscopic immunohistochemical demonstration of GABA-immunoreactive astrocytes in the brain stem of the rat. *Journal of neurocytology* **17**: 629-637
- Bogenpohl J, Galvan A, Hu X, Wichmann T, Smith Y (2013) Metabotropic glutamate receptor 4 in the basal ganglia of parkinsonian monkeys: ultrastructural localization and electrophysiological effects of activation in the striatopallidal complex. *Neuropharmacology* **66**: 242-252
- Bohme I, Rabe H, Luddens H (2004) Four amino acids in the alpha subunits determine the gamma-aminobutyric acid sensitivities of GABAA receptor subtypes. *The Journal of biological chemistry* **279**: 35193-35200
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy* **196 (Pt 4)**: 527-542
- Bolam JP, Smith Y (1992) The striatum and the globus pallidus send convergent synaptic inputs onto single cells in the entopeduncular nucleus of the rat: a double anterograde labelling study combined with postembedding immunocytochemistry for GABA. *The Journal of comparative neurology* **321**: 456-476
- Borden LA (1996) GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochemistry international* **29**: 335-356
- Botta P, Demmou L, Kasugai Y, Markovic M, Xu C, Fadok JP, Lu T, Poe MM, Xu L, Cook JM, Rudolph U, Sah P, Ferraguti F, Luthi A (2015) Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition. *Nat Neurosci* **18**: 1493-1500
- Bowser DN, Khakh BS (2007) Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *The Journal of general physiology* **129**: 485-491
- Boyes J, Bolam JP (2007) Localization of GABA receptors in the basal ganglia. *Progress in brain research* **160**: 229-243
- Braat S, Kooy RF (2015) The GABA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* **86**: 1119-1130
- Brambilla R, Cottini L, Fumagalli M, Ceruti S, Abbracchio MP (2003) Blockade of A2A adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia* **43**: 190-194
- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M (1996) Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *The Journal of physiology* **497 (Pt 3)**: 753-759
- Brickley SG, Mody I (2012) Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* **73**: 23-34
- Bright DP, Brickley SG (2008) Acting locally but sensing globally: impact of GABAergic synaptic plasticity on phasic and tonic inhibition in the thalamus. *J Physiol* **586**: 5091-5099
- Bright DP, Smart TG (2013) Methods for recording and measuring tonic GABAA receptor-mediated inhibition. *Front Neural Circuits* **7**: 193

- Brooks SP, Janghra N, Workman VL, Bayram-Weston Z, Jones L, Dunnett SB (2012) Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in R6/1 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice. *Brain research bulletin* **88**: 94-103
- Broux B, Gowing E, Prat A (2015) Glial regulation of the blood-brain barrier in health and disease. *Seminars in immunopathology*
- Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA (2002) Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *British journal of pharmacology* **136**: 965-974
- Browne SE, Beal MF (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochemical research* **29**: 531-546
- Brunig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM (2002) Intact sorting, targeting, and clustering of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *The Journal of comparative neurology* **443**: 43-55
- Buddhala C, Hsu CC, Wu JY (2009) A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochemistry international* **55**: 9-12
- Bugaysen J, Bar-Gad I, Korngreen A (2013) Continuous modulation of action potential firing by a unitary GABAergic connection in the globus pallidus in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 12805-12809
- Bugaysen J, Bronfeld M, Tischler H, Bar-Gad I, Korngreen A (2010) Electrophysiological characteristics of globus pallidus neurons. *PLoS one* **5**: e12001
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 183-192
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**: 611-622
- Callahan JW, Kovalesky RF, Chu HY, Chazalon M, Wokosin D, Atherton JF, Normand E, Morin S, Chan CS, Surmeier DJ, Baufreton J, Bevan MD (In preparation) Optogenetic interrogation of abnormal subthalamic nucleus-external globus pallidus network activity following the loss of dopamine.
- Calne DB, Keibarian J, Silbergeld E, Everts E (1979) Advances in the neuropharmacology of Parkinsonism. *Annals of internal medicine* **90**: 219-229
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belevi D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA (2004) Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3662-3667
- Caramins M, Halliday G, McCusker E, Trent RJ (2003) Genetically confirmed clinical Huntington's disease with no observable cell loss. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **74**: 968-970

- Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacological reviews* **11**: 490-493
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* **180**: 1200
- Cayzac S, Delcasso S, Paz V, Jeantet Y, Cho YH (2011) Changes in striatal procedural memory coding correlate with learning deficits in a mouse model of Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 9280-9285
- Cazorla M, de Carvalho FD, Chohan MO, Shegda M, Chuhma N, Rayport S, Ahmari SE, Moore H, Kellendonk C (2014) Dopamine D2 receptors regulate the anatomical and functional balance of basal ganglia circuitry. *Neuron* **81**: 153-164
- Cepeda C, Galvan L, Holley SM, Rao SP, Andre VM, Botelho EP, Chen JY, Watson JB, Deisseroth K, Levine MS (2013) Multiple sources of striatal inhibition are differentially affected in Huntington's disease mouse models. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 7393-7406
- Cepeda C, Hurst RS, Calvert CR, Hernandez-Echeagaray E, Nguyen OK, Jocoy E, Christian LJ, Ariano MA, Levine MS (2003) Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 961-969
- Cepeda C, Starling AJ, Wu N, Nguyen OK, Uzgil B, Soda T, Andre VM, Ariano MA, Levine MS (2004) Increased GABAergic function in mouse models of Huntington's disease: reversal by BDNF. *Journal of neuroscience research* **78**: 855-867
- Cepeda C, Wu N, Andre VM, Cummings DM, Levine MS (2007) The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Progress in neurobiology* **81**: 253-271
- Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, Lewis AS, Goldberg AB, Tkatch T, Shigemoto R, Fleming SM, Chetkovich DM, Osten P, Kita H, Surmeier DJ (2011) HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **14**: 85-92
- Chan CS, Shigemoto R, Mercer JN, Surmeier DJ (2004) HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 9921-9932
- Charara A, Pare JF, Levey AI, Smith Y (2005) Synaptic and extrasynaptic GABA-A and GABA-B receptors in the globus pallidus: an electron microscopic immunogold analysis in monkeys. *Neuroscience* **131**: 917-933
- Charara A, Parent A (1994) Brainstem dopaminergic, cholinergic and serotonergic afferents to the pallidum in the squirrel monkey. *Brain research* **640**: 155-170
- Charron G, Doudnikoff E, Canron MH, Li Q, Vega C, Marais S, Baufreton J, Vital A, Oliet SH, Bezard E (2014) Astrocytosis in parkinsonism: considering tripartite striatal synapses in physiopathology? *Frontiers in aging neuroscience* **6**: 258

- Chaumont S, Andre C, Perrais D, Boue-Grabot E, Taly A, Garret M (2013) Agonist-dependent endocytosis of gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors revealed by a gamma2(R43Q) epilepsy mutation. *The Journal of biological chemistry* **288**: 28254-28265
- Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli N, Jr., Schwarzschild MA (2001) Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: RC143
- Chen K, Wang JJ, Yung WH, Chan YS, Chow BK (2005a) Excitatory effect of histamine on neuronal activity of rat globus pallidus by activation of H2 receptors in vitro. *Neuroscience research* **53**: 288-297
- Chen L, Chan SC, Yung WH (2002) Rotational behavior and electrophysiological effects induced by GABA(B) receptor activation in rat globus pallidus. *Neuroscience* **114**: 417-425
- Chen L, Chan YS, Yung WH (2004a) GABA-B receptor activation in the rat globus pallidus potently suppresses pentylentetrazol-induced tonic seizures. *Journal of biomedical science* **11**: 457-464
- Chen L, Savio Chan C, Yung WH (2004b) Electrophysiological and behavioral effects of zolpidem in rat globus pallidus. *Experimental neurology* **186**: 212-220
- Chen L, Yung KK, Yung WH (2004c) Neurotensin depolarizes globus pallidus neurons in rats via neurotensin type-1 receptor. *Neuroscience* **125**: 853-859
- Chen L, Yung WH (2003) Effects of the GABA-uptake inhibitor tiagabine in rat globus pallidus. *Experimental brain research* **152**: 263-269
- Chen LW, Yung KL, Chan YS (2005b) Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease. *Current drug targets* **6**: 821-833
- Chen MC, Ferrari L, Sacchet MD, Foland-Ross LC, Qiu MH, Gotlib IH, Fuller PM, Arrigoni E, Lu J (2015a) Identification of a direct GABAergic pallidocortical pathway in rodents. *The European journal of neuroscience*
- Chen MC, Ferrari L, Sacchet MD, Foland-Ross LC, Qiu MH, Gotlib IH, Fuller PM, Arrigoni E, Lu J (2015b) Identification of a direct GABAergic pallidocortical pathway in rodents. *The European journal of neuroscience* **41**: 748-759
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**: 156-159
- Chu HY, Atherton JF, Wokosin D, Surmeier DJ, Bevan MD (2015) Heterosynaptic regulation of external globus pallidus inputs to the subthalamic nucleus by the motor cortex. *Neuron* **85**: 364-376
- Chuhma N, Tanaka KF, Hen R, Rayport S (2011) Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 1183-1192
- 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

- Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, Sunahara R, Hartney A, Tiberi M, Rye DB, Caron MG, Niznik HB, Levey AI (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* **37**: 125-145
- Clarke DD, Nicklas WJ, Berl S (1970) Tricarboxylic acid-cycle metabolism in brain. Effect of fluoroacetate and fluorocitrate on the labelling of glutamate, aspartate, glutamine and gamma-aminobutyrate. *The Biochemical journal* **120**: 345-351
- Clarke LE, Attwell D (2012) An astrocyte TRP switch for inhibition. *Nat Neurosci* **15**: 3-4
- Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST (2010) Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature* **468**: 305-309
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* **378**: 75-78
- Cohen-Gadol AA, Pan JW, Kim JH, Spencer DD, Hetherington HH (2004) Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis. *Journal of neurosurgery* **101**: 613-620
- Cohen G (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* **5**: 77-82
- Connelly WM, Schulz JM, Lees G, Reynolds JN (2010) Differential short-term plasticity at convergent inhibitory synapses to the substantia nigra pars reticulata. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 14854-14861
- Cooper AJ, Stanford IM (2000) Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone in vitro. *The Journal of physiology* **527 Pt 2**: 291-304
- Cooper AJ, Stanford IM (2001) Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* **41**: 62-71
- Cooper AJ, Stanford IM (2002) Calbindin D-28k positive projection neurones and calretinin positive interneurons of the rat globus pallidus. *Brain research* **929**: 243-251
- Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orban G, Errington AC, Lorincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V (2009) Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy. *Nature medicine* **15**: 1392-1398
- Cope DW, Hughes SW, Crunelli V (2005) GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 11553-11563
- Corey JL, Davidson N, Lester HA, Brecha N, Quick MW (1994) Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *The Journal of biological chemistry* **269**: 14759-14767
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* **247**: 470-473
- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain research bulletin* **25**: 271-284

- Cosin C, Sibon I, Poli M, Allard M, Debruxelles S, Renou P, Rouanet F, Mayo W (2014) Circadian sleep/wake rhythm abnormalities as a risk factor of a poststroke apathy. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*
- Costa E, Guidotti A, Veldic M (2005) Should allosteric positive modulators of GABA(A) receptors be tested in the treatment of schizophrenia? *Schizophrenia research* **73**: 367-368
- Coulter CL, Happe HK, Bergman DA, Murrin LC (1995) Localization and quantification of the dopamine transporter: comparison of [3H]WIN 35,428 and [125I]RTI-55. *Brain research* **690**: 217-224
- Crippa D, Schenk U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, Pozzan T, Matteoli M, Carmignoto G (2006) Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *The Journal of physiology* **570**: 567-582
- Cristovao-Ferreira S, Navarro G, Brugarolas M, Perez-Capote K, Vaz SH, Fattorini G, Conti F, Lluís C, Ribeiro JA, McCormick PJ, Casado V, Franco R, Sebastiao AM (2011) Modulation of GABA transport by adenosine A1R-A2AR heteromers, which are coupled to both Gs- and G(i/o)-proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 15629-15639
- Cristovao-Ferreira S, Navarro G, Brugarolas M, Perez-Capote K, Vaz SH, Fattorini G, Conti F, Lluís C, Ribeiro JA, McCormick PJ, Casado V, Franco R, Sebastiao AM (2013) A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and G i/o proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic signalling* **9**: 433-449
- Crook ZR, Housman D (2011) Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? *Neuron* **69**: 423-435
- Cruz AV, Mallet N, Magill PJ, Brown P, Averbeck BB (2009) Effects of dopamine depletion on network entropy in the external globus pallidus. *Journal of neurophysiology* **102**: 1092-1102
- 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
- Cui QL, Yung WH, Xue Y, Chen L (2007) Substance P excites globus pallidus neurons in vivo. *The European journal of neuroscience* **26**: 1853-1861
- Cummings DM, Milnerwood AJ, Dallerac GM, Vatsavayai SC, Hirst MC, Murphy KP (2007) Abnormal cortical synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease. *Brain research bulletin* **72**: 103-107
- Dawson TM, Ko HS, Dawson VL (2010) Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* **66**: 646-661
- Deak F, Shin OH, Kavalali ET, Sudhof TC (2006) Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 6668-6676
- Debeir T, Ginestet L, Francois C, Laurens S, Martel JC, Chopin P, Marien M, Colpaert F, Raisman-Vozari R (2005) Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental neurology* **193**: 444-454

- Decressac M, Mattsson B, Bjorklund A (2012a) Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and alpha-synuclein rat models of Parkinson's disease. *Experimental neurology* **235**: 306-315
- Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Bjorklund A (2012b) Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiology of disease* **45**: 939-953
- Deister CA, Chan CS, Surmeier DJ, Wilson CJ (2009) Calcium-activated SK channels influence voltage-gated ion channels to determine the precision of firing in globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 8452-8461
- Deister CA, Dodla R, Barraza D, Kita H, Wilson CJ (2013) Firing rate and pattern heterogeneity in the globus pallidus arise from a single neuronal population. *Journal of neurophysiology* **109**: 497-506
- DeLong MR (1971) Activity of pallidal neurons during movement. *Journal of neurophysiology* **34**: 414-427
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* **13**: 281-285
- Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2002) Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* **36**: 1051-1061
- Deng YP, Albin RL, Penney JB, Young AB, Anderson KD, Reiner A (2004) Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *Journal of chemical neuroanatomy* **27**: 143-164
- Deniau JM, Hammond C, Chevalier G, Feger J (1978) Evidence for branched subthalamic nucleus projections to substantia nigra, entopeduncular nucleus and globus pallidus. *Neuroscience letters* **9**: 117-121
- Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **11**: 1421-1432
- Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, Stanwood GD, Woodward EL, Head SR, Sutcliffe JG, Thomas EA (2006) Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* **96**: 743-757
- Di Cara B, Dusticier N, Forni C, Lievens JC, Daszuta A (2001) Serotonin depletion produces long lasting increase in striatal glutamatergic transmission. *Journal of neurochemistry* **78**: 240-248
- Di Cara B, Samuel D, Salin P, Kerkerian-Le Goff L, Daszuta A (2003) Serotonergic regulation of the GABAergic transmission in the rat basal ganglia. *Synapse* **50**: 144-150
- Diaz MR, Wadleigh A, Hughes BA, Woodward JJ, Valenzuela CF (2012) Bestrophin1 Channels are Insensitive to Ethanol and Do not Mediate Tonic GABAergic Currents in Cerebellar Granule Cells. *Frontiers in neuroscience* **5**: 148

- Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D, Jenkins M, Petrou S, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF, Macdonald RL, Mulley JC (2004) GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Human molecular genetics* **13**: 1315-1319
- Difiglia M, Pasik P, Pasik T (1982) A Golgi and ultrastructural study of the monkey globus pallidus. *The Journal of comparative neurology* **212**: 53-75
- Difiglia M, Pasik T, Pasik P (1980) Ultrastructure of Golgi-impregnated and gold-toned spiny and aspiny neurons in the monkey neostriatum. *Journal of neurocytology* **9**: 471-492
- Divac I, Mogensen J, Marinkovic S, Martensson R (1987) On the projections from the neostriatum to the cerebral cortex: the "displaced" neurons. *Neuroscience* **21**: 197-205
- Dodson PD, Larvin JT, Duffell JM, Garas FN, Doig NM, Kessar N, Duguid IC, Bogacz R, Butt SJ, Magill PJ (2015) Distinct developmental origins manifest in the specialized encoding of movement by adult neurons of the external globus pallidus. *Neuron* **86**: 501-513
- Drasbek KR, Hoestgaard-Jensen K, Jensen K (2007) Modulation of extrasynaptic THIP conductances by GABAA-receptor modulators in mouse neocortex. *Journal of neurophysiology* **97**: 2293-2300
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Swanson RA (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 1320-1328
- Duguid I, Branco T, London M, Chadderton P, Hausser M (2012) Tonic inhibition enhances fidelity of sensory information transmission in the cerebellar cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**: 11132-11143
- Durkin MM, Smith KE, Borden LA, Weinshank RL, Branchek TA, Gustafson EL (1995) Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in rat brain: an in situ hybridization study. *Brain research Molecular brain research* **33**: 7-21
- Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin JP, Prezeau L (2002) A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**: 3236-3241
- Eid L, Champigny MF, Parent A, Parent M (2013) Quantitative and ultrastructural study of serotonin innervation of the globus pallidus in squirrel monkeys. *The European journal of neuroscience* **37**: 1659-1668
- Eid L, Parent M (2015) Morphological evidence for dopamine interactions with pallidal neurons in primates. *Front Neuroanat* **9**: 111
- Elias S, Joshua M, Goldberg JA, Heimer G, Arkadir D, Morris G, Bergman H (2007) Statistical properties of pauses of the high-frequency discharge neurons in the external segment of the globus pallidus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 2525-2538
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* **25**: 1439-1451

- Erkkila BE, Sedelnikova AV, Weiss DS (2008) Stoichiometric pore mutations of the GABAAR reveal a pattern of hydrogen bonding with picrotoxin. *Biophysical journal* **94**: 4299-4306
- Ernst M, Brauchart D, Boresch S, Sieghart W (2003) Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* **119**: 933-943
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**: 563-571
- Fadda P, Fratta W (1997) Stress-induced sleep deprivation modifies corticotropin releasing factor (CRF) levels and CRF binding in rat brain and pituitary. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **35**: 443-446
- Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *The Journal of comparative neurology* **180**: 545-580
- Falls WM, Park MR, Kitai ST (1983) An intracellular HRP study of the rat globus pallidus. II. Fine structural characteristics and synaptic connections of medially located large GP neurons. *The Journal of comparative neurology* **221**: 229-245
- Fan KY, Baufreton J, Surmeier DJ, Chan CS, Bevan MD (2012) Proliferation of external globus pallidus-subthalamic nucleus synapses following degeneration of midbrain dopamine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**: 13718-13728
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature reviews Neuroscience* **6**: 215-229
- Feigenspan A, Bormann J (1994) Differential pharmacology of GABAA and GABAC receptors on rat retinal bipolar cells. *European journal of pharmacology* **288**: 97-104
- Ferando I, Mody I (2014) Interneuronal GABAA receptors inside and outside of synapses. *Current opinion in neurobiology* **26**: 57-63
- Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, Morrissey EE, Walsh CA (2003) Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *The Journal of comparative neurology* **460**: 266-279
- Fernandez-Suarez D, Celorrio M, Lanciego JL, Franco R, Aymerich MS (2012) Loss of parvalbumin-positive neurons from the globus pallidus in animal models of Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **71**: 973-982
- Fiacco TA, McCarthy KD (2006) Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* **54**: 676-690
- Filion M, Tremblay L (1991) Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain research* **547**: 142-151
- Filion M, Tremblay L, Bedard PJ (1991) Effects of dopamine agonists on the spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain research* **547**: 152-161

- Fink-Jensen A, Suzdak PD, Swedberg MD, Judge ME, Hansen L, Nielsen PG (1992) The gamma-aminobutyric acid (GABA) uptake inhibitor, tiagabine, increases extracellular brain levels of GABA in awake rats. *European journal of pharmacology* **220**: 197-201
- Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, Reppert SM (1992) Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain research Molecular brain research* **14**: 186-195
- Fisher SP, Black SW, Schwartz MD, Wilk AJ, Chen TM, Lincoln WU, Liu HW, Kilduff TS, Morairty SR (2013) Longitudinal analysis of the electroencephalogram and sleep phenotype in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain : a journal of neurology* **136**: 2159-2172
- Fisher SP, Godinho SI, Potheary CA, Hankins MW, Foster RG, Peirson SN (2012) Rapid assessment of sleep-wake behavior in mice. *Journal of biological rhythms* **27**: 48-58
- Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D (1990) Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neuroscience letters* **116**: 136-140
- Floran B, Floran L, Sierra A, Aceves J (1997) D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neuroscience letters* **237**: 1-4
- Fogarty MJ, Hammond LA, Kanjhan R, Bellingham MC, Noakes PG (2013) A method for the three-dimensional reconstruction of Neurobiotin-filled neurons and the location of their synaptic inputs. *Frontiers in neural circuits* **7**: 153
- Foster JD, Vaughan RA (2011) Palmitoylation controls dopamine transporter kinetics, degradation, and protein kinase C-dependent regulation. *The Journal of biological chemistry* **286**: 5175-5186
- Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **42**: 327-340
- Francelle L, Galvan L, Brouillet E (2014) Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 295
- Francois C, Percheron G, Yelnik J, Heyner S (1984) A Golgi analysis of the primate globus pallidus. I. Inconstant processes of large neurons, other neuronal types, and afferent axons. *The Journal of comparative neurology* **227**: 182-199
- Frank C, Pari G, Rossiter JP (2006) Approach to diagnosis of Parkinson disease. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* **52**: 862-868
- Frank MJ, Seeberger LC, O'Reilly R C (2004) By carrot or by stick: cognitive reinforcement learning in parkinsonism. *Science* **306**: 1940-1943
- Frerking M, Petersen CC, Nicoll RA (1999) Mechanisms underlying kainate receptor-mediated disinhibition in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 12917-12922
- Frey JM, Huffman RD (1985) Effects of enkephalin and morphine on rat globus pallidus neurons. *Brain research bulletin* **14**: 251-259

- Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in neurosciences* **31**: 257-264
- Fujiyama F, Sohn J, Nakano T, Furuta T, Nakamura KC, Matsuda W, Kaneko T (2011) Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *The European journal of neuroscience* **33**: 668-677
- Galeffi F, Bianchi L, Bolam JP, Della Corte L (2003) The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *The European journal of neuroscience* **18**: 856-868
- Galvan A, Floran B, Erij D, Aceves J (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm* **108**: 153-166
- Galvan A, Hu X, Smith Y, Wichmann T (2010) Localization and function of GABA transporters in the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Experimental neurology* **223**: 505-515
- 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, Villalba RM, West SM, Maidment NT, Ackerson LC, Smith Y, Wichmann T (2005) GABAergic modulation of the activity of globus pallidus neurons in primates: in vivo analysis of the functions of GABA receptors and GABA transporters. *Journal of neurophysiology* **94**: 990-1000
- Galvan A, Wichmann T (2007) GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders. *Progress in brain research* **160**: 287-312
- Galvez T, Prezeau L, Milioti G, Franek M, Joly C, Froestl W, Bettler B, Bertrand HO, Blahos J, Pin JP (2000) Mapping the agonist-binding site of GABAB type 1 subunit sheds light on the activation process of GABAB receptors. *The Journal of biological chemistry* **275**: 41166-41174
- Gardiner TW, Kitai ST (1992) Single-unit activity in the globus pallidus and neostriatum of the rat during performance of a trained head movement. *Experimental brain research* **88**: 517-530
- Gatev P, Darbin O, Wichmann T (2006) Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **21**: 1566-1577
- Gerashchenko D, Blanco-Centurion CA, Miller JD, Shiromani PJ (2006) Insomnia following hypocretin2-saporin lesions of the substantia nigra. *Neuroscience* **137**: 29-36
- Gerfen CR, Engber TM (1992) Molecular neuroanatomic mechanisms of Parkinson's disease: a proposed therapeutic approach. *Neurologic clinics* **10**: 435-449
- 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
- Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends in neurosciences* **19**: 319-325

- Gittis AH, Berke JD, Bevan MD, Chan CS, Mallet N, Morrow MM, Schmidt R (2014) New roles for the external globus pallidus in basal ganglia circuits and behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**: 15178-15183
- Glass M, Dragunow M, Faull RL (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* **97**: 505-519
- Glykys J, Mann EO, Mody I (2008) Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 1421-1426
- Glykys J, Mody I (2007) The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *The Journal of physiology* **582**: 1163-1178
- Glykys J, Peng Z, Chandra D, Homanics GE, Houser CR, Mody I (2007) A new naturally occurring GABA(A) receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat Neurosci* **10**: 40-48
- Goetz T, Arslan A, Wisden W, Wulff P (2007) GABA(A) receptors: structure and function in the basal ganglia. *Progress in brain research* **160**: 21-41
- Gomide V, Chadi G (2005) Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis. *The International journal of neuroscience* **115**: 537-555
- Goncalves B, Adamowicz T, Louzada FM, Moreno CR, Araujo JF (2015) A fresh look at the use of nonparametric analysis in actimetry. *Sleep medicine reviews* **20C**: 84-91
- Gonzalez B, Paz F, Floran L, Aceves J, Erlij D, Floran B (2006) Adenosine A2A receptor stimulation decreases GAT-1-mediated GABA uptake in the globus pallidus of the rat. *Neuropharmacology* **51**: 154-159
- Goodman AO, Rogers L, Pilsworth S, McAllister CJ, Shneerson JM, Morton AJ, Barker RA (2011) Asymptomatic sleep abnormalities are a common early feature in patients with Huntington's disease. *Current neurology and neuroscience reports* **11**: 211-217
- Gourfinkel-An I, Parain K, Hartmann A, Mangiarini L, Brice A, Bates G, Hirsch EC (2003) Changes in GAD67 mRNA expression evidenced by in situ hybridization in the brain of R6/2 transgenic mice. *Journal of neurochemistry* **86**: 1369-1378
- Grass D, Pawlowski PG, Hirrlinger J, Papadopoulos N, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsman S (2004) Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 1358-1365
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985a) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* **227**: 770-773
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985b) A Golgi study of the human neostriatum: neurons and afferent fibers. *The Journal of comparative neurology* **234**: 317-333

- Gross A, Sims RE, Swinny JD, Sieghart W, Bolam JP, Stanford IM (2011) Differential localization of GABA(A) receptor subunits in relation to rat striatopallidal and pallidopallidal synapses. *The European journal of neuroscience* **33**: 868-878
- Grove EA, Domesick VB, Nauta WJ (1986) Light microscopic evidence of striatal input to intrapallidal neurons of cholinergic cell group Ch4 in the rat: a study employing the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain research* **367**: 379-384
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Veldic M, Zhang X, Costa E (2005) GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon. *Psychopharmacology* **180**: 191-205
- Gunay C, Edgerton JR, Jaeger D (2008) Channel density distributions explain spiking variability in the globus pallidus: a combined physiology and computer simulation database approach. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 7476-7491
- Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li XJ (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 2522-2534
- Haas KF, Macdonald RL (1999) GABAA receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABAA receptor currents in mouse fibroblasts. *J Physiol* **514 (Pt 1)**: 27-45
- Haber SN, Groenewegen HJ, Grove EA, Nauta WJ (1985) Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato pallidofugal pathway. *The Journal of comparative neurology* **235**: 322-335
- Hadipour-Niktarash A, Rommelfanger KS, Masilamoni GJ, Smith Y, Wichmann T (2012) Extrastriatal D2-like receptors modulate basal ganglia pathways in normal and Parkinsonian monkeys. *Journal of neurophysiology* **107**: 1500-1512
- Hahn MK, Blackford JU, Haman K, Mazei-Robison M, English BA, Prasad HC, Steele A, Hazelwood L, Fentress HM, Myers R, Blakely RD, Sanders-Bush E, Shelton R (2008) Multivariate permutation analysis associates multiple polymorphisms with subphenotypes of major depression. *Genes, brain, and behavior* **7**: 487-495
- Hammond C, Ammari R, Bioulac B, Garcia L (2008) Latest view on the mechanism of action of deep brain stimulation. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **23**: 2111-2121
- Han X (2012) In vivo application of optogenetics for neural circuit analysis. *ACS chemical neuroscience* **3**: 577-584
- Hanchar HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS, Wallner M (2005) Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci* **8**: 339-345
- Hanson JE, Jaeger D (2002) Short-term plasticity shapes the response to simulated normal and parkinsonian input patterns in the globus pallidus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 5164-5172

- Hanson JE, Smith Y (1999) Group I metabotropic glutamate receptors at GABAergic synapses in monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 6488-6496
- Hashimoto K, Kita H (2006) Slow oscillatory activity of rat globus pallidus neurons in vitro. *The European journal of neuroscience* **23**: 443-453
- Hashimoto K, Kita H (2008) Serotonin activates presynaptic and postsynaptic receptors in rat globus pallidus. *Journal of neurophysiology* **99**: 1723-1732
- Hauber W, Lutz S (1999a) Blockade of dopamine D2, but not of D1 receptors in the rat globus pallidus induced Fos-like immunoreactivity in the caudate-putamen, substantia nigra and entopeduncular nucleus. *Neuroscience letters* **271**: 73-76
- Hauber W, Lutz S (1999b) Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behavioural brain research* **106**: 143-150
- Heales SJ, Lam AA, Duncan AJ, Land JM (2004) Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochemical research* **29**: 513-519
- Hedreen JC, DeLong MR (1991) Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque. *The Journal of comparative neurology* **304**: 569-595
- Heja L, Nyitrai G, Kekesi O, Dobolyi A, Szabo P, Fiath R, Ulbert I, Pal-Szenthe B, Palkovits M, Kardos J (2012) Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC biology* **10**: 26
- Hepp R, Perraut M, Chasserot-Golaz S, Galli T, Aunis D, Langley K, Grant NJ (1999) Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23. *Glia* **27**: 181-187
- Hernandez A, Ibanez-Sandoval O, Sierra A, Valdiosera R, Tapia D, Anaya V, Galarraga E, Bargas J, Aceves J (2006) Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *Journal of neurophysiology* **96**: 2877-2888
- Hernandez A, Sierra A, Valdiosera R, Floran B, Erij D, Aceves J (2007) Presynaptic D1 dopamine receptors facilitate glutamatergic neurotransmission in the rat globus pallidus. *Neuroscience letters* **425**: 188-191
- Hernandez VM, Hegeman DJ, Cui Q, Kelder DA, Fiske MP, Glajch KE, Pitt JE, Huang TY, Justice NJ, Chan CS (2015) Parvalbumin+ Neurons and Npas1+ Neurons Are Distinct Neuron Classes in the Mouse External Globus Pallidus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 11830-11847
- Herrero MT, Levy R, Ruberg M, Luquin MR, Villares J, Guillen J, Faucheux B, Javoy-Agid F, Guridi J, Agid Y, Obeso JA, Hirsch EC (1996) Consequence of nigrostriatal denervation and L-dopa therapy on the expression of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in the pallidum. *Neurology* **47**: 219-224
- Hirase H, Qian L, Bartho P, Buzsaki G (2004) Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol* **2**: E96
- Hoerbelt P, Lindsley TA, Fleck MW (2015) Dopamine directly modulates GABAA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 3525-3536

- Hoke A, Silver J (1994) Heterogeneity among astrocytes in reactive gliosis. *Perspectives on developmental neurobiology* **2**: 269-274
- Holsboer F (1999) The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *Journal of psychiatric research* **33**: 181-214
- Hoover BR, Marshall JF (2002) Further characterization of preproenkephalin mRNA-containing cells in the rodent globus pallidus. *Neuroscience* **111**: 111-125
- Hoover BR, Marshall JF (2004) Molecular, chemical, and anatomical characterization of globus pallidus dopamine D2 receptor mRNA-containing neurons. *Synapse* **52**: 100-113
- Hortnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, Kirchmair E, Sieghart W, Sperk G (2013) Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience* **236**: 345-372
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, Smart TG (2003) Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat Neurosci* **6**: 362-369
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2004) Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 4551-4559
- Im MS, Hamilton BJ, Carter DB, Im WB (1992) Selective potentiation of GABA-mediated Cl⁻ current by lanthanum ion in subtypes of cloned GABAA receptors. *Neuroscience letters* **144**: 165-168
- Ingham CA, Hood SH, Mijster MJ, Baldock RA, Arbuthnott GW (1997) Plasticity of striatopallidal terminals following unilateral lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway: a morphological study. *Experimental brain research* **116**: 39-49
- Inoue M, Akaike N (1988) Blockade of gamma-aminobutyric acid-gated chloride current in frog sensory neurons by picrotoxin. *Neuroscience research* **5**: 380-394
- Isaacson JS, Solis JM, Nicoll RA (1993) Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* **10**: 165-175
- Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons. *Neuron* **21**: 633-642
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature reviews Neuroscience* **9**: 331-343
- Jan C, Francois C, Tande D, Yelnik J, Tremblay L, Agid Y, Hirsch E (2000) Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, in MPTP-treated monkeys and in parkinsonian patients. *The European journal of neuroscience* **12**: 4525-4535
- Janssen MJ, Ade KK, Fu Z, Vicini S (2009) Dopamine modulation of GABA tonic conductance in striatal output neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 5116-5126

- Janssen MJ, Yasuda RP, Vicini S (2011) GABA(A) Receptor beta3 Subunit Expression Regulates Tonic Current in Developing Striatopallidal Medium Spiny Neurons. *Front Cell Neurosci* **5**: 15
- Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF (2003) Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 876-882
- Jia F, Pignataro L, Schofield CM, Yue M, Harrison NL, Goldstein PA (2005) An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *Journal of neurophysiology* **94**: 4491-4501
- Jimenez-Gonzalez C, Pirttimaki T, Cope DW, Parri HR (2011) Non-neuronal, slow GABA signalling in the ventrobasal thalamus targets delta-subunit-containing GABA(A) receptors. *The European journal of neuroscience* **33**: 1471-1482
- Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, Floor E, Hsu CC, Kopke RD, Wu JY (2003) Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4293-4298
- Jin XT, Galvan A, Wichmann T, Smith Y (2011a) Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. *Frontiers in systems neuroscience* **5**: 63
- Jin XT, Pare JF, Raju DV, Smith Y (2006) Localization and function of pre- and postsynaptic kainate receptors in the rat globus pallidus. *The European journal of neuroscience* **23**: 374-386
- Jin XT, Pare JF, Smith Y (2011b) Differential localization and function of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in the rat globus pallidus. *The European journal of neuroscience* **33**: 1504-1518
- Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, Chun YE, Park M, Woo DH, Bae JY, Kim T, Lee J, Chun H, Park HJ, Lee da Y, Hong J, Kim HY, Oh SJ, Park SJ, Lee H, Yoon BE, Kim Y, Jeong Y, Shim I, Bae YC, Cho J, Kowall NW, Ryu H, Hwang E, Kim D, Lee CJ (2014) GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature medicine* **20**: 886-896
- John GR, Scemes E, Suadicani SO, Liu JS, Charles PC, Lee SC, Spray DC, Brosnan CF (1999) IL-1beta differentially regulates calcium wave propagation between primary human fetal astrocytes via pathways involving P2 receptors and gap junction channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 11613-11618
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**: 674-679
- Jones MV, Westbrook GL (1995) Desensitized states prolong GABAA channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* **15**: 181-191
- Jones TA, Hawrylak N, Greenough WT (1996) Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment. *Psychoneuroendocrinology* **21**: 189-201

- Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y, Jenner P (1998) Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Annals of neurology* **43**: 507-513
- Kandori H (2015) Ion-pumping microbial rhodopsins. *Frontiers in molecular biosciences* **2**: 52
- Kane-Jackson R, Smith Y (2003) Pre-synaptic kainate receptors in GABAergic and glutamatergic axon terminals in the monkey globus pallidus. *Neuroscience* **122**: 285-289
- Kaneda K, Kita H (2005) Synaptically released GABA activates both pre- and postsynaptic GABA(B) receptors in the rat globus pallidus. *Journal of neurophysiology* **94**: 1104-1114
- Kaneda K, Kita T, Kita H (2007) Repetitive activation of glutamatergic inputs evokes a long-lasting excitation in rat globus pallidus neurons in vitro. *Journal of neurophysiology* **97**: 121-133
- Kaneda K, Tachibana Y, Imanishi M, Kita H, Shigemoto R, Nambu A, Takada M (2005) Down-regulation of metabotropic glutamate receptor 1alpha in globus pallidus and substantia nigra of parkinsonian monkeys. *The European journal of neuroscience* **22**: 3241-3254
- Kaneda M, Farrant M, Cull-Candy SG (1995) Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *The Journal of physiology* **485 (Pt 2)**: 419-435
- Kantor S, Szabo L, Varga J, Cuesta M, Morton AJ (2013) Progressive sleep and electroencephalogram changes in mice carrying the Huntington's disease mutation. *Brain : a journal of neurology* **136**: 2147-2158
- Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ (1991) Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *Journal of neurochemistry* **56**: 720-723
- Kaur S, Saxena RN, Mallick BN (1997) GABA in locus coeruleus regulates spontaneous rapid eye movement sleep by acting on GABAA receptors in freely moving rats. *Neuroscience letters* **223**: 105-108
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in neurosciences* **18**: 527-535
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **10**: 3421-3438
- Kersante F, Rowley SC, Pavlov I, Gutierrez-Mecinas M, Semyanov A, Reul JM, Walker MC, Linthorst AC (2013) A functional role for both -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *The Journal of physiology* **591**: 2429-2441
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, De La Calle A (1998) Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *The Journal of comparative neurology* **402**: 353-371

- 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
- Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M, Grandy DK, Goldman-Rakic PS (2001) An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1964-1969
- Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **10**: 1583-1591
- Kincaid AE, Albin RL, Newman SW, Penney JB, Young AB (1992) 6-Hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway alter the expression of glutamate decarboxylase messenger RNA in rat globus pallidus projection neurons. *Neuroscience* **51**: 705-718
- Kincaid AE, Penney JB, Jr., Young AB, Newman SW (1991) Evidence for a projection from the globus pallidus to the entopeduncular nucleus in the rat. *Neuroscience letters* **128**: 121-125
- Kirmse K, Kirischuk S, Grantyn R (2009) Role of GABA transporter 3 in GABAergic synaptic transmission at striatal output neurons. *Synapse* **63**: 921-929
- Kita H (1994) Parvalbumin-immunopositive neurons in rat globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Brain research* **657**: 31-41
- Kita H (2001) Neostriatal and globus pallidus stimulation induced inhibitory postsynaptic potentials in entopeduncular neurons in rat brain slice preparations. *Neuroscience* **105**: 871-879
- Kita H, Chiken S, Tachibana Y, Nambu A (2006) Origins of GABA(A) and GABA(B) receptor-mediated responses of globus pallidus induced after stimulation of the putamen in the monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 6554-6562
- Kita H, Kita T (2011) Role of Striatum in the Pause and Burst Generation in the Globus Pallidus of 6-OHDA-Treated Rats. *Frontiers in systems neuroscience* **5**: 42
- 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, Kitai ST (1991) Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and responses to neostriatal, subthalamic and nigral stimulation. *Brain research* **564**: 296-305
- Kita H, Kitai ST (1994) The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain research* **636**: 308-319
- Kita H, Nambu A, Kaneda K, Tachibana Y, Takada M (2004) Role of ionotropic glutamatergic and GABAergic inputs on the firing activity of neurons in the external pallidum in awake monkeys. *Journal of neurophysiology* **92**: 3069-3084
- Kita H, Tachibana Y, Nambu A, Chiken S (2005) Balance of monosynaptic excitatory and disynaptic inhibitory responses of the globus pallidus induced after stimulation of the subthalamic nucleus in the monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 8611-8619

- Kita H, Tokuno H, Nambu A (1999) Monkey globus pallidus external segment neurons projecting to the neostriatum. *Neuroreport* **10**: 1467-1472
- Kliem MA, Pare JF, Khan ZU, Wichmann T, Smith Y (2009) Comparative Ultrastructural Analysis of D1 and D5 Dopamine Receptor Distribution in the Substantia Nigra and Globus Pallidus of Monkeys. *Advances in behavioral biology* **58**: 239-253
- Koos T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* **2**: 467-472
- Korosi A, Veening JG, Kozicz T, Henckens M, Dederen J, Groenink L, van der Gugten J, Olivier B, Roubos EW (2006) Distribution and expression of CRF receptor 1 and 2 mRNAs in the CRF over-expressing mouse brain. *Brain research* **1072**: 46-54
- Korshoej AR, Holm MM, Jensen K, Lambert JD (2010) Kinetic analysis of evoked IPSCs discloses mechanism of antagonism of synaptic GABAA receptors by picrotoxin. *British journal of pharmacology* **159**: 636-649
- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10058-10063
- 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
- Krishek BJ, Moss SJ, Smart TG (1996) A functional comparison of the antagonists bicuculline and picrotoxin at recombinant GABAA receptors. *Neuropharmacology* **35**: 1289-1298
- Krishek BJ, Moss SJ, Smart TG (1998) Interaction of H⁺ and Zn²⁺ on recombinant and native rat neuronal GABAA receptors. *The Journal of physiology* **507 (Pt 3)**: 639-652
- Krishnamurthy H, Piscitelli CL, Gouaux E (2009) Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* **459**: 347-355
- Kudo T, Schroeder A, Loh DH, Kuljis D, Jordan MC, Roos KP, Colwell CS (2011) Dysfunctions in circadian behavior and physiology in mouse models of Huntington's disease. *Experimental neurology* **228**: 80-90
- Kuhn A, Goldstein DR, Hodges A, Strand AD, Sengstag T, Kooperberg C, Becanovic K, Pouladi MA, Sathasivam K, Cha JH, Hannan AJ, Hayden MR, Leavitt BR, Dunnett SB, Ferrante RJ, Albin R, Shelbourne P, Delorenzi M, Augood SJ, Faull RL, Olson JM, Bates GP, Jones L, Luthi-Carter R (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human molecular genetics* **16**: 1845-1861
- Kullmann DM, Semyanov A (2002) Glutamatergic modulation of GABAergic signaling among hippocampal interneurons: novel mechanisms regulating hippocampal excitability. *Epilepsia* **43 Suppl 5**: 174-178

- Kultas-Ilinsky K, Leontiev V, Whiting PJ (1998) Expression of 10 GABA(A) receptor subunit messenger RNAs in the motor-related thalamic nuclei and basal ganglia of *Macaca mulatta* studied with in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* **85**: 179-204
- Lahiri S, Quastel JH (1963) Fluoroacetate and the Metabolism of Ammonia in Brain. *The Biochemical journal* **89**: 157-163
- Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, Andrew J, Haydon PG, Pankratov Y (2014) Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* **12**: e1001747
- Laprade N, Soghomonian JJ (1997) Glutamate decarboxylase (GAD65) gene expression is increased by dopamine receptor agonists in a subpopulation of rat striatal neurons. *Brain research Molecular brain research* **48**: 333-345
- Lazar AS, Panin F, Goodman AO, Lazic SE, Lazar ZI, Mason SL, Rogers L, Murgatroyd PR, Watson LP, Singh P, Borowsky B, Shneerson JM, Barker RA (2015) Sleep deficits but no metabolic deficits in premanifest Huntington's disease. *Annals of neurology* **78**: 630-648
- Lazarus M, Chen JF, Urade Y, Huang ZL (2013) Role of the basal ganglia in the control of sleep and wakefulness. *Current opinion in neurobiology* **23**: 780-785
- Le Meur K, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Audinat E (2012) GABA release by hippocampal astrocytes. *Frontiers in computational neuroscience* **6**: 59
- Lebreton F, Cayzac S, Pietropaolo S, Jeantet Y, Cho YH (2015) Sleep Physiology Alterations Precede Plethoric Phenotypic Changes in R6/1 Huntington's Disease Mice. *PLoS one* **10**: e0126972
- Lee M, McGeer EG, McGeer PL (2011a) Mechanisms of GABA release from human astrocytes. *Glia* **59**: 1600-1611
- Lee M, Schwab C, McGeer PL (2011b) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* **59**: 152-165
- Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ (2010) Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* **330**: 790-796
- Lee V, Maguire J (2014) The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front Neural Circuits* **8**: 3
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 8861-8865
- Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, Vargas ME, Jokel ES, Carpenter EM, Zanjani H, Hurst RS, Efstratiadis A, Zeitlin S, Chesselet MF (1999) Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *Journal of neuroscience research* **58**: 515-532
- Levy LM, Ziemann U, Chen R, Cohen LG (2002) Rapid modulation of GABA in sensorimotor cortex induced by acute deafferentation. *Annals of neurology* **52**: 755-761

- Levy R, Hazrati LN, Herrero MT, Vila M, Hassani OK, Mouroux M, Ruberg M, Asensi H, Agid Y, Feger J, Obeso JA, Parent A, Hirsch EC (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neuroscience* **76**: 335-343
- Lievens JC, Birman S (2003) [Huntington chorea in Drosophila and mice: toward new therapeutic steps]. *Med Sci (Paris)* **19**: 593-599
- Lievens JC, Woodman B, Mahal A, Spasic-Bosovic O, Samuel D, Kerkerian-Le Goff L, Bates GP (2001) Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiology of disease* **8**: 807-821
- Ligot N, Krystkowiak P, Simonin C, Goldman S, Peigneux P, Van Naemen J, Monclus M, Lacroix SF, Devos D, Dujardin K, Delmaire C, Bardinet E, Delval A, Delliaux M, Defebvre L, Yelnik J, Blond S, Destee A, De Tieghe X (2011) External globus pallidus stimulation modulates brain connectivity in Huntington's disease. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **31**: 41-46
- Lin CH, Tallaksen-Greene S, Chien WM, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, Ren S, Li XJ, Albin RL, Detloff PJ (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* **10**: 137-144
- Lin JY, Chung KK, de Castro D, Funk GD, Lipski J (2004) Effects of muscarinic acetylcholine receptor activation on membrane currents and intracellular messengers in medium spiny neurones of the rat striatum. *The European journal of neuroscience* **20**: 1219-1230
- Liu CL, Lin YR, Chan MH, Chen HH (2007a) Effects of toluene exposure during brain growth spurt on GABA(A) receptor-mediated functions in juvenile rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **95**: 443-451
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB (2000a) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* **403**: 274-280
- Liu GX, Cai GQ, Cai YQ, Sheng ZJ, Jiang J, Mei Z, Wang ZG, Guo L, Fei J (2007b) Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology* **32**: 1531-1539
- Liu QY, Schaffner AE, Chang YH, Maric D, Barker JL (2000b) Persistent activation of GABA(A) receptor/Cl(-) channels by astrocyte-derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* **84**: 1392-1403
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* **25**: 402-408
- Loepke AW, Istaphanous GK, McAuliffe JJ, 3rd, Miles L, Hughes EA, McCann JC, Harlow KE, Kurth CD, Williams MT, Vorhees CV, Danzer SC (2009) The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. *Anesthesia and analgesia* **108**: 90-104
- Lorincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R, Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* **5**: 1185-1193
- Lukasiewicz PD (1996) GABAC receptors in the vertebrate retina. *Molecular neurobiology* **12**: 181-194

- Luo R, Partridge JG, Vicini S (2013) Distinct roles of synaptic and extrasynaptic GABA receptors in striatal inhibition dynamics. *Front Neural Circuits* **7**: 186
- Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL (2011) GABA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* **70**: 385-409
- Maccaferri G, McBain CJ (1996) The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *The Journal of physiology* **497 (Pt 1)**: 119-130
- Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2000) Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 820-833
- 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
- Magnin M, Morel A, Jeanmonod D (2000) Single-unit analysis of the pallidum, thalamus and subthalamic nucleus in parkinsonian patients. *Neuroscience* **96**: 549-564
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005) Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* **8**: 797-804
- 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
- Mallet N, Micklem BR, Henny P, Brown MT, Williams C, Bolam JP, Nakamura KC, Magill PJ (2012) Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* **74**: 1075-1086
- Mallet N, Pogosyan A, Marton LF, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008a) Parkinsonian beta oscillations in the external globus pallidus and their relationship with subthalamic nucleus activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 14245-14258
- Mallet N, Pogosyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008b) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci* **28**: 4795-4806
- Mamad O, Delaville C, Benjelloun W, Benazzouz A (2015) Dopaminergic control of the globus pallidus through activation of D2 receptors and its impact on the electrical activity of subthalamic nucleus and substantia nigra reticulata neurons. *PLoS one* **10**: e0119152
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**: 493-506
- Manning TJ, Jr., Sontheimer H (1997) Spontaneous intracellular calcium oscillations in cortical astrocytes from a patient with intractable childhood epilepsy (Rasmussen's encephalitis). *Glia* **21**: 332-337

- Marino MJ, Williams DL, Jr., O'Brien JA, Valenti O, McDonald TP, Clements MK, Wang R, DiLella AG, Hess JF, Kinney GG, Conn PJ (2003) Allosteric modulation of group III metabotropic glutamate receptor 4: a potential approach to Parkinson's disease treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13668-13673
- Marshall JF, Henry BL, Billings LM, Hoover BR (2001) The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience* **105**: 365-378
- Martin JB, Gusella JF (1986) Huntington's disease. Pathogenesis and management. *The New England journal of medicine* **315**: 1267-1276
- Martinez-Rodriguez R, Tonda A, Gragera RR, Paz-Doel R, Garcia-Cordovilla R, Fernandez-Fernandez E, Fernandez AM, Gonzalez-Romero F, Lopez-Bravo A (1993) Synaptic and non-synaptic immunolocalization of GABA and glutamate acid decarboxylase (GAD) in cerebellar cortex of rat. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **39**: 115-123
- Maslowski RJ, Napier TC (1991) Effects of D1 and D2 antagonists on apomorphine-induced responses of ventral pallidal neurons. *Neuroreport* **2**: 451-454
- Masson J, Sagne C, Hamon M, El Mestikawy S (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacological reviews* **51**: 439-464
- Mastro KJ, Bouchard RS, Holt HA, Gittis AH (2014) Transgenic mouse lines subdivide external segment of the globus pallidus (GPe) neurons and reveal distinct GPe output pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**: 2087-2099
- Mathews GC, Diamond JS (2003) Neuronal glutamate uptake contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 2040-2048
- Matsui T, Kita H (2003) Activation of group III metabotropic glutamate receptors presynaptically reduces both GABAergic and glutamatergic transmission in the rat globus pallidus. *Neuroscience* **122**: 727-737
- Matsumura M, Tremblay L, Richard H, Filion M (1995) Activity of pallidal neurons in the monkey during dyskinesia induced by injection of bicuculline in the external pallidum. *Neuroscience* **65**: 59-70
- Maurice N, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM (2003) Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 9929-9936
- Mazei-Robison MS, Bowton E, Holy M, Schudermaier M, Freissmuth M, Sitte HH, Galli A, Blakely RD (2008) Anomalous dopamine release associated with a human dopamine transporter coding variant. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 7040-7046
- McCartney MR, Deeb TZ, Henderson TN, Hales TG (2007) Tonic active GABA_A receptors in hippocampal pyramidal neurons exhibit constitutive GABA-independent gating. *Molecular pharmacology* **71**: 539-548

- McCormick DA, Pape HC (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *The Journal of physiology* **431**: 291-318
- McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ, Smart TG (1998) Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* **1**: 23-28
- McGee TP, Houston CM, Brickley SG (2013) Copper block of extrasynaptic GABAA receptors in the mature cerebellum and striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 13431-13435
- Meera P, Wallner M, Otis TS (2011) Molecular basis for the high THIP/gaboxadol sensitivity of extrasynaptic GABA(A) receptors. *Journal of neurophysiology* **106**: 2057-2064
- Menalled LB (2005) Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2**: 465-470
- Mercer JN, Chan CS, Tkatch T, Held J, Surmeier DJ (2007) Nav1.6 sodium channels are critical to pacemaking and fast spiking in globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 13552-13566
- 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
- Millhouse OE (1986) Pallidal neurons in the rat. *The Journal of comparative neurology* **254**: 209-227
- Milnerwood AJ, Cummings DM, Dallerac GM, Brown JY, Vatsavayai SC, Hirst MC, Rezaie P, Murphy KP (2006) Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* **15**: 1690-1703
- Milnerwood AJ, Raymond LA (2010) Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease. *Trends in neurosciences* **33**: 513-523
- Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N (2004) Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain research* **1029**: 120-123
- Mizuno H, Shibayama H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G, Iwata H, Kobayashi H, Yamada K, Iwai K, Takeuchi T, Hashimoto N, Ishihara R, Ibuki Y, Ogasawara S, Ozeki M (2000) An autopsy case with clinically and molecular genetically diagnosed Huntington's disease with only minimal non-specific neuropathological findings. *Clinical neuropathology* **19**: 94-103
- Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I (1994) Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends in neurosciences* **17**: 517-525
- Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends in neurosciences* **27**: 569-575
- Mohler H (2011) The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology* **60**: 1042-1049

- Moragues N, Ciofi P, Tramu G, Garret M (2002) Localisation of GABA(A) receptor epsilon-subunit in cholinergic and aminergic neurones and evidence for co-distribution with the theta-subunit in rat brain. *Neuroscience* **111**: 657-669
- Morelli M, Fenu S, Pinna A, Di Chiara G (1994) Adenosine A2 receptors interact negatively with dopamine D1 and D2 receptors in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *European journal of pharmacology* **251**: 21-25
- Moriizumi T, Nakamura Y, Kitao Y, Kudo M (1987) Ultrastructural analyses of afferent terminals in the subthalamic nucleus of the cat with a combined degeneration and horseradish peroxidase tracing method. *The Journal of comparative neurology* **265**: 159-174
- Morita M, Higuchi C, Moto T, Kozuka N, Susuki J, Itofusa R, Yamashita J, Kudo Y (2003) Dual regulation of calcium oscillation in astrocytes by growth factors and pro-inflammatory cytokines via the mitogen-activated protein kinase cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 10944-10952
- Mortensen M, Patel B, Smart TG (2011) GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones. *Front Cell Neurosci* **6**: 1
- Morton AJ (2013) Circadian and sleep disorder in Huntington's disease. *Experimental neurology* **243**: 34-44
- Morton AJ, Wood NI, Hastings MH, Hurelbrink C, Barker RA, Maywood ES (2005) Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 157-163
- Mozrzymas JW, Zarnowska ED, Pytel M, Mercik K (2003) Modulation of GABA(A) receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 7981-7992
- Mtchedlishvili Z, Kapur J (2006) High-affinity, slowly desensitizing GABAA receptors mediate tonic inhibition in hippocampal dentate granule cells. *Molecular pharmacology* **69**: 564-575
- Mulley JC, Scheffer IE, Harkin LA, Berkovic SF, Dibbens LM (2005) Susceptibility genes for complex epilepsy. *Human molecular genetics* **14 Spec No. 2**: R243-249
- Murphy TH, Corbett D (2009) Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nature reviews Neuroscience* **10**: 861-872
- Murray AM, Ryoo HL, Gurevich E, Joyce JN (1994) Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 11271-11275
- Nadjar A, Brotchie JM, Guigoni C, Li Q, Zhou SB, Wang GJ, Ravenscroft P, Georges F, Crossman AR, Bezard E (2006) Phenotype of striatofugal medium spiny neurons in parkinsonian and dyskinetic nonhuman primates: a call for a reappraisal of the functional organization of the basal ganglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 8653-8661
- Nagel SJ, Machado AG, Gale JT, Lobel DA, Pandya M (2015) Preserving cortico-striatal function: deep brain stimulation in Huntington's disease. *Frontiers in systems neuroscience* **9**: 32

- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **25**: 663-674
- Nambu A, Llinas R (1997) Morphology of globus pallidus neurons: its correlation with electrophysiology in guinea pig brain slices. *The Journal of comparative neurology* **377**: 85-94
- 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
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neuroscience research* **43**: 111-117
- Nani F, Bright DP, Revilla-Sanchez R, Tretter V, Moss SJ, Smart TG (2013) Tyrosine phosphorylation of GABAA receptor gamma2-subunit regulates tonic and phasic inhibition in the thalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 12718-12727
- Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* **263**: 1768-1771
- Nelson AB, Kreitzer AC (2014) Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annual review of neuroscience* **37**: 117-135
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD (2002) Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *Journal of neurophysiology* **87**: 528-537
- Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J (2002) I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 1290-1302
- Nevado-Holgado AJ, Mallet N, Magill PJ, Bogacz R (2014) Effective connectivity of the subthalamic nucleus-globus pallidus network during Parkinsonian oscillations. *The Journal of physiology* **592**: 1429-1455
- Newland CF, Cull-Candy SG (1992) On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *The Journal of physiology* **447**: 191-213
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2000) Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *The European journal of neuroscience* **12**: 4338-4344
- Nini A, Feingold A, Sloviter H, Bergman H (1995) Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of neurophysiology* **74**: 1800-1805
- Noblejas MI, Schechtman E, Adler A, Joshua M, Katabi S, Bergman H (2015) Hold Your Pauses: External Globus Pallidus Neurons Respond to Behavioral Events by Decreasing Pause Activity. *The European journal of neuroscience*
- Nobrega-Pereira S, Gelman D, Bartolini G, Pla R, Pierani A, Marin O (2010) Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 2824-2834

- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* **33**: 72-86
- Nusser Z, Mody I (2002) Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *Journal of neurophysiology* **87**: 2624-2628
- Nusser Z, Sieghart W, Mody I (1999) Differential regulation of synaptic GABAA receptors by cAMP-dependent protein kinase in mouse cerebellar and olfactory bulb neurones. *The Journal of physiology* **521 Pt 2**: 421-435
- Ochi M, Koga K, Kurokawa M, Kase H, Nakamura J, Kuwana Y (2000) Systemic administration of adenosine A(2A) receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. *Neuroscience* **100**: 53-62
- Ochi S, Lim JY, Rand MN, Doring MJ, Sakatani K, Kocsis JD (1993) Transient presence of GABA in astrocytes of the developing optic nerve. *Glia* **9**: 188-198
- Ogura M, Kita H (2000) Dynorphin exerts both postsynaptic and presynaptic effects in the Globus pallidus of the rat. *Journal of neurophysiology* **83**: 3366-3376
- Okoyama S, Nakamura Y, Moriizumi T, Kitao Y (1987) Electron microscopic analysis of the synaptic organization of the globus pallidus in the cat. *The Journal of comparative neurology* **265**: 323-331
- Oliet SH, Mothet JP (2009) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* **158**: 275-283
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* **292**: 923-926
- Otsu Y, Couchman K, Lyons DG, Collot M, Agarwal A, Mallet JM, Pfrieder FW, Bergles DE, Charpak S (2015) Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat Neurosci* **18**: 210-218
- Owens DF, Liu X, Kriegstein AR (1999) Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development. *Journal of neurophysiology* **82**: 570-583
- Pachernegg S, Strutz-Seebohm N, Hollmann M (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in neurosciences* **35**: 240-249
- Pack AI, Galante RJ, Maislin G, Cater J, Metaxas D, Lu S, Zhang L, Von Smith R, Kay T, Lian J, Svenson K, Peters LL (2007) Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiological genomics* **28**: 232-238
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual review of neuroscience* **25**: 563-593
- Pan HS, Walters JR (1988) Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway decreases the firing rate and alters the firing pattern of globus pallidus neurons in the rat. *Synapse* **2**: 650-656

- Pang TY, Du X, Zajac MS, Howard ML, Hannan AJ (2009) Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* **18**: 753-766
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research Brain research reviews* **20**: 91-127
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain research Brain research reviews* **20**: 128-154
- Parent A, Smith Y (1987) Differential dopaminergic innervation of the two pallidal segments in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain research* **426**: 397-400
- Park MR, Falls WM, Kitai ST (1982) An intracellular HRP study of the rat globus pallidus. I. Responses and light microscopic analysis. *The Journal of comparative neurology* **211**: 284-294
- Parpura V, Fang Y, Basarsky T, Jahn R, Haydon PG (1995) Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS letters* **377**: 489-492
- Parpura V, Haydon PG (2000) Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8629-8634
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain research reviews* **63**: 83-92
- Parri HR, Crunelli V (2001) Pacemaker calcium oscillations in thalamic astrocytes in situ. *Neuroreport* **12**: 3897-3900
- Pavlov I, Walker MC (2013) Tonic GABA(A) receptor-mediated signalling in temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* **69**: 55-61
- Peng Z, Hauer B, Mihalek RM, Homanics GE, Sieghart W, Olsen RW, Houser CR (2002) GABA(A) receptor changes in delta subunit-deficient mice: altered expression of alpha4 and gamma2 subunits in the forebrain. *The Journal of comparative neurology* **446**: 179-197
- Peng Z, Huang CS, Stell BM, Mody I, Houser CR (2004) Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **24**: 8629-8639
- Percheron G, Yelnik J, Francois C (1984) A Golgi analysis of the primate globus pallidus. III. Spatial organization of the striato-pallidal complex. *The Journal of comparative neurology* **227**: 214-227
- Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS (1989) A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain research* **494**: 285-293
- Petrini EM, Marchionni I, Zacchi P, Sieghart W, Cherubini E (2004) Clustering of extrasynaptic GABA(A) receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry* **279**: 45833-45843
- Pinard A, Seddik R, Bettler B (2010) GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol* **58**: 231-255

- Pinna A, Wardas J, Simola N, Morelli M (2005) New therapies for the treatment of Parkinson's disease: adenosine A2A receptor antagonists. *Life sciences* **77**: 3259-3267
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**: 815-850
- Pirttimaki T, Parri HR, Crunelli V (2013) Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures. *The Journal of physiology* **591**: 823-833
- Piscitelli CL, Krishnamurthy H, Gouaux E (2010) Neurotransmitter/sodium symporter orthologue LeuT has a single high-affinity substrate site. *Nature* **468**: 1129-1132
- Pizzarelli R, Cherubini E (2011) Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. *Neural plasticity* **2011**: 297153
- Plenz D, Kital ST (1999) A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* **400**: 677-682
- Poisik O, Raju DV, Verreault M, Rodriguez A, Abeniyi OA, Conn PJ, Smith Y (2005) Metabotropic glutamate receptor 2 modulates excitatory synaptic transmission in the rat globus pallidus. *Neuropharmacology* **49 Suppl 1**: 57-69
- Porcello DM, Huntsman MM, Mihalek RM, Homanics GE, Huguenard JR (2003) Intact synaptic GABAergic inhibition and altered neurosteroid modulation of thalamic relay neurons in mice lacking delta subunit. *Journal of neurophysiology* **89**: 1378-1386
- Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR (2013) Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature reviews Neuroscience* **14**: 708-721
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F (2009) Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* **63**: 628-642
- Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK (2013) SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med* **34**: 197-219
- Qiu MH, Vetrivelan R, Fuller PM, Lu J (2010) Basal ganglia control of sleep-wake behavior and cortical activation. *The European journal of neuroscience* **31**: 499-507
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Makkos Z, Meltzer H, Overholser J, Stockmeier C (2002) Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophrenia research* **57**: 127-138
- Rajput AH, Sitte HH, Rajput A, Fenton ME, Pifl C, Hornykiewicz O (2008) Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes: clinical and brain biochemical correlation. *Neurology* **70**: 1403-1410
- Rattray I, Smith EJ, Crum WR, Walker TA, Gale R, Bates GP, Modo M (2013) Correlations of behavioral deficits with brain pathology assessed through longitudinal MRI and histopathology in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. *PLoS one* **8**: e84726

- Rav-Acha M, Bergman H, Yarom Y (2008) Pre- and postsynaptic serotonergic excitation of globus pallidus neurons. *Journal of neurophysiology* **100**: 1053-1066
- Razik DS, Hawellek DJ, Antkowiak B, Hentschke H (2013) Impairment of GABA transporter GAT-1 terminates cortical recurrent network activity via enhanced phasic inhibition. *Front Neural Circuits* **7**: 141
- Reddy PH, Williams M, Charles V, Garrett L, Pike-Buchanan L, Whetsell WO, Jr., Miller G, Tagle DA (1998) Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nature genetics* **20**: 198-202
- Reedeker N, Van Der Mast RC, Giltay EJ, Van Duijn E, Roos RA (2010) Hypokinesia in Huntington's disease co-occurs with cognitive and global dysfunctioning. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **25**: 1612-1618
- Reiner A (2004) Can lesions of GPe correct HD deficits? *Experimental neurology* **186**: 1-5
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5733-5737
- Reyes N, Tavoulari S (2011) To be, or not to be two sites: that is the question about LeuT substrate binding. *The Journal of general physiology* **138**: 467-471
- Richerson GB, Wu Y (2003) Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *Journal of neurophysiology* **90**: 1363-1374
- Robertson RG, Graham WC, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Further investigations into the pathophysiology of MPTP-induced parkinsonism in the primate: an intracerebral microdialysis study of gamma-aminobutyric acid in the lateral segment of the globus pallidus. *Brain research* **563**: 278-280
- Rodrigo J, Fernandez P, Bentura ML, de Velasco JM, Serrano J, Uttenthal O, Martinez-Murillo R (1998) Distribution of catecholaminergic afferent fibres in the rat globus pallidus and their relations with cholinergic neurons. *Journal of chemical neuroanatomy* **15**: 1-20
- Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, Langbehn DR, Long JD, Warner JH, Scahill RI, Leavitt BR, Stout JC, Paulsen JS, Reilmann R, Unschuld PG, Wexler A, Margolis RL, Tabrizi SJ (2014) Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature reviews Neurology* **10**: 204-216
- Ross GW, Petrovitch H (2001) Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs & aging* **18**: 797-806
- Rossi DJ, Hamann M, Attwell D (2003) Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *The Journal of physiology* **548**: 97-110
- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry international* **61**: 546-558
- Rudolph U, Mohler H (2013) GABA Receptor Subtypes: Therapeutic Potential in Down Syndrome, Affective Disorders, Schizophrenia, and Autism. *Annual review of pharmacology and toxicology*

- Rush DB, Leon RT, McCollum MH, Treu RW, Wei J (2012) Palmitoylation and trafficking of GAD65 are impaired in a cellular model of Huntington's disease. *The Biochemical journal* **442**: 39-48
- Sachs C, Jonsson G (1975) Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochemical pharmacology* **24**: 1-8
- Sadek AR, Magill PJ, Bolam JP (2007) A single-cell analysis of intrinsic connectivity in the rat globus pallidus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 6352-6362
- Santhakumar V, Hancher HJ, Wallner M, Olsen RW, Otis TS (2006) Contributions of the GABAA receptor alpha6 subunit to phasic and tonic inhibition revealed by a naturally occurring polymorphism in the alpha6 gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 3357-3364
- Santhakumar V, Jones RT, Mody I (2010) Developmental regulation and neuroprotective effects of striatal tonic GABAA currents. *Neuroscience* **167**: 644-655
- Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, Imaki J (2009) Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* **110**: 628-637
- Saunders A, Oldenburg IA, Berezovskii VK, Johnson CA, Kingery ND, Elliott HL, Xie T, Gerfen CR, Sabatini BL (2015a) A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex. *Nature*
- Saunders A, Oldenburg IA, Berezovskii VK, Johnson CA, Kingery ND, Elliott HL, Xie T, Gerfen CR, Sabatini BL (2015b) A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex. *Nature* **521**: 85-89
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* **39**: 777-787
- Schmidt R, Leventhal DK, Mallet N, Chen F, Berke JD (2013) Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nat Neurosci* **16**: 1118-1124
- Schneider Gasser EM, Straub CJ, Panzanelli P, Weinmann O, Sassoe-Pognetto M, Fritschy JM (2006) Immunofluorescence in brain sections: simultaneous detection of presynaptic and postsynaptic proteins in identified neurons. *Nature protocols* **1**: 1887-1897
- Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research* **318**: 215-224
- Schroeder JA, Schneider JS (2001) Alterations in expression of messenger RNAs encoding two isoforms of glutamic acid decarboxylase in the globus pallidus and entopeduncular nucleus in animals symptomatic for and recovered from experimental Parkinsonism. *Brain research* **888**: 180-183
- Schroll H, Beste C, Hamker FH (2015a) Combined lesions of direct and indirect basal ganglia pathways but not changes in dopamine levels explain learning deficits in patients with Huntington's disease. *The European journal of neuroscience* **41**: 1227-1244

- Schroll H, Horn A, Groschel C, Brucke C, Lutjens G, Schneider GH, Krauss JK, Kuhn AA, Hamker FH (2015b) Differential contributions of the globus pallidus and ventral thalamus to stimulus-response learning in humans. *NeuroImage*
- Schulz JM, Pitcher TL, Savanthrapadian S, Wickens JR, Oswald MJ, Reynolds JN (2011) Enhanced high-frequency membrane potential fluctuations control spike output in striatal fast-spiking interneurons in vivo. *The Journal of physiology* **589**: 4365-4381
- Schwab C, Yu S, Wong W, McGeer EG, McGeer PL (2013) GAD65, GAD67, and GABAT immunostaining in human brain and apparent GAD65 loss in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **33**: 1073-1088
- Schwartz RK, Huston JP (1996) Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Progress in neurobiology* **49**: 215-266
- Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G (2001) Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol* **433**: 526-549
- Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC (2005) Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci* **25**: 10016-10024
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (1996) Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Progress in neurobiology* **48**: 167-189
- Sedelnikova A, Erkkila BE, Harris H, Zakharkin SO, Weiss DS (2006) Stoichiometry of a pore mutation that abolishes picrotoxin-mediated antagonism of the GABAA receptor. *The Journal of physiology* **577**: 569-577
- Semyanov A (2003) Cell type specificity of GABA(A) receptor mediated signaling in the hippocampus. *Current drug targets CNS and neurological disorders* **2**: 240-247
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM (2003) GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* **6**: 484-490
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* **27**: 262-269
- Seredenina T, Luthi-Carter R (2012) What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiology of disease* **45**: 83-98
- Seutin V, Johnson SW (1999) Recent advances in the pharmacology of quaternary salts of bicuculline. *Trends in pharmacological sciences* **20**: 268-270
- Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L (1996) Efferent connections of the caudal part of the globus pallidus in the rat. *The Journal of comparative neurology* **376**: 489-507
- 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

- Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS (2012) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* **15**: 70-80
- Shimada S, Cutting G, Uhl GR (1992) gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Molecular pharmacology* **41**: 683-687
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ (2005) Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The Journal of cell biology* **171**: 1001-1012
- Shin RM, Masuda M, Miura M, Sano H, Shirasawa T, Song WJ, Kobayashi K, Aosaki T (2003) Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 11662-11672
- Shink E, Smith Y (1995) Differential synaptic innervation of neurons in the internal and external segments of the globus pallidus by the GABA- and glutamate-containing terminals in the squirrel monkey. *The Journal of comparative neurology* **358**: 119-141
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* **129**: 877-896
- Simola N, Fenu S, Baraldi PG, Tabrizi MA, Morelli M (2004) Blockade of adenosine A2A receptors antagonizes parkinsonian tremor in the rat tacrine model by an action on specific striatal regions. *Experimental neurology* **189**: 182-188
- Sims RE, Woodhall GL, Wilson CL, Stanford IM (2008) Functional characterization of GABAergic pallidopallidal and striatopallidal synapses in the rat globus pallidus in vitro. *The European journal of neuroscience* **28**: 2401-2408
- Singhrao SK, Thomas P, Wood JD, MacMillan JC, Neal JW, Harper PS, Jones AL (1998) Huntingtin protein colocalizes with lesions of neurodegenerative diseases: An investigation in Huntington's, Alzheimer's, and Pick's diseases. *Experimental neurology* **150**: 213-222
- Sirinathsinghji DJ, Heavens RP (1989) Stimulation of GABA release from the rat neostriatum and globus pallidus in vivo by corticotropin-releasing factor. *Neuroscience letters* **100**: 203-209
- Sirinathsinghji DJ, Nikolarakis KE, Herz A (1989) Corticotropin-releasing factor stimulates the release of methionine-enkephalin and dynorphin from the neostriatum and globus pallidus of the rat: in vitro and in vivo studies. *Brain research* **490**: 276-291
- Sitte HH, Farhan H, Javitch JA (2004) Sodium-dependent neurotransmitter transporters: oligomerization as a determinant of transporter function and trafficking. *Molecular interventions* **4**: 38-47
- Smart TG, Constanti A (1986) Studies on the mechanism of action of picrotoxinin and other convulsants at the crustacean muscle GABA receptor. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **227**: 191-216

- Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, Englund E, Liu YJ, Roos RA, Faull RL, Brundin P, Li JY (2006) Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Human molecular genetics* **15**: 3119-3131
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* **86**: 353-387
- Smith Y, Charara A, Hanson JE, Paquet M, Levey AI (2000) GABA(B) and group I metabotropic glutamate receptors in the striatopallidal complex in primates. *Journal of anatomy* **196 (Pt 4)**: 555-576
- Smith Y, Hazrati LN, Parent A (1990) 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
- Soghomonian JJ, Chesselet MF (1992) Effects of nigrostriatal lesions on the levels of messenger RNAs encoding two isoforms of glutamate decarboxylase in the globus pallidus and entopeduncular nucleus of the rat. *Synapse* **11**: 124-133
- Song I, Savtchenko L, Semyanov A (2011) Tonic excitation or inhibition is set by GABA(A) conductance in hippocampal interneurons. *Nature communications* **2**: 376
- Song I, Volynski K, Brenner T, Ushkaryov Y, Walker M, Semyanov A (2013) Different transporter systems regulate extracellular GABA from vesicular and non-vesicular sources. *Front Cell Neurosci* **7**: 23
- Spacek J (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheath. *Anatomy and embryology* **171**: 245-252
- Spieß J, Rivier J, Rivier C, Vale W (1981) Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 6517-6521
- Starr PA, Kang GA, Heath S, Shimamoto S, Turner RS (2008) Pallidal neuronal discharge in Huntington's disease: support for selective loss of striatal cells originating the indirect pathway. *Experimental neurology* **211**: 227-233
- Steinhauser C, Gallo V (1996) News on glutamate receptors in glial cells. *Trends in neurosciences* **19**: 339-345
- Stell BM, Brickley SG, Tang CY, Farrant M, Mody I (2003) Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABA_A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 14439-14444
- Stell BM, Mody I (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: RC223
- Stoof JC, Keibarian JW (1984) Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life sciences* **35**: 2281-2296

- Storustovu SI, Ebert B (2006) Pharmacological characterization of agonists at delta-containing GABAA receptors: Functional selectivity for extrasynaptic receptors is dependent on the absence of gamma2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **316**: 1351-1359
- Stratmann G, May LD, Sall JW, Alvi RS, Bell JS, Ormerod BK, Rau V, Hilton JF, Dai R, Lee MT, Visrodia KH, Ku B, Zusmer EJ, Guggenheim J, Firouzian A (2009a) Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day-old rats. *Anesthesiology* **110**: 849-861
- Stratmann G, Sall JW, May LD, Bell JS, Magnusson KR, Rau V, Visrodia KH, Alvi RS, Ku B, Lee MT, Dai R (2009b) Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology* **110**: 834-848
- Sukhorukova EG, Kruzhevskii DE, Alekseeva OS (2015) [Glial fibrillary acidic protein: the component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes]. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii* **51**: 3-10
- Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K, Smith SS (2002) Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA(A) receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* **5**: 721-722
- Sur C, Farrar SJ, Kerby J, Whiting PJ, Atack JR, McKernan RM (1999) Preferential coassembly of alpha4 and delta subunits of the gamma-aminobutyric acidA receptor in rat thalamus. *Mol Pharmacol* **56**: 110-115
- Surmeier DJ (2013) Neuroscience: To go or not to go. *Nature* **494**: 178-179
- Surmeier DJ, Seno N, Kitai ST (1994) Acutely isolated neurons of the rat globus pallidus exhibit four types of high-voltage-activated Ca²⁺ current. *Journal of neurophysiology* **71**: 1272-1280
- Sztainberg Y, Kuperman Y, Justice N, Chen A (2011) An anxiolytic role for CRF receptor type 1 in the globus pallidus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 17416-17424
- Tachibana Y, Iwamuro H, Kita H, Takada M, Nambu A (2011) Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia. *The European journal of neuroscience* **34**: 1470-1484
- Takahashi K, Liu FC, Hirokawa K, Takahashi H (2003) Expression of Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. *Journal of neuroscience research* **73**: 61-72
- Takeuchi A, Takeuchi N (1969) A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the crayfish. *The Journal of physiology* **205**: 377-391
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**: 1699-1702
- Tao W, Higgs MH, Spain WJ, Ransom CB (2013) Postsynaptic GABAB receptors enhance extrasynaptic GABAA receptor function in dentate gyrus granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 3738-3743

- Teismann P, Schulz JB (2004) Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell and tissue research* **318**: 149-161
- Telenius H, Kremer HP, Theilmann J, Andrew SE, Almqvist E, Anvret M, Greenberg C, Greenberg J, Lucotte G, Squitieri F, et al. (1993) Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. *Human molecular genetics* **2**: 1535-1540
- Temel Y, Cao C, Vlamings R, Blokland A, Ozen H, Steinbusch HW, Michelsen KA, von Horsten S, Schmitz C, Visser-Vandewalle V (2006) Motor and cognitive improvement by deep brain stimulation in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Neuroscience letters* **406**: 138-141
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP (2007) Basal ganglia macrocircuits. *Progress in brain research* **160**: 3-7
- Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology* **14**: 685-692
- Terman D, Rubin JE, Yew AC, Wilson CJ (2002) Activity patterns in a model for the subthalamopallidal network of the basal ganglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 2963-2976
- Thiriez C, Villafane G, Grapin F, Fenelon G, Remy P, Cesaro P (2011) Can nicotine be used medicinally in Parkinson's disease? *Expert review of clinical pharmacology* **4**: 429-436
- Thompson-Vest NM, Waldvogel HJ, Rees MI, Faull RL (2003) GABA(A) receptor subunit and gephyrin protein changes differ in the globus pallidus in Huntington's diseased brain. *Brain research* **994**: 265-270
- Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H, Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood LE (2004) Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**: 960-969
- Tsai G, Coyle JT (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annual review of pharmacology and toxicology* **42**: 165-179
- Ueno S, Bracamontes J, Zorumski C, Weiss DS, Steinbach JH (1997) Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**: 625-634
- Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European journal of pharmacology* **5**: 107-110
- Ungerstedt U (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* **367**: 95-122
- Valenti O, Marino MJ, Wittmann M, Lis E, DiLella AG, Kinney GG, Conn PJ (2003) Group III metabotropic glutamate receptor-mediated modulation of the striatopallidal synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 7218-7226

- Valeyev AY, Cruciani RA, Lange GD, Smallwood VS, Barker JL (1993) Cl⁻ channels are randomly activated by continuous GABA secretion in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters* **155**: 199-203
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *The Journal of comparative neurology* **428**: 191-212
- Vaz SH, Cristovao-Ferreira S, Ribeiro JA, Sebastiao AM (2008) Brain-derived neurotrophic factor inhibits GABA uptake by the rat hippocampal nerve terminals. *Brain research* **1219**: 19-25
- Venderova K, Brown TM, Brotchie JM (2005) Differential effects of endocannabinoids on [(3)H]-GABA uptake in the rat globus pallidus. *Experimental neurology* **194**: 284-287
- Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ (2012) Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* **149**: 708-721
- Vida I, Bartos M, Jonas P (2006) Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates. *Neuron* **49**: 107-117
- Vis JC, Nicholson LF, Faull RL, Evans WH, Severs NJ, Green CR (1998) Connexin expression in Huntington's diseased human brain. *Cell biology international* **22**: 837-847
- Vitek JL, Hashimoto T, Peoples J, DeLong MR, Bakay RA (2004) Acute stimulation in the external segment of the globus pallidus improves parkinsonian motor signs. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **19**: 907-915
- Vlamings R, Benazzouz A, Chetrit J, Janssen ML, Kozan R, Visser-Vandewalle V, Steinbusch HW, von Horsten S, Temel Y (2012) Metabolic and electrophysiological changes in the basal ganglia of transgenic Huntington's disease rats. *Neurobiology of disease* **48**: 488-494
- Waldvogel HJ, Faull RL (2015) The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. *Adv Pharmacol* **73**: 223-264
- Waldvogel HJ, Kubota Y, Fritschy J, Mohler H, Faull RL (1999) Regional and cellular localisation of GABA(A) receptor subunits in the human basal ganglia: An autoradiographic and immunohistochemical study. *The Journal of comparative neurology* **415**: 313-340
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* **48**: 36-43
- Walz W (2002) Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* **40**: 1-10
- Waniewski RA, Martin DL (1998) Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 5225-5233
- Warr O, Takahashi M, Attwell D (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *The Journal of physiology* **514 (Pt 3)**: 783-793

- Watanabe K, Kita T, Kita H (2009) Presynaptic actions of D2-like receptors in the rat cortico-striato-globus pallidus disynaptic connection in vitro. *Journal of neurophysiology* **101**: 665-671
- Webster MJ, O'Grady J, Kleinman JE, Weickert CS (2005) Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience* **133**: 453-461
- Wei W, Faria LC, Mody I (2004) Low ethanol concentrations selectively augment the tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABA_A receptors in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 8379-8382
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I (2003) Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* **23**: 10650-10661
- Wichmann T, DeLong MR (2006) Basal ganglia discharge abnormalities in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission Supplementum*: 21-25
- Wiegand M, Moller AA, Lauer CJ, Stolz S, Schreiber W, Dose M, Krieg JC (1991) Nocturnal sleep in Huntington's disease. *Journal of neurology* **238**: 203-208
- Wilson CJ, Phelan KD (1982) Dual topographic representation of neostriatum in the globus pallidus of rats. *Brain research* **243**: 354-359
- Windels F, Carcenac C, Poupard A, Savasta M (2005) Pallidal origin of GABA release within the substantia nigra pars reticulata during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 5079-5086
- Wlodarczyk AI, Sylantyev S, Herd MB, Kersante F, Lambert JJ, Rusakov DA, Linthorst AC, Semyanov A, Belelli D, Pavlov I, Walker MC (2013) GABA-independent GABA_A receptor openings maintain tonic currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 3905-3914
- Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL (2002) Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 1541-1549
- Wojtowicz AM, Dvorzhak A, Semtner M, Grantyn R (2013) Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. *Front Neural Circuits* **7**: 188
- Wu H, Jin Y, Buddhala C, Osterhaus G, Cohen E, Jin H, Wei J, Davis K, Obata K, Wu JY (2007) Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles-Evidence from GAD65-knockout mice studies. *Brain research* **1154**: 80-83
- Wu Y, Richard S, Parent A (2000) The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neuroscience research* **38**: 49-62
- Wu Y, Wang W, Richerson GB (2003) Vigabatrin induces tonic inhibition via GABA transporter reversal without increasing vesicular GABA release. *Journal of neurophysiology* **89**: 2021-2034

- Wu Z, Guo Z, Gearing M, Chen G (2014) Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's [corrected] disease model. *Nature communications* **5**: 4159
- Wulff K, Gatti S, Wettstein JG, Foster RG (2010) Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nature reviews Neuroscience* **11**: 589-599
- Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA (2010) Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **167**: 475-481
- Xue Y, Bai B, Yung WH, Chen L (2009) Electrophysiological effects of neurotensin on globus pallidus neurons of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuro-Signals* **17**: 153-161
- Yague JG, Cavaccini A, Errington AC, Crunelli V, Di Giovanni G (2013) Dopaminergic modulation of tonic but not phasic GABAA-receptor-mediated current in the ventrobasal thalamus of Wistar and GAERS rats. *Experimental neurology* **247**: 1-7
- Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* **437**: 215-223
- Yasukawa T, Kita T, Xue Y, Kita H (2004) Rat intralaminar thalamic nuclei projections to the globus pallidus: a biotinylated dextran amine anterograde tracing study. *The Journal of comparative neurology* **471**: 153-167
- Yasumi M, Sato K, Shimada S, Nishimura M, Tohyama M (1997) Regional distribution of GABA transporter 1 (GAT1) mRNA in the rat brain: comparison with glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) mRNA localization. *Brain research Molecular brain research* **44**: 205-218
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 3588-3596
- Yelnik J, Percheron G, Francois C (1984) A Golgi analysis of the primate globus pallidus. II. Quantitative morphology and spatial orientation of dendritic arborizations. *The Journal of comparative neurology* **227**: 200-213
- Yhnell E, Dunnett SB, Brooks SP (2015) The utilisation of operant delayed matching and non-matching to position for probing cognitive flexibility and working memory in mouse models of Huntington's disease. *Journal of neuroscience methods*
- Yoon BE, Jo S, Woo J, Lee JH, Kim T, Kim D, Lee CJ (2011) The amount of astrocytic GABA positively correlates with the degree of tonic inhibition in hippocampal CA1 and cerebellum. *Molecular brain* **4**: 42
- Yoon BE, Lee CJ (2014) GABA as a rising gliotransmitter. *Front Neural Circuits* **8**: 141
- Yoon BE, Woo J, Chun YE, Chun H, Jo S, Bae JY, An H, Min JO, Oh SJ, Han KS, Kim HY, Kim T, Kim YS, Bae YC, Lee CJ (2014) Glial GABA, synthesized by monoamine oxidase B, mediates tonic inhibition. *The Journal of physiology* **592**: 4951-4968

- Yoshiike Y, Kimura T, Yamashita S, Furudate H, Mizoroki T, Murayama M, Takashima A (2008) GABA(A) receptor-mediated acceleration of aging-associated memory decline in APP/PS1 mice and its pharmacological treatment by picrotoxin. *PLoS one* **3**: e3029
- Zeng BY, Iravani MM, Jackson MJ, Rose S, Parent A, Jenner P (2010) Morphological changes in serotonergic neurites in the striatum and globus pallidus in levodopa primed MPTP treated common marmosets with dyskinesia. *Neurobiology of disease* **40**: 599-607
- Zhang J, Russo GS, Mewes K, Rye DB, Vitek JL (2006) Lesions in monkey globus pallidus externus exacerbate parkinsonian symptoms. *Experimental neurology* **199**: 446-453
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* **40**: 971-982
- Zhang LH, Gong N, Fei D, Xu L, Xu TL (2008) Glycine uptake regulates hippocampal network activity via glycine receptor-mediated tonic inhibition. *Neuropsychopharmacology* **33**: 701-711
- Zhang XX, Zhu ZT, Jin GZ (1998) Comparison of (-)-stepholidine and D1 or D2 agonists on unit firing of globus pallidus in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Life sciences* **63**: 537-544
- Zhou Q, Petersen CC, Nicoll RA (2000) Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurones. *The Journal of physiology* **525 Pt 1**: 195-206