

2m11.3214.10

Université de Montréal

**Étude du mécanisme
de la libération somatodendritique de dopamine**

par
Gabriel Fortin

Département de physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Sciences neurologiques

Février, 2004

© Gabriel Fortin, 2004



W
4
U58
2004
v.121

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du mécanisme de la libération somatodendritique de dopamine

présenté par :

Gabriel Fortin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Laurent Descarries
président-rapporteur

Dr. Louis-Éric Trudeau
directeur de recherche

Dr. Pierre-Paul Rompré
membre du jury

RÉSUMÉ

La libération de neurotransmetteur se produit classiquement aux terminaisons axonales; néanmoins, on reconnaît depuis la fin des années 1970 que la dopamine peut également être libérée à partir des dendrites. Le mécanisme responsable de la libération somatodendritique de dopamine demeure pourtant controversé. D'une part, la libération somatodendritique semble respecter les critères clés de la libération par exocytose, tel que l'inhibition par des drogues bloquant le chargement vésiculaire. D'autre part, les études anatomiques visant à démontrer la présence de vésicules dans les dendrites se sont avérées peu concluantes, de sorte que certains auteurs ont mis en doute la nature vésiculaire de la libération somatodendritique. En outre, nos connaissances sur le renversement du transport membranaire de la dopamine permettent de croire que ce phénomène pourrait être impliqué. Nous avons donc développé un premier modèle de neurones en culture permettant d'investiguer les mécanismes de la libération somatodendritique de dopamine. Nos résultats montrent que, lorsque les neurones déchargent spontanément (à basse fréquence), la libération somatodendritique n'implique pas le transport inverse. Ainsi, un mécanisme de type exocytose est probablement responsable de la libération somatodendritique spontanée. Notre modèle de neurones en culture se prêtera avantageusement aux expériences futures visant à identifier la machinerie moléculaire impliquée dans l'exocytose dendritique de la dopamine.

Mots-clés: Libération somatodendritique, dopamine, HPLC, culture cellulaire, exocytose, transport inverse

ABSTRACT

Neurotransmitter release classically occurs at axonal terminals; nonetheless, somatodendritic dopamine release is recognized as a biological fact since the late 1970s. The mechanism responsible for the efflux of dopamine from dendrites has however remained elusive. On the one hand, the physiological characteristics of somatodendritic dopamine release are compatible with an exocytotic mechanism, for instance inhibition by drugs that block vesicular uptake and storage. But on the other hand, early anatomical and morphological studies found only rare occurrences of small synaptic-like vesicles that could participate in exocytosis. The ability of the dopamine transporter to function in reverse mode has lead some researchers to believe that such a mechanism could account for somatodendritic dopamine release. We have investigated the mechanisms of somatodendritic dopamine release using a cultured neuron model. Our results show that basal somatodendritic release, occuring when neurons fire at low frequency, does not involve reverse transport. This therefore suggests that basal somatodendritic dopamine release involves an exocytotic-like mechanism. Neuron cultures should prove a valuable tool for further studies aimed at identifying the molecular machinery responsible for dendritic exocytosis.

Keywords: Somatodendritic release, dopamine, HPLC, cell culture, exocytosis, reverse transport

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| RÉSUMÉ..... | iii |
| ABSTRACT..... | iv |
| TABLE DES MATIÈRES..... | v |
| Liste des tableaux..... | viii |
| Liste des figures..... | ix |
| Liste des abréviations..... | x |
| REMERCIEMENTS..... | xi |
| | |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| 1. Système dopaminergique..... | 6 |
| 1.1 Métabolisme de la dopamine..... | 6 |
| 1.2 Anatomie fonctionnelle..... | 9 |
| 1.3 Transmission volumique..... | 16 |
| 1.4 Rôle de la dopamine dans le cerveau..... | 17 |
| 2. Libération somatodendritique de la dopamine..... | 22 |
| 2.1 La découverte..... | 22 |
| 2.2 Propriétés physiologiques..... | 26 |
| 2.2.1 Métabolisme dans les dendrites..... | 26 |
| 2.2.2 Sensibilité au calcium extracellulaire..... | 29 |
| 2.2.3 Dépendance envers l'activité électrique..... | 30 |
| 2.3 Implications fonctionnelles..... | 33 |

| | |
|--|------------|
| 3. Mécanisme de la libération somatodendritique..... | 35 |
| 3.1 Mécanisme vésiculaire..... | 35 |
| 3.2 Transport inverse..... | 40 |
| 3.2.1 Le cas de l'amphétamine..... | 41 |
| 3.2.2 Conditions générales nécessaires au transport inverse..... | 42 |
| 3.3 Résultats récents..... | 45 |
| 4. Objectifs de l'étude..... | 48 |
| | |
| ARTICLE..... | 50 |
| Accord des coauteurs..... | 51 |
| Page titre et remerciements..... | 52 |
| Résumé..... | 53 |
| Introduction..... | 54 |
| Méthodes..... | 56 |
| Résultats..... | 64 |
| Discussion..... | 71 |
| Références..... | 79 |
| Légende des figures..... | 90 |
| | |
| DISCUSSION..... | 100 |
| 5. Considérations méthodologiques..... | 101 |
| 5.1 Utilisation de la culture cellulaire..... | 101 |
| 5.2 Échantillonnage et mesure de la dopamine..... | 103 |

| | |
|---|------------|
| 5.3 Étude de l'activité terminale versus somatodendritique..... | 107 |
| 6. Perspectives..... | 111 |
| 6.1 Machinerie d'exocytose dans les dendrites..... | 111 |
| 6.2 Sensibilité envers le calcium..... | 114 |
| 7. Conclusion..... | 117 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 119 |

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:

Caractéristiques des neurones dopaminergiques des étages dorsal et ventral . 13

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1: Voies métaboliques de la dopamine | 7 |
| Figure 2: Principales voies dopaminergiques chez le rat | 11 |
| Figure 3: Complexe SNARE de fusion vésiculaire | 112 |

Figures de l'article

| | |
|---|----|
| Figure 1: Dopamine release persists at low calcium concentrations | 94 |
| Figure 2: Cellular activity is necessary to maintain extracellular dopamine levels | 95 |
| Figure 3: K⁺-stimulated terminal release persists at low calcium concentrations | 96 |
| Figure 4: Basal spontaneous terminal release is abolished in low calcium | 97 |
| Figure 5: The DAT is present and functional in cultures | 98 |
| Figure 6: Reverse transport is not involved in somatodendritic dopamine release | 99 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---------|---|
| 3-MT: | 3-méthoxytyramine |
| ATV: | aire tegmentaire ventrale |
| BoNT: | neurotoxine botulique |
| COMT: | catéchol-O-méthyltransferase |
| DAT: | transporteur membranaire de la dopamine |
| DOPAC: | 3,4-dihydroxyphenylalanine |
| HPLC: | chromatographie en phase liquide |
| HVA: | acide homovanillic |
| L-DOPA: | L-dihydroxyphenylalanine |
| MAO: | monoamine oxydase |
| NAcc: | noyau accumbens |
| RE: | réticulum endoplasmique |
| SNc: | substance noire compacte |
| SNr: | substance noire réticulée |
| TH: | tyrosine hydroxylase |
| TTX: | tétradotoxine |
| VAMP: | synaptobrevine |
| VDCC: | canaux calciques sensibles au voltage |
| VMAT2: | transporteur vésiculaire de la dopamine |

REMERCIEMENTS

Sans conteste, mon premier élan de gratitude va vers le Dr Louis-Éric Trudeau, qui a fait montre d'une disponibilité hors du commun au cours de ma supervision. Ses précieux conseils et mille et une réponses m'ont éclairé tout au long de ce processus assez ardu qu'est l'apprentissage de la méthode scientifique; une méthode de travail, d'analyse, d'écriture et de parler que le Dr Trudeau possède intimement. Je suis conscient de la chance que j'ai eu d'atterrir dans son laboratoire.

Je me dois ensuite de souligner l'aide continue de Marie-Josée Bourque, qui a su me dépêtrer d'une foule de problèmes et d'hésitations de toutes sortes, tels qu'on en retrouve si abondamment dans la recherche scientifique. Je soulignerai aussi ses efforts louables pour me garder sur le droit chemin des bonnes pratiques de laboratoire. Je suis certain qu'elle doit être fière de son œuvre de ce côté. J'avouerai qu'elle avait tout un défi avec l'étudiant sortant d'un B. Sc. en psychologie que j'étais, n'ayant même jamais vu une μ -pipette auparavant. Il faut dire enfin que je lui aurai offert en échange de son aide quelques bonnes opportunités de farces (oui, à mes dépends).

Merci aussi aux étudiants du "labo Trudeau". Je peux maintenant vous dire que c'est d'abord grâce à l'ambiance joyeuse que vous faites régner au labo que j'ai choisi au tout début d'entreprendre ma maîtrise ici. Alors que l'ambiance est sans aucun doute favorable au travail et aux longues heures, elle favorise aussi les petits moments de détente et de rire. J'espère que cette camaraderie se perpétuera.

Une petite pensée à Joanne Payette pour toutes les clés qu'elle semble posséder quand il s'agit de manœuvrer au sein de la bureaucratie universitaire. Et aussi à Francine Côté pour son talent et sa générosité de cuisinière.

Je remercierai finalement mes parents et amis qui m'ont supporté sans toutefois me demander trop souvent de leur expliquer ce que je faisais, et bien sûr Marie-Josée Rainville, qui m'a permis de garder un équilibre de vie plus sain tout au long de cette entreprise souvent exigeante qu'est la maîtrise.

Introduction

En son temps, Franz Joseph Gall (1758-1828) entreprit d'examiner des centaines de crânes humains et animaux afin de corrélérer leur morphologie externe à des traits de caractères. Ces traits, plus ou moins précis (cruauté, prudence ou encore spiritualité), devaient donner lieu à des protubérances crâniennes dont la taille serait directement proportionnelle au niveau de développement de ces traits, d'où la bosse des maths par exemple. Gall croyait que le contrôle des multiples facultés cérébrales était réparti en diverses régions spécialisées, qu'une faculté particulièrement développée nécessiterait davantage d'espace cérébral et que cette répartition serait indiquée par la morphologie du crâne¹. Bien que cette dernière hypothèse paraisse aujourd'hui risible, on mentionne souvent les travaux de Gall comme étant à la source de la grande tradition localisationniste en neuroscience. Ces travaux permirent effectivement de promouvoir l'idée de la spécialisation au sein du cerveau, idée que l'on considère aujourd'hui comme un principe acquis.

Depuis, de nombreuses méthodes ont permis et permettent toujours d'élucider les fonctions respectives des différentes régions du cerveau. Mentionnons tout d'abord l'étude *post mortem* du cerveau de patients dont le comportement semblait aberrant, et la destruction spécifique et volontaire de régions cérébrales chez des animaux afin d'en étudier par la suite les performances. Plus récemment, les avancées technologiques ont permis d'enregistrer l'activité électrique de neurones au cours de différents tests, afin de déterminer non seulement la fonction de ces neurones, mais aussi comment leur activité change durant une tâche. Enfin, le développement de l'imagerie cérébrale et son application

¹ Voir *A History of Psychology* (1987) par Leahey pour une présentation plus détaillée de la phrénologie.

en neuroscience représente un pas important et constituera sans doute un fer de lance pour de nombreuses années encore. On reconnaît donc aujourd'hui l'existence de nombreuses régions du cerveau spécialisées dans le traitement d'un type spécifique d'information. La spécialisation au sein du cerveau peut d'ailleurs donner lieu à des cas cliniques particulièrement étonnants lorsqu'une lésion cérébrale n'affecte qu'une composante très spécifique du fonctionnement, comme en témoigne admirablement dans ses écrits le neurologue Oliver Sacks².

Au niveau cellulaire maintenant, la spécialisation au sein du cerveau se traduit par un regroupement des neurones en circuits, traitant un type spécifique d'information. Or, on retrouve également des systèmes dont le rôle est plus diffus et dont l'action consiste essentiellement à réguler et coordonner l'action des autres circuits. Ces systèmes de neurones régulateurs utilisent fréquemment des monoamines comme neurotransmetteurs (dopamine, noradrénaline, sérotonine, histamine ainsi qu'acétylcholine), bien que les monoamines agissent aussi comme neurotransmetteurs classiques dans certains circuits. De ces monoamines, la dopamine est probablement celle ayant fait l'objet de la plus grande attention. Les fonctions du système dopaminergique dans le cerveau sont nombreuses et impliquent notamment l'intégration sensorielle (visuelle et olfactive), le contrôle endocrinien, le contrôle moteur, l'attention, la motivation, la mémoire, les émotions ainsi que l'apprentissage. Parallèlement, les cibles dopaminergiques sont tout aussi nombreuses, s'étendant à de nombreuses régions du cerveau. Malgré de multiples prolongements, les corps cellulaires des neurones dopaminergiques sont principalement concentrés au sein de

² Lire par exemple *Un anthropologue sur Mars*, publié aux éditions du Seuil en 1996.

trois noyaux du mésencéphale ventral (voir figure 2, page 11). Cette organisation anatomique permet l'intégration d'une vaste quantité d'information convergente et de réguler de nombreuses régions du cerveau via un réseau effecteur divergent. Le rôle fondamental du système dopaminergique pour le bon fonctionnement du cerveau est mis en relief par son implication dans des psychopathologies aussi invalidantes que la schizophrénie, la maladie de Parkinson et la dépendance aux drogues.

Le bon fonctionnement du système dopaminergique requiert un réglage (*fine tuning*) particulièrement fin au niveau local et les neurones dopaminergiques se caractérisent par une grande hétérogénéité au point de vue électrophysiologique et pharmacologique, c'est-à-dire que plusieurs différences se retrouvent au sein même de la population dopaminergique. De nombreux mécanismes permettent le réglage des diverses composantes du système dopaminergique, dont l'auto-inhibition constitue un exemple notoire. Les neurones dopaminergiques possèdent effectivement des récepteurs à la dopamine qui permettent au système de s'autoréguler. L'activation de ces "autorécepteurs" induit notamment une inhibition de la synthèse de la dopamine, de sa libération ainsi que de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques. Or, les neurones dopaminergiques ne libèrent pas la dopamine uniquement à leurs terminaisons axonales, mais également à partir de leurs dendrites et du corps cellulaire. La libération somatodendritique de dopamine constitue un mécanisme d'autorégulation de première ligne puisqu'elle est située au cœur même du système. Elle peut non seulement réguler directement les neurones dopaminergiques, mais en plus pondérer l'influence des multiples afférences provenant de nombreuses régions du cerveau (voir la section 2.3, à la page 33).

La libération somatodendritique de dopamine a ainsi été l'objet de nombreuses études depuis sa découverte à la fin des années 1970. Or, on ignore toujours par quel mécanisme la dopamine est libérée à partir des dendrites et du corps cellulaire. Deux hypothèses persistent, l'une proposant un mécanisme classique par exocytose, l'autre suggérant plutôt l'implication du transport inverse de la dopamine. Nos recherches visent à déterminer quel mécanisme prédomine et nous espérons effectivement que les éléments de réponse que nous apportons serviront à éclaircir la question.

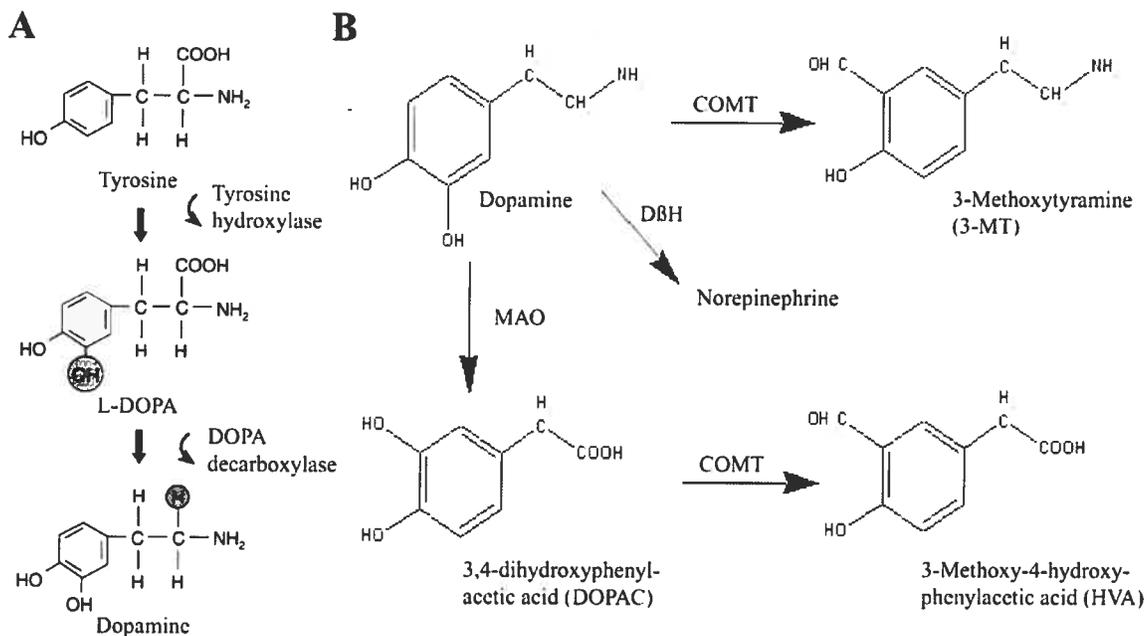
Ce travail débute par une brève présentation de l'anatomie fonctionnelle du système dopaminergique afin de souligner l'importance physiologique et fonctionnelle de notre sujet d'étude. Nous examinerons par la suite en détails les connaissances actuelles sur la libération somatodendritique de la dopamine et sur ses mécanismes. Cette revue devrait permettre de situer notre étude et d'en dégager les objectifs. Nous présenterons ensuite un manuscrit devant être soumis prochainement pour publication dans lequel sont décrits nos méthodes et résultats obtenus. En final, nous discuterons de la signification et de la portée de nos résultats, avant de conclure par quelques perspectives et pistes intéressantes, notamment afin de caractériser plus en détails les mécanismes moléculaires impliqués dans l'exocytose de la dopamine dans les dendrites.

1. Système dopaminergique

1.1 Métabolisme de la dopamine

Il y a 50 ans à peine, la dopamine était considérée comme une simple étape dans la synthèse de la noradrénaline. Son rôle en tant que neurotransmetteur à part entière ne fut établi qu'en 1958 (Carlsson et al., 1958). Comme pour toutes les catécholamines, la synthèse de la dopamine se fait à partir de l'acide aminé tyrosine (figure 1A). Une fois passée de la circulation sanguine au neurone dopaminergique, la L-tyrosine est convertie en L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH). Ceci constitue l'étape limitante de la synthèse de la dopamine (Levitt et al., 1965) et représente donc un point névralgique pour sa régulation. La TH est effectivement particulièrement sensible aux conditions physiologiques environnantes, comme par exemple aux niveaux intracellulaires de calcium (Leviel et al., 1994; Roth & Elsworth, 1995). Ensuite, l'enzyme L-DOPA décarboxylase assure la conversion de L-DOPA en dopamine. La forte activité catalytique de cette enzyme maintient des niveaux généralement très faibles de L-DOPA dans le cerveau. Pour cette raison, il est possible d'augmenter drastiquement les niveaux de dopamine dans le cerveau par l'administration systémique de L-DOPA.

Figure 1 – Voies métaboliques de la dopamine



A. Synthèse de la dopamine à partir de la tyrosine.

B. Dégradation de la dopamine.

La dopamine intracellulaire est dégradée assez rapidement. Il existe trois principaux métabolites de la dopamine dans le cerveau (figure 1B) : la 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPAC), l'acide homovanillique (HVA) et la 3-méthoxytyramine (3-MT). La dopamine intracellulaire est convertie en DOPAC par l'enzyme monoamine oxydase (MAO), suite à quoi une partie de la DOPAC diffuse lentement à l'extérieur du neurone pour être éliminée du cerveau, alors qu'une autre partie est convertie en HVA par l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase (COMT). La dopamine extracellulaire est convertie en 3-MT par l'action de la COMT. Alors que la DOPAC et la HVA sont éliminées du cerveau assez rapidement, la 3-MT y demeure plus longtemps et a donc servi par le passé comme indicateur de la libération de dopamine (Carlsson & Lindqvist, 1963; Korf et al. 1976). La formation de DOPAC est quant à elle un bon indicateur de la synthèse de dopamine puisqu'une

augmentation de la synthèse de la dopamine induira une augmentation parallèle de la DOPAC³. Nous y reviendrons plus tard, mais la mesure par chromatographie de la DOPAC et du HVA permet de comparer le métabolisme de la dopamine entre différentes régions du cerveau, notamment entre les zones terminales et les zones somatodendritiques du système dopaminergique (Nissbrandt et al., 1985; Hallman & Jonsson, 1984; Nissbrandt & Carlsson, 1987).

Le principal moyen pour éliminer la dopamine une fois celle-ci libérée dans l'espace extracellulaire consiste toutefois à la transporter vers l'intérieur de la cellule, où elle sera en partie recyclée. Le transporteur membranaire de la dopamine (DAT, de l'anglais « dopamine transporter ») se charge de cette recapture. Son clonage en 1991 (Giros et al., 1991; Kilty et al., 1991; Shimada et al., 1991; Usdin et al., 1991) a révélé une homologie entre le DAT des rongeurs et de l'humain de l'ordre de 90% (Chen & Reith, 2000). Le DAT est présent sur la presque totalité des neurones dopaminergiques et est ainsi fortement co-localisé avec la TH (Ciliax et al., 1995, 1999). Par contre, les cellules gliales comme les astrocytes ne semblent pas exprimer le DAT (Ciliax et al., 1995; Nirenberg et al., 1996b). Au niveau sous-cellulaire, la présence du DAT est principalement extra-synaptique (Nirenberg et al., 1996b), tout comme une grande partie des récepteurs à la dopamine (Sesack et al., 1994; Yung et al., 1995). Cette localisation stratégique révèle l'influence du DAT sur les niveaux extracellulaires de dopamine: son activité déterminera le volume tissulaire au sein duquel des récepteurs pourraient être activés par la dopamine, ainsi que la

³ Pour une description plus détaillée du catabolisme de la dopamine, consulter l'ouvrage de Feldman, Meyer et Quenzer, *Principles of Neuropharmacology*, publié en 1997.

durée de cette activation. Par conséquent, l'activité post-synaptique de la dopamine dépendra de sa libération, mais également de l'activité du DAT.

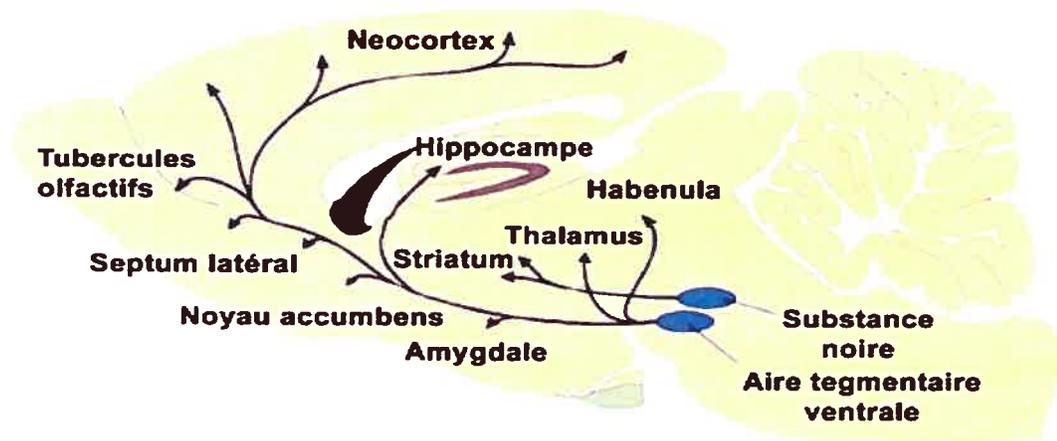
La recapture de dopamine peut être régulée par l'action de kinases telles que la PKC (Pristupa et al., 1998; Melikian et al., 1999) ou la CaM Kinase II (Uchikawa et al., 1995; Uchida et al., 1998). Ces kinases ne semblent cependant pas réguler directement le DAT, mais plutôt son internalisation (Chang et al., 2001; Pristupa et al., 1998; Melikian et al., 1999). Par ailleurs, l'activité du DAT pourrait aussi être modulée par l'autorécepteur D2 (Meiergerd et al., 1993; Cass & Gerhardt, 1994; Dickinson et al., 1999). Notons finalement que l'activité du DAT diminue avec la température ambiante (Holz & Coyle, 1974), ce qui peut avoir d'importantes conséquences pour certains modèles expérimentaux. Par exemple, les mesures *in vitro* de dopamine extracellulaire par voltamétrie cyclique sont souvent réalisées à une température inférieure à la température corporelle, ceci afin de diminuer la recapture de la dopamine et donc d'augmenter les niveaux extracellulaires de dopamine (Bull et al., 1990; Cragg et al., 1997).

1.2 Anatomie fonctionnelle

Le système dopaminergique mésencéphalique du rat regroupe environ 45 000 neurones contenant de la dopamine (German & Manaye, 1993). L'humain dans la quarantaine en compte près de 600 000 (Bogerts et al., 1983). Dalhström et Fuxe (1964a, b) ont remarqué que les corps cellulaires des neurones dopaminergiques étaient pratiquement

tous regroupés dans le mésencéphale ventral, au sein de trois régions anatomiques (aussi désignées par une nomenclature alphanumérique) : le noyau rétrosubstantiel (A8), la substance noire compacte (SNc; A9) et l'aire tegmentaire ventrale (ATV; A10). En combinant diverses techniques neuroanatomiques à l'histofluorescence, deux principales voies de projections dopaminergiques ont été identifiées (figure 2). En premier lieu, la voie nigrostriée, qui regroupe près de la moitié des neurones dopaminergiques et relie les neurones de A9 et A8 au striatum dorsal (noyau caudé, putamen). En second lieu, la voie mésocorticolimbique dont les neurones du groupe A10 projettent vers le noyau accumbens (NAcc), l'amygdale, les tubercules olfactifs et d'autres régions corticales et sous-corticales (Dalhström et Fuxe, 1964a, b; Ungerstedt, 1971). Depuis lors, les neurones des régions A8 et A9 formant la voie nigrostriée ont été étroitement associés au contrôle moteur et à la maladie de Parkinson, tandis que les neurones de la région A10 formant la voie mésocorticolimbique ont été impliqués dans les fonctions motivationnelles et cognitives, ainsi que dans la schizophrénie et la dépendance aux drogues. On notera au passage l'existence d'autres groupes de cellules dopaminergiques, notamment au sein du système tubéro-infundibulaire (A12) situé à la base de l'hypothalamus et impliqué dans le contrôle neuroendocrinien, ainsi que dans la rétine et le bulbe olfactif. Au cours de ce travail, nous nous concentrerons cependant sur les deux principales voies dopaminergiques ascendantes.

Figure 2 – Principales voies dopaminergiques chez le rat (Modifié de Bear et al. 1997).



Ce portrait classique de l'anatomie du système dopaminergique constitue une simplification pratique mais en partie inexacte. On retrouve en effet des neurones de la SNc projetant vers le cortex et des neurones de l'ATV projetant vers le striatum dorsal (Fallon & Moore, 1978b, Gerfen et al., 1987b; Jimenez-Castellanos & Graybiel, 1987; Arsenault et al., 1988), de sorte que la SN et l'ATV pourraient ne former qu'un seul groupe de cellules dopaminergiques. Fallon et Moore ont cependant remarqué, dès 1978, que la population des neurones dopaminergiques mésencéphaliques était organisée en deux étages (« dorsal and ventral tiers »; Fallon & Moore, 1978b). L'étage dorsal regroupe les neurones de l'ATV et de la SNc dorsale, tandis que l'étage ventral est constitué des neurones de la SNc ventrale (Fallon & Moore, 1978b).

De nombreuses caractéristiques anatomiques, pharmacologiques et physiologiques spécifiques à chaque population ont depuis été identifiées (Tableau 1). Sur le plan morphologique et anatomique, les neurones de la SNc dorsale ont un corps cellulaire fusiforme et leurs dendrites s'étendent dans l'axe médio-latéral sans sortir de la SNc, tandis que les neurones de la SNc ventrale ont un corps cellulaire multipolaire dont les dendrites s'étendent surtout dans le plan dorso-ventral, pénétrant ainsi la substance noire réticulée (SNr) (Fallon & Moore, 1978a; Gerfen et al., 1987b). Les axones respectent grossièrement une topographie médio-latérale et rostro-caudale, de sorte qu'une cellule de la SNc située latéralement et rostralement projettera vers le striatum latéral et rostral. La topographie est par contre inverse dans l'axe dorso-ventral, de sorte que les axones de l'étage dorsal projettent surtout vers le striatum ventral et le NAcc, alors que les axones de l'étage ventral projettent surtout vers le striatum dorsal (Fallon et Moore, 1978b; Gerfen et al., 1987b).

La topographie dorso-ventrale correspond au portrait anatomique classique voulant que la SNc projette vers le striatum (voie nigrostriée) et que l'ATV projette vers le NAcc et les régions cortico-limbiques (voie mésocorticolimbique). Cependant, comme nous l'avons déjà dit, les neurones de la SN et les neurones de l'ATV se partagent l'innervation striatale. Les neurones de l'étage dorsal (ATV et SNc dorsale) projettent vers les zones dites « matricielles » du striatum, alors que les neurones de l'étage ventral (SNc ventrale) projettent surtout vers les zones appelées « striosomes » (Gerfen et al., 1987a,b; Jimenez-Castellanos & Graybiel, 1987). On attribue aux zones matricielles innervées par les neurones dopaminergiques de l'étage dorsal un rôle particulier dans l'intégration limbique, alors que les striosomes innervés par les neurones dopaminergiques de l'étage ventral

auraient un rôle dans l'intégration sensori-motrice proprement dite (Graybiel et al., 1991; Smith & Kieval, 2000).

Tableau 1 – Caractéristiques des neurones dopaminergiques des étages dorsal et ventral

| Caractéristiques | Étages | |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Dorsal | Ventral |
| Régions | ATV et SNc dorsale | SNc ventrale |
| Morphologiques | | |
| Corps cellulaire | Fusiforme | Multipolaire |
| Orientation dendritique | Médio-latérale | Dorso-ventrale |
| Prolongements dendritiques | Restent dans la SNc | S'étendent dans la SNr |
| Innervation du striatum | Espace matriciel | Striosomes |
| Pharmacologiques | | |
| Expression des D2 et DAT | + | +++ |
| Expression de la calbindin | +++ | - |
| Quantité de mélanine | +++ | + |
| Sensibilité à la MPTP | +++ | + |
| Susceptibilité au Parkinson | + | +++ |
| Physiologiques | | |
| Transmission dominée par | La libération | La recapture |
| Type de transmission | Surtout volumétrique? | Surtout synaptique? |
| Fonction dominante | Limbique | Sensorimotrice |

Mentionnons à ce titre que les neurones de l'étage ventral sont les premiers à dégénérer lors de la maladie de Parkinson (Hirsch et al., 1988; Gibb & Lees, 1991), ce qui suggère une implication plus étroite de leur part dans le contrôle moteur. Étant donné que cette maladie affecte spécialement les neurones du cerveau contenant de la mélanine⁴, un lien a été proposé entre la neurodégénérescence et la mélanine, dont la formation par oxydation de la dopamine pourrait produire des radicaux libres. Supportant l'hypothèse d'un risque associé à la mélanine, la toxine MPTP (et son métabolite actif, le MPP+) tuent surtout les neurones contenant le plus de mélanine (D'Amato et al., 1986). Or, ces neurones sont ceux de l'étage dorsal (Gibb & Lees, 1991; Parent & Lavoie, 1993). Ce paradoxe apparent d'une sensibilité particulière des neurones de l'étage dorsal au MPTP, alors que ceux de l'étage ventral dégèrent préférentiellement dans la maladie de Parkinson souligne le fait que le traitement aigu avec la toxine MPTP ne constitue qu'un modèle imparfait de la maladie de Parkinson, laquelle implique plutôt une neuro-dégénérescence chronique. Elle montre aussi que le lien entre le stress oxydatif, la mélanine et la maladie de Parkinson reste à être clarifié⁵. Il n'en demeure pas moins que les neurones qui dégèrent préférentiellement lors de la maladie de Parkinson projettent vers le striatum dorsal plutôt que vers les zones cortico-limbiques, ce qui corrobore malgré tout le portrait classique

⁴ Hajdu et al. (1973) rapportent que les premières descriptions de la SN, par Vicq d'Azyr (1786) et Soemmering (1791), mentionnaient déjà la forte présence de pigment noir dans cette structure. Ils rapportent aussi que Blocq et Marinesco (1893) et Brissaud (1895) ont décrit un cas d'hémi-parkinsonisme gauche associé à une destruction de la SN droite, ce qui leur a permis d'émettre l'hypothèse d'un lien entre cette maladie et la SN.

⁵ Une autre piste intéressante pour comprendre l'étiologie de la maladie de Parkinson provient des études réalisées avec la 6-hydroxydopamine, une drogue causant la mort sélective des neurones dopaminergiques en pénétrant à l'intérieur des neurones via le DAT (Nass & Blakely, 2003; Miller et al., 1999; Sachs & Jonsson, 1975). Cette piste, qui suggère un lien entre la recapture de toxines par le DAT et le développement de la maladie de Parkinson, est compatible avec la susceptibilité accrue à la maladie de Parkinson des neurones dopaminergiques de l'étage ventral, qui expriment aussi davantage le DAT.

distinguant le rôle fonctionnel des deux principales voies dopaminergiques (Manaye et al., 1989; German et al., 1989).

Sur le plan pharmacologique, l'expression du DAT (Hurd et al., 1994; Blanchard et al., 1994; Haber et al., 1995; Ciliax et al., 1995, 1999) et du récepteur D2 (Graybiel & Moratalla, 1989; Hurd et al., 1994; Haber et al., 1995) est plus forte dans les neurones de l'étage ventral. Ces caractéristiques confèrent un rôle prononcé de la recapture dans la régulation de la transmission dopaminergique. Au contraire, les caractéristiques pharmacologiques des neurones de l'étage dorsal font en sorte que la transmission dopaminergique y est davantage marquée par la capacité de libération et le taux de décharge (Garris et Wightman, 1994). Nous reviendrons sur ce point subséquentment.

En somme, bien que la majorité des projections vers les zones cortico-limbiques soient issues de l'ATV et que la SNc projette surtout vers le striatum dorsal, la clé pour comprendre l'anatomie fonctionnelle du système dopaminergique passent par une distinction entre neurones de l'étage dorsal et neurones de l'étage ventral. Ce raffinement du portrait anatomique classique permet de mieux comprendre et peut-être de mieux prévoir les effets de drogues agissant sur le système dopaminergiques, sachant que certaines populations de neurones seront davantage sensibles à certaines drogues (MPTP versus cocaïne) tout comme certaines fonctions seront davantage affectées que d'autres par leurs actions.

1.3 Transmission volumique

L'examen en microscopie électronique des terminaisons axonales des neurones monoaminergiques, souvent appelées varicosités, révèle un portrait bien particulier. De nombreuses varicosités ne possèdent pas de partenaire synaptique, et semblent plutôt se terminer librement dans l'espace intercellulaire (Tennyson et al., 1974; Descarries et al., 1975). Pourtant, un certain nombre de varicosités forment effectivement des contacts synaptiques avec tout ce que cela implique de spécialisations morphologiques à la membrane (Descarries et al., 1980; Groves, 1980), de sorte que cette organisation anatomique peut donner lieu à deux types de transmission : synaptique et asynaptique⁶ (Descarries et al., 1996). Puisque l'incidence des contacts synaptiques varie entre les différentes régions ciblées par les projections monoaminergiques, cette incidence déterminera quel type de transmission prédomine dans chacune des régions (Descarries & Mechawar, 2000).

En accord avec les observations anatomiques, l'étude électrophysiologique des propriétés de la libération de dopamine permet aussi de distinguer deux types de transmission. Grâce à la mesure de dopamine par voltamétrie cyclique et à l'analyse cinétique des enregistrements selon les équations de Michaelis-Menten, Garris et Wightman (1994) ont défini deux types de transmission en fonction du ratio entre vitesse de libération et vitesse de recapture. Ainsi, les enregistrements de dopamine dans le cortex

⁶ Agnati et al. (1986) ont proposé les termes « wiring transmission » et « volume transmission »; ils rappellent quelques autres noms aussi employés pour décrire la transmission asynaptique dans le chapitre introductif (Agnati & Fuxe, 2000) du livre intitulé *Volume Transmission Revisited*, publié en 2000 chez Elsevier.

préfrontal et l'amygdale reflètent un ratio élevé de libération versus recapture; Garris et Wightman (1994) qualifient donc cette transmission comme dominée par la libération (« release dominated »). Au contraire, les niveaux de dopamine mesurés dans le striatum dorsal reflètent un faible ratio; la transmission y est donc dominée par la recapture (« uptake dominated »). La transmission dominée par la libération s'accompagne généralement d'un contrôle plus faible par l'autorécepteur D2 (Westerink et al., 1994; Cragg et al., 2000), et d'une recapture significative de la dopamine par le transporteur membranaire de la noradrénaline, puisque le DAT y est si rare (Cragg et al., 1997; Moron et al., 2002). Les caractéristiques de la transmission dominée par la libération favorisent une plus grande diffusion de la dopamine libérée (Cragg et al., 2001) et constituent donc les éléments clés de la transmission volumique. Comme nous l'avons constaté dans la section précédente (voir tableau 1), les distinctions pharmacologiques qui sous-tendent les deux types de transmission correspondent aux différences entre neurones dopaminergiques des étages dorsal et ventral.

1.4 Rôle de la dopamine dans le cerveau

La transmission volumique dans le cerveau fait en sorte que les cellules des régions où projettent les neurones dopaminergiques sont constamment baignées par une certaine concentration de dopamine (Descarries et al., 1996; Descarries & Mechawar, 2000). Dans ce contexte, le rôle du DAT n'est plus d'éliminer la dopamine de l'espace extracellulaire, mais bien d'en réguler la concentration. La présence majoritairement extrasynaptique des

récepteurs à dopamine prend également tout son sens dans ce contexte. Cette situation où les cellules cibles se retrouvent baignées par une concentration variable de dopamine nous permet d'imaginer comment la dopamine pourrait agir en tant que régulateur au sein des multiples régions cérébrales. La dopamine ambiante pourrait permettre de sélectionner un circuit nerveux plutôt qu'un autre, de favoriser temporairement l'activation d'un certain patron de connexions plutôt qu'un autre. Grâce à la transmission volumique, le rôle des neurones dopaminergiques n'est plus seulement de transmettre un influx nerveux à d'autres neurones, mais aussi de réguler la transmission entre les neurones cibles.

Cette capacité du système dopaminergique à réguler la transmission au sein de ses régions de projection peut rendre compte du rôle central de la dopamine dans la formation de nouvelles associations. Ainsi, le système dopaminergique est impliqué dans le renforcement positif et donc l'apprentissage relié à la récompense (Waelti et al., 2001; Roitman et al., 2004). L'activité des neurones dopaminergiques du mésencéphale augmente suite à la présentation d'une récompense ou d'un stimulus conditionné associé à la récompense (Schultz et al., 1993; Roitman et al., 2004). Lorsqu'une récompense prévue n'est pas présentée, ces neurones montrent une légère dépression de leur activité. Après avoir examiné attentivement les réponses des neurones dopaminergiques, Schultz et ses collaborateurs (1997, 2000) proposent que ces neurones soient particulièrement sensibles à la prévisibilité des récompenses. Ainsi, le système dopaminergique semble en mesure de représenter la valeur ou l'importance des stimuli extérieurs. Cette représentation servira à influencer les circuits sensorimoteurs, limbiques et corticaux en fonction des demandes environnementales. Un des rôles principaux du système dopaminergique consisterait par

conséquent à assurer le développement et l'exécution de comportements bien adaptés aux demandes environnementales.

Les dérèglements d'un système nous apprennent souvent beaucoup sur son fonctionnement. Ainsi, la dépendance aux drogues psychotropes illustre admirablement l'implication du système dopaminergique dans le maintien et la formation de nouveaux schèmes moteurs, cognitifs et motivationnels. Par exemple, la dépendance aux drogues entraîne le développement d'automatismes cognitifs et comportementaux qui envahissent progressivement le fonctionnement de l'individu (Tiffany, 1990; Bargh & Ferguson, 2000). Il suffit de penser aux gestes moteurs précis impliqués dans le simple acte de sortir une cigarette du paquet, de l'allumer et d'en respirer la fumée; un fumeur est capable d'exécuter cette séquence sans y porter la moindre attention. Dans le cas des drogues illicites, la difficulté d'accès forcera les personnes dépendantes à consacrer beaucoup plus de temps et d'énergie afin de se procurer leur drogue, au détriment d'autres comportements plus sains. En parallèle, la dépendance aux drogues engendre un sentiment croissant de manque chez l'individu, ce qui l'incite à se consacrer sans cesse davantage à la recherche et la consommation de sa drogue. Cet aspect en particulier sera fortement conditionné par les éléments environnementaux qui accompagnent généralement la consommation et ces associations pourront perdurer des années même après l'arrêt de la consommation. Elles sont ainsi responsables des rechutes et constituent ce que l'on appelle en anglais « drug urges ». Le système dopaminergique est impliqué de manière cruciale dans ces deux aspects intimement liés de la dépendance aux drogues : le développement et l'exécution d'automatisme ainsi que le sentiment de manque. Ces deux aspects résultent probablement

d'une activation excessive du système dopaminergique (Le Moal, 1995; Everitt & Wolf, 2002). L'abus de drogues étant un phénomène éminemment social, voire sociétal, il ne serait pas approprié de le réduire à une dysfonction neurologique et telle n'est pas notre intention. Il n'en demeure pas moins que l'établissement de comportements nocifs pour l'individu centrés sur la consommation abusive d'une substance étrangère, ceci au détriment d'autres comportements pourtant essentiels au maintien de la santé de l'individu, implique directement le système dopaminergique. De surcroît, nous savons aujourd'hui que la quasi-totalité des drogues susceptibles de générer une dépendance—cocaïne, opiacées, amphétamines, alcool, caféine, cannabis, tabac—stimulent plus ou moins directement la libération de dopamine.

L'administration de psychostimulants tels que l'amphétamine ou la cocaïne induit une libération de dopamine non seulement dans les zones terminales, mais aussi dans les zones somatodendritiques du système dopaminergique (Bradberry & Roth, 1989; Kalivas & Duffy, 1991). Or, suite à une pré-exposition, la même dose de la drogue induit une libération plus grande de dopamine, phénomène que l'on nomme sensibilisation (Robinson & Becker, 1986; Kalivas & Stewart, 1991). La sensibilisation à l'amphétamine s'accompagne d'une certaine stéréotypie comportementale. Par ailleurs, elle est facilitée par le stress, peut être conditionnée par divers éléments du contexte environnemental et peut perdurer durant des années, même en l'absence de prise de la drogue. La sensibilisation du système dopaminergique est donc considérée comme un aspect déterminant du développement de la dépendance aux drogues d'abus (Berke & Hyman, 2000).

Il est intéressant de noter que l'induction de la sensibilisation du système dopaminergique dépende de la libération somatodendritique de dopamine. En effet, l'injection d'amphétamine directement dans l'ATV suffit à induire le développement de la sensibilisation, alors que l'injection d'amphétamine dans le NAcc s'avère inefficace (Kalivas & Weber, 1988; Vezina & Stewart, 1990). La dopamine libérée augmenterait alors la libération de glutamate ainsi que l'expression du FGF-2 (basic fibroblast growth factor) par les astrocytes (Flores et al., 1998; Flores & Stewart, 2000). On ignore cependant comment l'expression accrue de FGF-2 induit la sensibilisation de la libération de dopamine. Ces résultats témoignent néanmoins de l'importance fonctionnelle de la libération somatodendritique.

Ayant maintenant établi le cadre anatomique et fonctionnel général de notre sujet d'étude, nous pouvons aborder directement la question de la libération somatodendritique de la dopamine et ses mécanismes.

2. Libération somatodendritique de la dopamine

2.1 La découverte

Björklund et Lindvall (1975) observèrent pour la toute première fois la présence de catécholamines dans les dendrites des neurones de la SN, grâce à une nouvelle technique d'histofluorescence. La méthode consistait essentiellement à faire réagir les catécholamines présentes dans les neurones avec l'acide glyxolique de façon à produire une molécule hautement fluorescente, le 2-carbosyméthyl-3,4-dihydroisoquinolinium [consulter Björklund et al. (1972) pour une description plus détaillée de la méthode].

La méthode d'histofluorescence utilisée auparavant pour visualiser les neurones catécholaminergiques, développée par Falck et Hillarp (Carlsson et al., 1962), limitait la fluorescence aux zones de fortes présence de catécholamines, soit les varicosités axonales et les corps cellulaires. Cette méthode impliquait la réaction des catécholamines avec le formaldéhyde et le produit de cette réaction émettait moins de fluorescence que pour la réaction avec l'acide glyxolique, bien que le principe demeure essentiellement le même. Ainsi, puisque la méthode d'histofluorescence de Falck et Hillarp n'était pas assez sensible pour détecter la présence de catécholamines dans les dendrites, on crut durant plusieurs années que seuls les axones contenaient et donc libéraient potentiellement la dopamine (Bloom & Battensberg, 1976). La dopamine venait d'ailleurs tout juste d'être promue au

rang des neurotransmetteurs centraux (Carlsson et al., 1958) et les principales voies catécholaminergiques du cerveau venaient d'être identifiées (Dalhström et Fuxe, 1964a).

Grâce à leur méthode améliorée d'histofluorescence, Björklund & Lindvall (1975) observèrent non seulement la présence de catécholamines dans les dendrites mais aussi que ce signal disparaissait complètement suite à un traitement avec la réserpine, connue pour empêcher le stockage vésiculaire des catécholamines (Pletscher et al., 1973). De plus, l'incubation de tranches de cerveau durant 20 minutes en présence de dopamine $1\mu\text{M}$ restaurait le signal. Ce retour de la fluorescence pouvait être bloqué à son tour par l'ajout de désipramine ou de benztropine, deux drogues bloquant la recapture de la dopamine. Ces données montrèrent ainsi que les dendrites de la SN pouvaient non seulement contenir mais aussi recapter la dopamine. Devant d'autres résultats de microscopie électronique indiquant que les dendrites de la SN pouvaient aussi recapter la ^3H -dopamine (Parizek et al., 1971) et qu'ils contenaient de petites vésicules telles qu'on en retrouve dans les terminaisons axonales (Hajdu et al., 1973), Björklund & Lindvall (1975) proposèrent que les dendrites des neurones dopaminergiques puissent aussi libérer la dopamine.

La démonstration directe de la libération somatodendritique de dopamine *in vitro* fut présentée l'année suivante. Deux rapports furent publiés qui supportaient l'hypothèse de Björklund & Lindvall (1975). Geffen et al. (1976) rapportèrent la libération évoquée par 30 mM potassium de ^3H -dopamine dans des tranches de SN. Paden et al. (1976) montrèrent la libération de ^3H -dopamine induite par l'amphétamine dans une préparation de blocs de tissu comprenant uniquement la SN. Ainsi, ces chercheurs firent la démonstration qu'une

préparation *in vitro* ne contenant que les corps cellulaires et dendrites des neurones dopaminergiques pouvait libérer la dopamine. L'année suivante, Nieoullon et al. (1977) rapportèrent la première démonstration *in vivo*⁷ du phénomène. Avec la technique de *push-pull canula* chez le chat anesthésié, ils mesurèrent la libération de ³H-dopamine dans la SN préalablement exposée à de la ³H-tyrosine. Ils notèrent alors une augmentation de la libération suite à des traitements avec le potassium, l'amphétamine ou la benztropine, tous directement introduits dans la canule.

Les avancées concernant la libération somatodendritique stimulèrent par ailleurs la recherche sur un phénomène parallèle. En 1973, Bunney et al. avaient montré que l'administration d'agonistes des récepteurs à la dopamine (apomorphine, dopamine) réduisait la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques alors que l'administration d'antagonistes (chlorpromazine, halopéridol) augmentait cette fréquence de décharge. Ces données suggéraient la présence de récepteurs à la dopamine sur les neurones dopaminergiques, or Bunney et al. (1973) avaient conclu que la dopamine devait provenir d'une boucle dopaminergique de rétroaction négative. Rappelons que les études d'histofluorescence suggéraient à cette époque que seuls les terminaisons axonales et les corps cellulaires pouvaient contenir de la dopamine. Parizek et al. (1971) avait pourtant constaté que la SN contenait très peu de terminaisons capables de recapter la ³H-dopamine, celle-ci se retrouvant surtout dans les dendrites. Les terminaisons présentes dans la SN

⁷ Notons que Korf et al. en 1976 rapportèrent une augmentation des métabolites de la dopamine dans les régions dopaminergiques terminales et somatodendritiques suite à une stimulation des voies dopaminergiques ascendantes chez le rat anesthésié. Comme les régions somatodendritiques réagirent de façon semblable aux régions terminales, ils émirent la suggestion que les dendrites puissent libérer la dopamine suite à une stimulation antidromique.

recaptaient plutôt la ^3H -serotonine. Ainsi, en 1975, Groves et al. proposèrent que l'inhibition du neurone dopaminergique induite par l'activation de récepteurs à la dopamine présents sur ce neurone, ce qu'ils nomment alors « self-inhibition » ou auto-inhibition⁸, résultait d'une libération de dopamine par les dendrites de ce même neurone ou de ses voisins. À la suite d'expériences impliquant l'injection d'amphétamine ou d'halopéridol directement dans la SN ou le striatum, ainsi que l'enregistrement électrophysiologique simultané de l'activité neuronale dans ces deux régions, ils purent dissocier les effets somatodendritiques des effets terminaux de l'amphétamine. Leurs résultats permirent d'apprécier la pertinence fonctionnelle de la libération somatodendritique. Notons que Groves et al. étaient au courant de la proposition faite par Björklund et Lindvall (1975) (Groves et al., 1975). Ainsi, la démonstration directe de la libération somatodendritique de la dopamine en 1976 et 1977 venait supporter le principe d'auto-inhibition, établissant par le fait même la pertinence physiologique du phénomène.

Par la suite, Beart & McDonald (1980) décrivent la libération évoquée de ^3H -dopamine dans des tranches d'ATV, élargissant la notion de libération somatodendritique à l'ensemble des neurones dopaminergiques. Cuello & Iversen (1978) réussirent même à mesurer la libération de dopamine endogène à partir de tranches de SN. Ces derniers résultats achevèrent ainsi de consolider les bases morphologiques, biochimiques ainsi qu'électrophysiologiques sur lesquelles repose la mise en évidence de la libération somatodendritique de dopamine. Subséquemment, les niveaux tissulaires de dopamine furent mesurés dans les régions somatodendritiques (Cuello & Iversen, 1978) et la présence

⁸ Notons que le terme "autoreceptor", d'où découle l'expression *auto-inhibition*, fut introduit par Carlsson (1975).

de dopamine dans les dendrites fut confirmée par l'étude de la recapture du faux neurotransmetteur 5-hydroxydopamine (Mercer et al., 1979; Hattori et al., 1979). De plus, la libération somatodendritique de ^3H -dopamine fut mesurée *in vitro* (Geffen et al., 1976; Paden et al., 1976; Beart & McDonald, 1980) ainsi *qu'in vivo* (Nieoullon et al., 1977). Par conséquent, Cheramy et al. purent conclure dans un article de revue publié dans Nature, en 1981 : « Our knowledge concerning nigral dopaminergic transmission is as broad as that acquired for dopaminergic transmission intervening at the level of nerve terminals in the striatum. ». L'observation *in vivo* de la libération somatodendritique de dopamine endogène ne fut en revanche rapportée qu'en 1989 (Bradberry & Roth, 1989; Kalivas et al., 1989), grâce à l'utilisation de la microdialyse chez le rat anesthésié.

2.2 Propriétés physiologiques

Au cours des années suivant sa découverte, la libération somatodendritique a été l'objet de nombreuses études visant à en clarifier les caractéristiques physiologiques, la question dominante étant bien sûr : Quelles différences ou similitudes existe-t-il avec la libération terminale, ayant lieu aux terminaisons axonales?

2.2.1 Métabolisme dans les dendrites

La réserpine, qui bloque le chargement vésiculaire de la dopamine (Pletscher et al, 1973), est un outil précieux pour déterminer la provenance de la dopamine libérée. Un effet

inhibiteur de la réserpine sur la libération démontre que celle-ci nécessite le chargement vésiculaire de neurotransmetteur, alors que l'absence d'effet peut indiquer deux choses : soit le neurotransmetteur libéré provient directement du cytoplasme et ne nécessite donc pas de stockage vésiculaire, soit il provient de stocks insensibles à la réserpine. La mesure des niveaux tissulaires de dopamine suite à un traitement avec la réserpine peut aussi fournir une information précieuse. En effet, comme la dopamine qui n'est pas stockée est dégradée très rapidement, on s'attend à observer une diminution des niveaux tissulaires de dopamine lorsqu'on empêche son stockage avec la réserpine (Carlsson, 1975). Or, les études avec la réserpine ont produit des résultats relativement intrigants.

Les études ayant examiné l'effet d'un traitement systémique avec la réserpine ont bel et bien noté une diminution des niveaux tissulaires de dopamine dans la SN et l'ATV (d'environ 75 à 80%), mais la sensibilité à la réserpine y semble moins grande que dans le striatum et le NAcc (près de 95% de diminution) (Beart & McDonald, 1980; Elvefors & Nissbrandt, 1991; Heeringa & Abercrombie, 1995). Deux interprétations sont susceptibles d'expliquer cette moindre sensibilité: (1) l'équilibre métabolique de la dopamine somatodendritique diffère de l'équilibre métabolique établi à la terminaison, de sorte que de plus grands niveaux de dopamine cytosolique peuvent être maintenus dans les dendrites ou que les stocks de dopamine y récupèrent plus rapidement que dans les terminaisons axonales; (2) une partie des stocks dendritiques de dopamine est insensible à la réserpine. Il semble que la première interprétation soit la bonne. L'examen de l'effet de la réserpine à différents temps après le traitement révèle que les niveaux tissulaires de dopamine dans la région somatodendritique récupèrent de près de 25% après 24 heures, tandis que les

niveaux tissulaires dans les régions terminales ne montrent aucun signe de récupération après 24 heures (Elvefors & Nissbrandt, 1991; Heeringa & Abercrombie, 1995). Cette capacité de récupération accrue indique que le renouvellement de la dopamine est plus rapide dans le compartiment somatodendritique que dans les terminaisons, ce qu'ont montré plus directement des études du renouvellement de la dopamine et de ses métabolites suite au blocage des enzymes de dégradation MAO et COMT (Hallman & Jonsson, 1984; Nissbrandt & Carlsson, 1987). En outre, les sites de libération somatodendritique ne sont pas éloignés du corps cellulaire comme les terminaisons axonales, ce qui pourrait favoriser la réapparition rapide de nouvelles vésicules capables de stocker la dopamine à nouveau.

L'utilisation de l'amphétamine peut aussi nous renseigner sur les capacités de stockage de la dopamine aux sites de libération, puisque son action s'exerce en partie sur la dopamine stockée (Sulzer & Rayport, 1990; Heeringa et Abercrombie, 1995). Or, l'augmentation de dopamine extracellulaire induite par l'amphétamine est proportionnellement moins grande dans l'ATV et la SNc que dans le NAcc et le striatum (Kalivas et al., 1989, Robertson et al., 1991). La moins grande sensibilité à l'amphétamine indique qu'il y a proportionnellement moins de dopamine stockée dans les régions somatodendritiques qu'aux terminaisons. Cette conclusion est compatible avec la rareté relative de vésicules dans les dendrites par rapport aux terminaisons axonales (Groves & Linder, 1983; Wassef et al., 1981).

Les études utilisant la réserpine et l'amphétamine ont ainsi révélé un équilibre métabolique différent dans les dendrites. Le renouvellement accru de la dopamine couplé à

une capacité de stockage plus faible contribuera effectivement à augmenter le ratio dopamine cytosolique/dopamine vésiculaire (Heeringa & Abercrombie, 1995). Certes, l'action de la réserpine supporte l'hypothèse d'un mécanisme vésiculaire pour la libération somatodendritique; on notera cependant qu'un ratio plus élevé de dopamine cytosolique favorisera l'induction d'un transport inverse. Nous reviendrons plus en profondeur sur cette question dans la section consacrée au mécanisme de la libération somatodendritique de la dopamine.

2.2.2 Sensibilité au calcium extracellulaire

Une particularité de la libération somatodendritique par rapport à la libération terminale est sa sensibilité au calcium extracellulaire. De nombreuses études ont démontré la dépendance de la libération somatodendritique de dopamine vis-à-vis du calcium extracellulaire (Geffen et al., 1976; Cuello & Iversen, 1978; Beart & McDonald, 1980; Kelly et al., 1985; Bull et al.; 1990; Westerink et al., 1994; Elverfors et al., 1997; Rice et al., 1997; Bergquist et al., 1998; Hoffman & Gerhardt, 1999; Chen & Rice, 2001). Cependant, contrairement à la libération terminale, la libération somatodendritique n'est pas complètement abolie par l'élimination momentanée du calcium extracellulaire (Bergquist et al., 1998; Hoffman & Gerhardt, 1999; Chen & Rice, 2001). Chen et Rice (2001) ont examiné ce phénomène en détail et observé que la libération terminale était absente en présence de 0 et 0,5 mM calcium, alors que la libération somatodendritique perdurait à hauteur de 40 à 60% dans ces conditions. Par ailleurs, la libération de dopamine dans le striatum continuait d'augmenter entre 1,5 et 2,4 mM de calcium, alors qu'elle

plafonnait à 1,5 mM de calcium dans la SNc. Ces résultats suggèrent donc une moins grande sensibilité face au calcium extracellulaire pour la libération somatodendritique que pour la libération terminale. Cependant, la libération somatodendritique nécessite tout de même la présence de calcium extracellulaire puisque la perfusion prolongée de salin ne contenant pas de calcium et contenant 1 mM EGTA (un chélateur de calcium) abolit la libération somatodendritique de dopamine (Rice et al., 1997).

2.2.3 Dépendance envers l'activité électrique

Les premières études à avoir utilisé la tétrdotoxine (TTX) pour déterminer l'implication du taux de décharge neuronal dans la libération somatodendritique de dopamine ont livré des résultats surprenants. Alors que la libération terminale était fortement diminuée dans le striatum suite à l'administration de TTX, la libération de dopamine *augmentait* dans la SN (Nieoullon et al., 1977; Cheramy et al., 1981). Ces études utilisaient la technique de push-pull canula chez le chat et mesuraient la libération de ³H-dopamine formée à partir de ³H-tyrosine perfusée en continu. Les expériences débutaient sans doute immédiatement après l'implantation de la canule, alors que nous savons aujourd'hui que, dans ce genre de protocole expérimental, la libération mesurée à l'intérieur d'un intervalle de 24 heures n'est que partiellement sensible au calcium et à la TTX, et représente donc probablement en partie une fuite de neurotransmetteur à partir du tissu endommagé (Westerink & De Vries, 1988). Plusieurs études ont finalement confirmé en microdialyse la sensibilité à la TTX de la libération somatodendritique de dopamine endogène (Bull et al., 1990; Robertson et al., 1991; Kalivas & Duffy, 1991; Santiago et al.,

1992; Westerink et al., 1994; Heeringa & Aebrcrombie, 1995), de sorte que cette caractéristique fait aujourd'hui consensus.

Malgré le fait qu'ils n'aient pas été confirmés, ces premiers résultats avec la TTX ont soulevé une question importante dont les suites ont révélé des particularités intéressantes à propos de la libération somatodendritique de dopamine. La question est celle de la dépendance ionique de la libération somatodendritique, dont l'étude a mis à jour le rôle particulier joué par les conductances calciques dans les dendrites. Effectivement, des conductances calciques capables de générer des potentiels d'action calciques ont été identifiées dans les neurones dopaminergiques (Llinas et al., 1984), et des stimuli reconnus pour induire une augmentation de la libération somatodendritique de dopamine (comme l'application de sérotonine et d'acétylcholine) facilitent ces courants calciques (Nedergaard et al., 1988, 1989). Ainsi, l'enregistrement de l'activité électrique au corps cellulaire des neurones dopaminergiques révèle deux composantes : une composante sodique dont l'origine se situe dans le premier segment de l'axone, et une composante calcique dont l'origine semblerait localisée aux portions distales des dendrites (Grace, 1990; Grace & Bunney, 1995). Les canaux potassiques insérés entre ces deux types de conductances les isoleraient en partie l'une de l'autre (Grace, 1990; Grace & Bunney, 1995), de sorte que l'on retrouverait deux compartiments fonctionnels relativement indépendants.⁹ Dans ces conditions, l'activation indépendante des conductances calciques sur les dendrites distales (par la sérotonine par exemple) pourrait induire la libération de dopamine à partir d'un

⁹ Hausser et al. (1995) ont néanmoins clairement montré que les potentiels d'action dendritiques possédaient une composante sodique majeure. D'ailleurs, la libération somatodendritique est inhibée par le blocage des canaux sodiques (nous en discuterons en détail dans la prochaine section).

nombre limité de dendrites, et ainsi permettre un contrôle plus fin des niveaux ambiants de dopamine. On a d'ailleurs montré que la libération somatodendritique de dopamine était relativement insensible à la propagation antidromique des potentiels d'action (Chiodo et al., 1984; Nissbrandt et al., 1985). Cette indépendance partielle contribuerait à renforcer le mécanisme d'auto-inhibition, puisque la libération somatodendritique est moins sensible à l'activation du récepteur D2 que la libération terminale (Cragg & Greenfield, 1997; Hoffman & Gerhardt, 1999).

Le tableau de la libération somatodendritique que nous venons de brosser correspond en outre au mode de fonctionnement des neurones possédant des dendrites dits "présynaptiques" tel que proposé par Ralston III (Nature, 1971). Cet auteur a suggéré, d'une part, la possibilité d'une libération simultanée de neurotransmetteur par les dendrites proximaux suite à la propagation antidromique du potentiel d'action (conductances sodiques), et d'autre part, la possibilité d'une libération sous contrôle local au niveau des dendrites distaux (conductances calciques), de sorte que les dendrites distaux possèdent leur propre sphère d'influence (Ralston III, 1971). Bien que proposé avant même la découverte de la libération somatodendritique de dopamine, le modèle de Ralston III est tout à fait compatible avec les données électrophysiologiques actuelles (consulter Grace & Bunney, 1995); ce modèle considère aussi les dendrites comme des acteurs déterminants dans la fonction du système dopaminergique.

2.3 Implications fonctionnelles

Nous savons aujourd'hui que la libération somatodendritique de dopamine est responsable de l'auto-inhibition des neurones dopaminergiques (Groves et al., 1975; Cragg & Greenfield, 1997; Falkenburger et al., 2001). La libération somatodendritique de dopamine peut être modulée par plusieurs neurotransmetteurs, dont le glutamate (Mintz et al., 1986; Araneda & Bustos, 1989; Falkenburger et al., 2001) et le GABA (Cobb & Abercrombie, 2002; Chen & Rice, 2002). La dopamine libérée dans la SN peut à son tour affecter la libération de GABA dans la SN (Miyazaki & Lacey, 1998; Matuszewich & Yamamoto, 1999). Ainsi, la dopamine somatodendritique apparaît bien intégrée au fonctionnement de la SN et de l'ATV, de sorte que son implication dans les fonctions du système dopaminergique n'est pas surprenante.

La mise à jour des différentes propriétés de la libération somatodendritique étoffe sans aucun doute notre connaissance du fonctionnement du système dopaminergique, mais elle pointe surtout vers l'importance de considérer cet aspect lors de l'analyse de problèmes touchant le système dopaminergique, comme l'action des agents thérapeutiques ou des drogues d'abus. Il ne suffit plus de considérer uniquement les effets de ces agents sur la libération terminale de dopamine, puisque leur impact sur la libération somatodendritique peut aussi avoir des conséquences physiologiques importantes, pouvant même aller à l'encontre des effets sur la libération terminale (étant donné l'auto-inhibition). Il devient donc primordial de déterminer quels effets sont dominants afin de véritablement comprendre l'action des diverses drogues. Si l'on prend la sensibilisation aux effets

comportementaux de l'amphétamine comme exemple, nous savons aujourd'hui que l'induction dépend de la libération somatodendritique de dopamine, alors que l'expression de la sensibilisation passe par la libération terminale (Kalivas & Stewart, 1991).

À ce propos, une étude très intéressante chez le singe attribue la diminution des performances motrices des singes âgés à une baisse de l'activité somatodendritique plutôt que terminale des neurones dopaminergiques (Gerhardt et al., 2002). Ces auteurs rapportent en microdialyse une baisse des métabolites de la dopamine, DOPAC et HVA, dans la SN des singes âgés (23-28 ans), par comparaison à des singes plus jeunes (8-9 ans et 14-17 ans), alors qu'aucun changement n'est détecté dans le striatum. Ils notent aussi une diminution de l'action de l'amphétamine sur la libération somatodendritique de dopamine avec l'âge. Cette étude établit ainsi une corrélation entre l'activité somatodendritique de dopamine et la baisse des performances motrices chez les singes âgées, ce qui suggère donc une implication potentielle de la libération somatodendritique de dopamine dans le contrôle de la fonction motrice.

3. Mécanisme de la libération somatodendritique

L'existence de la libération somatodendritique de la dopamine est aujourd'hui bien établie. Ses propriétés physiologiques sont mieux comprises et sa pertinence fonctionnelle reconnue. Cependant, le mécanisme principal par lequel la dopamine est libérée des dendrites demeure incertain. Les faibles niveaux de dopamine présents dans le mésencéphale contribuent certainement à rendre plus ardue l'étude des mécanismes de la libération somatodendritique. D'une part, la faible quantité de dopamine devrait logiquement s'accompagner d'une certaine rareté des structures morphologiques spécialisées pour la libération (vésicules, zones actives, etc.)—ce qui complique l'approche anatomique. D'autre part, la faible quantité de dopamine dans le mésencéphale rend difficile la mesure des niveaux extracellulaires avec les techniques actuelles—ce qui complique l'approche physiologique. À cet égard, les chercheurs sont souvent obligés de stimuler la libération, ce qui risque en soi d'influencer le mécanisme à l'étude. À ce jour, deux principaux mécanismes ont été proposés, soit la libération vésiculaire et le transport inverse.

3.1 Mécanisme vésiculaire de libération

Comme dans le cas de la libération terminale, l'étude des structures morphologiques présentes au site de libération offre des arguments particulièrement convaincants en ce qui

a trait au mécanisme impliqué. En effet, un mécanisme vésiculaire nécessite la présence de ces organites, ou d'autres éléments de type vésiculaire susceptibles de participer à la libération de la dopamine par exocytose. En appui avec l'hypothèse vésiculaire, de petites vésicules (20-50 nm de diamètre), telles qu'on en retrouve dans les terminaisons axonales, ont été observées à plusieurs reprises dans les dendrites des neurones de la SN et de l'ATV (Hajdu et al., 1973; Wilson et al., 1977; Groves & Linder, 1983; Bayer & Pickel, 1990; Nirenberg et al., 1996a). Cependant, plusieurs autres groupes n'ont pas réussi à reproduire ces observations (Mercer et al., 1978; Cuello & Iversen, 1978; Reubi & Sandri, 1979), ou constatent la rareté des structures de type vésiculaire dans les dendrites (Wassef et al., 1981; Hattori et al., 1979). Il en va de même quant à la présence (Hajdu et al., 1973; Wilson et al., 1977; Groves & Linder, 1983; Bayer & Pickel, 1990) ou non (Cuello & Iversen, 1978; Reubi & Sandri, 1979; Wassef et al., 1981) de synapses dendro-dendritiques dans la SN. Ces observations contradictoires jettent un doute sur la présence en quantité suffisante de vésicules synaptiques pouvant permettre la libération de dopamine somatodendritique par exocytose.

D'autres auteurs ont proposé que la rareté des vésicules dans les dendrites comparativement aux terminaisons illustre une différence quantitative plutôt que qualitative (Heeringa et Abercrombie; 1995). En effet, la concentration tissulaire de dopamine est entre 10 et 60 fois moindre dans la SN que dans le striatum (SNc: 768 ng/g de tissu; SNr: 147 ng/g; striatum: 9360 ng/g; Heeringa & Abercrombie, 1995). Beart & McDonald (1980) rapportent quatre fois moins de dopamine tissulaire dans l'ATV que dans le NAcc. Les niveaux de dopamine extracellulaires mesurés en microdialyse sont aussi environ 10 fois

moindres dans la SN que dans le striatum (Robertson et al., 1991; Westerink et al., 1994; Bergquist et al., 2002). Dans ce contexte, il n'est pas surprenant d'observer moins de vésicules dans les dendrites que dans les terminaisons. En accord avec cette interprétation, l'observation de synapses dendro-dendritiques et de vésicules synaptiques dans les dendrites est plus fréquente dans la SNc que la SNr (Groves & Linder, 1983), ce qui correspond au patron (SNc > SNr) de dopamine libérée ainsi qu'au nombre de neurones dopaminergiques présents dans ces deux régions (Cragg et al, 1997).

Plusieurs résultats suggèrent par ailleurs un rôle potentiel du réticulum endoplasmique (RE) dans la libération de dopamine. En effet, de petits compartiments vésiculaires de 50-200 nm de diamètre appelés tubulovésicules sont présents dans les dendrites des neurones dopaminergiques. D'abord, de nombreuses études ont montré la présence de 5-hydroxydopamine¹⁰ dans les tubulovésicules et dans le RE (Ibata et al, 1974; Mercer et al, 1978; Cuello & Iversen, 1978; Hattori et al., 1979; Groves & Linder, 1983). La TH a aussi été identifiée à l'intérieur des tubulovésicules et du RE (Hattori et al., 1979). Pareillement, les transporteurs vésiculaires (VMAT2, de l'anglais « vesicular monoamine transporter 2 ») et membranaires (DAT) de la dopamine sont présents sur la membrane des tubulovésicules et du RE (Nirenberg et al., 1996a et b). Ces résultats suggèrent donc que les tubulovésicules et le RE puissent synthétiser, recapter et stocker la dopamine dans les dendrites. Le stockage d'amines dans le RE des terminaisons axonales est un phénomène

¹⁰ Ce faux neurotransmetteur est recapturé par les neurones monoaminergiques et forme un précipité dense après la fixation avec l'aldéhyde et le tetroxide d'osmium (Tranzer & Theonen, 1967), ce qui permet d'en étudier la localisation intracellulaire à l'aide de la microscopie électronique.

déjà démontré (Tranzer, 1972). Par contre, la possibilité de libérer cette dopamine par exocytose demeure incertaine.

Dans les dendrites, les tubulovésicules (Hattori et al., 1979; Wassef et al., 1981; Nirenberg et al., 1996a) pourraient constituer un stock de réserve pour la dopamine (Mercer et al., 1978). De nombreuses études ont effectivement montré que la dopamine se retrouvait dans des compartiments fonctionnels distincts à l'intérieur des neurones dopaminergiques (Javoy & Glowinski, 1971; Groppetti et al., 1977; McMillen et al., 1980; Schoemaker & Nickolson, 1983). Herdon et al. (1985) et Leviel et al. (1989) ont ainsi proposé la co-existence de deux stocks vésiculaires: un premier stock libérable où la dopamine nouvellement synthétisée serait préférentiellement dirigée et un second stock de réserve servant plus spécifiquement au stockage. Une partie de la dopamine stockée dans ce second compartiment serait inaccessible à la libération, alors qu'une autre portion du stock de réserve y participerait directement. Certains stimuli recruterait plus efficacement la participation du stock de réserve, comme une forte stimulation électrique ou une concentration élevée de potassium (Leviel et al., 1991). Les tubulovésicules pourraient participer à l'exocytose puisque, du moins dans certaines cellules non-neurales, elles possèdent à leur membrane des protéines du complexe SNARE (Prekeris et al., 1999). De plus, il a été récemment montré dans les cellules gastriques que les tubulovésicules pouvaient fusionner avec la membrane plasmique (Karvar et al., 2002) et que cette fusion pouvait être induite par le calcium (Duman et al., 2002).

Par ailleurs, le RE est largement reconnu comme un lieu de stockage non-mitochondrial du calcium intracellulaire (Neering & McBurney, 1984). Bien que le calcium associé aux stocks intracellulaires ne soit pas reconnu comme étant efficace pour induire l'exocytose dans la plupart des cellules, dont les cellules chromaffines (Kim & Westhead, 1989), la présence de saccules du RE accolés à la membrane plasmique des dendrites (Hattori et al., 1979; Reubi & Sandri, 1979; Bayer & Pickel; 1990) suggère la possibilité de leur participation à la libération somatodendritique de dopamine. Une contribution du calcium intracellulaire pourrait par exemple expliquer la sensibilité moindre au calcium extracellulaire observée pour la libération somatodendritique lors des travaux récents de Chen et Rice (2001).

Il n'en demeure pas moins que la libération somatodendritique est sensible à la TTX, au calcium extracellulaire ainsi qu'à la réserpine, ce qui suggère un mécanisme essentiellement semblable à celui de la libération terminale. Jaffe et al. (1998) ont récemment réussi à enregistrer la libération somatodendritique de quanta monoaminergiques, grâce à l'apposition d'une électrode d'ampérométrie sur le corps cellulaire de neurones de la SN en tranche. La fréquence de ces événements quantiques était plus élevée à 32-35 °C qu'à 23-23 °C et augmentait en présence de potassium concentré. Cette augmentation était bloquée par le cadmium, un bloqueur de canaux calciques. Ces résultats, malgré le fait qu'ils n'aient pas encore été reproduits, favorisent l'hypothèse d'une libération somatodendritique de dopamine par exocytose.

Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, les caractéristiques physiologiques du mécanisme de libération somatodendritique de la dopamine diffèrent légèrement, dans les détails, des caractéristiques de sa libération terminale. Par exemple, le ratio dopamine cytosolique/dopamine vésiculaire est plus élevé dans les dendrites (Heeringa & Abercrombie, 1995); la présence de conductances calciques dans les dendrites distaux diminue la dépendance de la libération somatodendritique vis-à-vis du taux de décharge des neurones (Llinas et al., 1984); la sensibilité au calcium extracellulaire est moindre que pour la libération terminale (Chen & Rice, 2001). Ces caractéristiques ne sont pas incompatibles avec un second mécanisme de libération, soit le transport inverse.

3.2 Transport inverse

En plus de l'exocytose vésiculaire classique (Katz, 1969), le renversement du gradient de transport de la dopamine (Stein, 1967) a été proposé, il y a de nombreuses années, comme un second mécanisme susceptible de libérer la dopamine dans l'espace extracellulaire. L'étude des mécanismes d'action de l'amphétamine a certainement contribué à mieux comprendre et à faire connaître ce mode de libération (Leviel, 2001). Nous commencerons donc par examiner le mécanisme d'action de l'amphétamine (consulter Kuczenski & Segal, 1994, pour une revue plus détaillée) pour ensuite passer aux conditions plus générales susceptibles d'induire le transport inverse de la dopamine.

3.2.1 Le cas de l'amphétamine

L'action de l'amphétamine commence par son entrée dans la cellule, par deux voies principales. En premier lieu, étant une molécule lipophile, l'amphétamine peut diffuser à travers les membranes et ainsi passer librement à l'intérieur de la cellule (Wong et al., 1972). En second lieu, l'amphétamine peut être transportée à l'intérieur de la cellule puisqu'elle est aussi reconnue comme substrat par le DAT (Ross & Renyi, 1964).

Une fois à l'intérieur de la cellule, l'amphétamine engendre une série d'actions qui ont pour conséquence d'augmenter la concentration de la dopamine cytosolique. D'abord, l'amphétamine inhibe la principale enzyme de dégradation de la dopamine, la monoamine oxydase (Miller et al., 1980). Elle interfère aussi avec le chargement vésiculaire de la dopamine, d'une part en bloquant directement le transporteur vésiculaire (Philippu & Beyer, 1973), ce qui empêche la dopamine de passer du cytoplasme aux vésicules; d'autre part en provoquant la fuite de la dopamine déjà stockée dans les vésicules. En effet, l'accumulation de l'amphétamine dans la vésicule élève le pH intra-vésiculaire, ce qui détruit le gradient de protons nécessaire au bon fonctionnement du transport vésiculaire (Sulzer & Rayport, 1990). Sans le fonctionnement du transporteur vésiculaire, la concentration plus faible de dopamine cytosolique tendra par conséquent à s'équilibrer avec la forte concentration de dopamine dans les vésicules. Finalement, l'amphétamine peut à forte dose stimuler la synthèse de dopamine (Larsen et al., 2002). Dans une étude récente, Mosharov et al. (2003) ont mesuré directement la dopamine cytosolique grâce à l'ampérométrie en patch et confirment l'augmentation induite par l'amphétamine. Avec

cette technique, l'électrode d'ampérométrie est installée à l'intérieur d'une pipette de patch, ce qui permet donc de la mettre en contact direct avec l'intérieur de la cellule lorsque la cellule est enregistrée en configuration cellule entière.

Finalement, en plus d'agir comme bloqueur compétitif de la recapture, l'amphétamine induit la libération de dopamine. Fisher et Cho (1979) ont proposé que le transport de l'amphétamine par le DAT rendrait disponible son site de liaison pour la dopamine cytosolique, qui pourrait alors s'y lier et être transportée vers l'espace extracellulaire selon son gradient de concentration. Ces auteurs ont en effet constaté que l'accumulation de l'amphétamine à l'intérieur de la cellule par simple diffusion n'était pas suffisante pour induire une libération de dopamine, et donc qu'elle devait y être transportée par le DAT. Fisher & Cho (1979) ont aussi noté que la libération de ^3H -dopamine à partir d'homogénats de striatum était sensible à la température, saturable, sensible à la cocaïne et sensible à la présence extracellulaire de sodium, ce qui correspond tout à fait aux caractéristiques du transport membranaire de la dopamine (Holz & Coyle, 1974; Khoshbouei et al., 2003).

3.2.2 Conditions générales nécessaires au transport inverse

La stœchiométrie du transport de la dopamine implique le co-transport d'ions sodium (Na^+) et chlore (Cl^-) selon la séquence de liaison et le ratio: $2 \text{Na}^+ : 1 \text{Cl}^- : 1 \text{DA}^+$ (Krueger, 1990). Le modèle qui suit a ainsi été proposé pour décrire le fonctionnement du transport membranaire de la dopamine (Holz & Coyle, 1974; Krueger, 1990; consulter

aussi Bannon et al., 1995). En l'absence d'ion ou de substrat, le transporteur est libre de mouvement dans la membrane plasmique. Lorsque le Na^+ se lie au DAT, celui-ci se retrouve immobilisé et son orientation fixée de sorte que la liaison du Cl^- et de la dopamine s'en retrouve facilitée. Une fois le substrat lié au transporteur, il est transporté selon le gradient électrochimique. L'hyperpolarisation de la membrane plasmique facilite la liaison du Na^+ extracellulaire avec le DAT et donc le transport membranaire, tandis que la dépolarisation de la membrane réduira le transport en diminuant l'attraction envers les ions Na^+ . En théorie, n'importe quel facteur inversant les gradients ioniques ou de substrat devrait permettre d'inverser le transport membranaire. L'exemple de l'amphétamine illustre bien la conséquence d'une augmentation de la concentration de dopamine cytosolique.

Le rôle du sodium extracellulaire dans la recapture de la dopamine est connu depuis un certain temps et a donné lieu à ce qui a été appelé l'hypothèse du gradient sodique (Bogdanski & Brodie, 1969). Cette hypothèse tient essentiellement compte du fait qu'une diminution du sodium extracellulaire engendre normalement une augmentation de la dopamine extracellulaire indépendante du calcium et inhibée par les bloqueurs du DAT (Adam-Vizi, 1992). Une démonstration *in vivo* de cet effet a été obtenue depuis, à l'aide de la microdialyse (Hurd & Understedt, 1989). Bien entendu, selon la stœchiométrie du transport membranaire, une diminution du Cl^- peut aussi induire le transport inverse de la dopamine (Sitges et al., 1994; Attwell et al., 1993). Quelques agents pharmacologiques connus déclenchent le transport inverse en augmentant la concentration intracellulaire de Na^+ : la ouabaïne bloque la pompe membranaire à Na^+/K^+ (Archibald & White, 1974), alors que la vératridine provoque une ouverture des canaux sodiques sensibles au voltage

(Ulbricht, 1969). La perturbation du gradient sodique transmembranaire est donc aujourd'hui reconnue comme une manipulation qui induit le transport inverse de dopamine (Adam-Vizi, 1992; Leviel, 2001).

L'action de certains neurotransmetteurs peut aussi induire le transport inverse de la dopamine. Par exemple, dans une étude réalisée sur tranches de striatum, Lonart et Zigmond (1991) ont montré que l'administration de glutamate induisait une libération de dopamine endogène qui était (1) insensible à la réserpine, (2) insensible à la TTX, (3) indépendante du calcium et (4) bloquée par la nomifensine, un bloqueur du DAT, toutes ces caractéristiques correspondant au transport inverse. Ces auteurs ont proposé que le glutamate puisse être co-transporté dans la cellule avec le Na^+ par le système de co-transport des acides aminés, ce qui perturbe en bout de ligne le gradient sodique. Le glutamate stimulerait aussi la synthèse de dopamine (Moghadam et al., 1990; Leviel et al., 1991). Ainsi, le glutamate pourrait induire le transport inverse de la dopamine en augmentant la concentration cytosolique de Na^+ et de dopamine.

En somme, ces études montrent que le transport inverse de dopamine est possible, voire probable, lorsqu'il y a perturbation du gradient sodique transmembranaire et de la concentration cytosolique de dopamine. Bien que ces conditions puissent être réunies dans certaines situations pathophysiologiques comme l'ischémie cérébrale, les lésions internes ou l'abus de drogues (Leviel, 2001), le rôle du transport inverse lors du fonctionnement normal des neurones dopaminergiques reste incertain. Ce type de libération est néanmoins compatible avec le mode de transmission volumique attribué à la libération

somatodendritique, puisque la localisation du DAT est principalement extra-synaptique (Nirenberg et al., 1996b). En outre, le ratio élevé de dopamine dans les dendrites faciliterait l'induction du transport inverse. Sans compter son implication potentielle dans la libération somatodendritique, l'étude de la contribution du transport inverse de la dopamine dans les processus physiologiques demeure une tâche particulièrement importante puisque de nombreuses drogues utilisées dans un contexte clinique (certains antidépresseurs, le Ritalin) ou social (l'amphétamine, la cocaïne) agissent comme bloqueurs du DAT, et donc pourraient influencer le transport inverse de dopamine.

3.3 Résultats récents

Plusieurs études récentes ont donc tenté de déterminer directement l'implication du transport inverse dans la libération somatodendritique de dopamine, notamment celle de Falkenburger et al. (2001). Ces auteurs ont utilisé comme modèle expérimental des tranches du mésencéphale de rat pour réaliser des mesures de libération de dopamine par ampérométrie. Ces tranches laissent intactes les projections glutamatergiques du noyau sous-thalamique innervant la SN (Iribe et al., 1999). Lors de la stimulation de ces afférences avec le carbachol 10 mM (un agoniste cholinergique), une libération de dopamine, bloquée par le GBR12935 10 nM (un antagoniste du DAT), a été mesurée dans la SN. La stimulation électrique à haute fréquence du noyau sous-thalamique a permis d'enregistrer en patch de lents courants post-synaptiques inhibiteurs dans les neurones dopaminergiques de la SN, lesquels pouvaient aussi être bloqués par des antagonistes du



DAT (GBR12935, GBR12909, β -CFT). Finalement, l'application de glutamate 1 mM localement dans la SN a induit une libération de dopamine, perdurant partiellement même en l'absence de calcium. Ces données montrent que la (forte) stimulation glutamatergique des neurones de la SN peut induire une libération somatodendritique de dopamine par transport inverse.

Néanmoins, d'autres études réalisées dans un modèle de tranche du mésencéphale ont conduit à des résultats qui vont à l'encontre d'une implication du transport inverse dans la libération somatodendritique de dopamine. Elvefors et al (1997) ont montré que la stimulation de la tranche avec du potassium concentré induit une libération de dopamine qui dépend de la présence du calcium extracellulaire et est insensible au GBR12909 (10 μ M). Chen et Rice (2001) ont rapporté qu'une stimulation électrique de la SN induisait une libération de dopamine qui *augmentait* en présence de GBR12909 (0,3 μ M et 2 μ M), suggérant que cette libération soit indépendante du DAT. Hoffman et Gerhardt (1998) ont aussi obtenu des résultats semblables. Ils ont mesuré par chronoampérométrie la libération de dopamine évoquée dans la SN suite à une stimulation électrique et montré la persistance de cette libération en présence de nomifensine, un bloqueur du DAT.

La contradiction apparente entre ces derniers résultats et ceux de Falkenburger et al (2001) provient fort probablement du fait que différentes conditions de stimulation recrutent différents mécanismes de libération. Ainsi, l'utilisation du glutamate (Lonart & Zigmond, 1990) et de la vétratridine (Elvefors et al., 1997) pour stimuler les neurones dopaminergiques induirait le transport inverse de la dopamine, alors que le potassium

concentré (Kim & Westhead, 1989) et la stimulation électrique (Leviell et al., 1991) induiraient l'exocytose vésiculaire dépendante du calcium extracellulaire. Malheureusement, l'utilisation des techniques de voltamétrie n'est pas assez sensible pour détecter les niveaux ambiants de dopamine lors de l'activité spontanée des neurones (Cragg et al., 1997), de sorte qu'une forte stimulation est nécessaire. Or, comme nous venons de le voir, le choix de la méthode de stimulation influence le mécanisme à l'étude.

4. Objectifs de l'étude

Jusqu'à tout récemment, le problème du mécanisme de la libération somatodendritique se posait comme suit. D'une part, l'implication d'un mécanisme vésiculaire classique est incertaine puisqu'il plane un certain doute quant à la présence en nombre suffisant de vésicules susceptibles de participer à l'exocytose de la dopamine et que le rôle potentiel des tubulovésicules demeure obscur. La libération somatodendritique est néanmoins sensible à la réserpine, au calcium extracellulaire et à la TTX. D'autre part, de nombreuses manipulations pharmacologiques révèlent la possibilité d'induire le transport inverse de dopamine et les caractéristiques physiologiques particulières de sa libération par les dendrites ne sont pas incompatibles avec le transport inverse. Le rôle du transport inverse dans les processus physiologiques normaux n'est pas bien connu et les résultats quant à son implication dans la libération somatodendritique de dopamine restent contradictoires. À cet égard, les techniques utilisées pour stimuler et mesurer la libération somatodendritique de dopamine risquent de biaiser les résultats.

Une des principales questions qui reste en suspens est celle du mécanisme impliqué dans la libération somatodendritique survenant lors de l'activité spontanée (à basse fréquence) des neurones dopaminergiques? La réponse à cette question devrait permettre de clarifier quel mécanisme prédomine dans la libération somatodendritique de la dopamine, et quel mécanisme est accessoirement recruté lors de conditions particulières de stimulation. Les travaux présentés dans ce mémoire offrent de nouvelles données qui permettront de

répondre à cette question clé. Nous avons tiré avantage d'un système de culture cellulaire et de la sensibilité accrue de la détection par HPLC afin d'examiner le mécanisme responsable de la libération somatodendritique lors de l'activité à basse fréquence des neurones dopaminergiques. L'utilisation du modèle de culture nous a permis d'entrer dans les détails du mécanisme impliqué grâce à l'utilisation de techniques expérimentales variées telles que l'imagerie confocale et l'électrophysiologie.

Nos méthodes et résultats sont présentés dans la prochaine section, sous forme d'un manuscrit devant être soumis prochainement pour publication.

Article

Accord des coauteurs

1. Identification

Gabriel Fortin
Inscrit à la M. Sc. en Sciences neurologiques
Département de physiologie, faculté de médecine

2. Description de l'article

Primary neuron culture model of somatodendritic dopamine release
Fortin, G., Yamaguchi, N. & Trudeau, L.-E.

L'article sera soumis à Journal of Neuroscience.

3. Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Gabriel Fortin inclue cet article dans son mémoire de maîtrise, qui a pour titre Étude du mécanisme de la libération somatodendritique de la dopamine.



Dr Nobuharu Yamaguchi

2004/02/20.

Date



Dr Louis-Eric Trudeau

20 Février 2004

Date

PRIMARY NEURON CULTURE MODEL OF SOMATODENDRITIC DOPAMINE RELEASE

Gabriel Fortin¹, Nobuharu Yamaguchi², and Louis-Éric Trudeau^{1*}

Department of Pharmacology¹ and department of pharmacy², Faculty of medicine,
University of Montreal, Montreal, Québec, H3C 3J7, Canada

*: To whom correspondence should be addressed at:

Department of Pharmacology
Faculty of Medicine
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7
Tel. 1-514-343-5692
Fax. 1-514-343-2291
[REDACTED]

Key words: Somatodendritic release, dopamine, HPLC, cell culture, FM2-10, reverse transport

Acknowledgments: This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the EJLB foundation. Gabriel Fortin was supported in part by a studentship from the Fonds de la recherche en Santé du Québec and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Louis-Eric Trudeau is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We wish to thank Marie-Josée Bourque for her expert preparation and maintenance of the neuronal cultures, and Sanae Yamaguchi for performing most of the HPLC assays.

Abstract

We established a primary neuron culture model to examine the mechanism of basal unstimulated somatodendritic dopamine release. Extracellular dopamine was measured by HPLC. We relied on the differential calcium sensitivity of somatodendritic and terminal release as a mean to dissociate the two types of release (Chen & Rice, 2001). We first observed that a large component of basal extracellular dopamine levels persisted when extracellular calcium concentrations were lowered to 0.5 mM. Bathing cells in 0mM calcium + 1mM EGTA abolished both basal and K⁺-evoked release. Using confocal imaging of terminals loaded with FM2-10 and recordings of autaptic postsynaptic currents, we confirmed that neurotransmitter release from axon terminals was abolished in 0.5 mM calcium, thus showing that dopamine release in 0.5 mM calcium had a somatodendritic origin. Dopamine release measured under these conditions was dependent on spontaneous firing because it was blocked by 0.5 μM tetrodotoxin, a sodium channel blocker. The addition of 1 μM GBR12909, a dopamine transporter antagonist, *increased* basal dopamine levels in 0.5 mM calcium. Our results therefore suggest that somatodendritic dopamine release occurring under basal spontaneous firing involves an exocytotic-like mechanism, since reverse transport is not involved. Our work is the first to investigate somatodendritic dopamine release in a cell culture model. Using this model, it should now be possible to elucidate the molecular mechanism of somatodendritic dopamine release.

Introduction

Somatodendritic dopamine release has been established as a biological fact in the late 1970s (Björklund & Lindvall, 1975; Geffen et al., 1976; Cuello & Iversen, 1978; Cheramy et al., 1981). However, the mechanism by which dopamine is released from soma and dendrites remains elusive. Although electron microscopy has revealed the presence of small synaptic-like vesicles in the dendritic compartment of substantia nigra (SN) neurons (Hajdu et al., 1973; Wilson et al., 1977; Groves & Linder, 1983), it is not clear whether their occurrence is sufficient to mediate somatodendritic dopamine release (Hattori et al., 1979; Wassef et al., 1981). The endoplasmic reticulum and its associated tubulovesicles have therefore been proposed as a possible storage site for somatodendritic dopamine. These structures indeed appear to contain dopamine (Groves & Linder, 1983; Hattori et al., 1979) and they also express proteins of the SNARE complex, otherwise known to be essential for exocytosis (Prekeris et al., 1999; Weber et al., 1998). But whether dopamine stored in tubulovesicles or endoplasmic reticulum is available for exocytosis remains unclear. Compatible with an exocytotic-like mechanism, numerous authors have nonetheless confirmed that somatodendritic dopamine release is activity-dependent and sensitive to tetrodotoxin (Robertson et al., 1991; Kalivas & Duffy, 1991; Santiago et al., 1992; Westerink et al., 1994; Heeringa & Abercrombie, 1995). It is also calcium-dependent (Beart & McDonald, 1980; Elvefors et al., 1997; Chen & Rice, 2001) and can be inhibited by blocking the vesicular monoamine transporter with reserpine (Elvefors & Nissbrandt, 1991; Heeringa & Abercrombie, 1995).

In parallel, a growing body of evidence suggests that various pharmacological stimuli are capable of inducing dopamine release via reverse activity of the membrane transporter (DA-RT). These stimuli share common mechanisms of action to induce the DA-RT. For example, they can cause large increases in intracellular Na^+ or dopamine concentrations (Adam-Vizi, 1992). Although such changes in intracellular conditions could lead to dendritic release of dopamine under pathophysiological conditions like ischemia or lesions (Leviel, 2001), limited support has been provided that dopamine release through DA-RT can occur under physiological conditions. However, Falkenburger et al. (2001) have recently shown that the stimulation of glutamatergic afferent fibres from the subthalamic nucleus either with carbachol or with high frequency electrical stimulation induced dopamine release in a midbrain slice preparation through a mechanism requiring the dopamine transporter (DAT). On the contrary, previous observers have reported that direct electrical stimulation of the SN in the slice or perfusion with high potassium induced dopamine release that *increased* with DAT blockade (Elvefors et al., 1997; Chen & Rice, 2001), implicating a mechanism that is completely independent from DA-RT.

This apparent discrepancy is probably due to the possibility that different stimulation conditions induce somatodendritic dopamine release through different mechanisms (Elvefors et al, 1997; Lonart & Zigmond, 1991). The mechanism involved in somatodendritic dopamine release under conditions where dopaminergic neurons fire at their usual low frequency is currently not known, and is difficult or impossible to measure *in vivo* or in brain slices with established techniques like cyclic voltametry (Cragg et al., 1997). To investigate this mechanism, we took advantage of midbrain neuron cultures and

detection of extracellular dopamine with HPLC. We show that calcium-dependent somatodendritic dopamine release can occur with spontaneous low frequency firing. Moreover, we provide support for the involvement of an exocytotic-like mechanism.

Methods

Cell culture

Experiments measuring extracellular dopamine levels were performed using standard dopaminergic neuron cultures prepared according to recently described protocols (Jomphe et al., 2003; Bergevin et al., 2002; Congar et al., 2002; Bourque & Trudeau, 2000), originally derived from Cardozo (1993) and Sulzer et al. (1998). Overall, the procedure involves plating neurons onto a pre-established monolayer of purified astrocytes covering a thin glass coverslip coated with collagen/poly-L-lysine. The coating and the layer of astrocytes partially mimic the extracellular matrix by promoting cell adhesion, growth, and survival. Cultures are used between 12 and 24 days after neuronal plating and contain on average 25% dopaminergic neurons, 35% GABAergic neurons and the rest of an undetermined phenotype, assumed to be glutamatergic neurons. All experiments were performed at room temperature.

For the astrocyte culture, neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were cryoanaesthetized and their brains were rapidly removed and transferred into ice-cold dissociation solution. The frontal part of the cortex was surgically severed from the brain and finely cut into small blocks (less than 1 mm³). The blocks were then digested with

papaïn (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, USA) for 60min at 37°C before being gently triturated using glass pipettes of decreasing diameters, until a single-cell suspension was obtained. Cells were deposited and grown in culture flasks filled with Basal Medium Eagle (BME+) (Invitrogen, Burlington, Canada) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Invotrogen), 10% fetal calf serum (Invitrogen), and Mito+ serum extender (VWR Canlab, Montréal, Canada). After the first 48 hours, culture flasks were vigorously washed with cold medium to remove all neurons, leaving only tightly adherent astrocytes. After reaching confluence (7 days), purified astrocytes were gently trypsinized, washed, collected, counted and plated onto previously coated glass coverslips 15 mm in diameter at a concentration of 90 000 living cells per milliliter. Astrocytes covered most of the coverslip surface after 24 hours hence further cell division was inhibited with 5-fluoro-2-deoxyuridine (FU DR).

For the neuronal culture, brains from neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were removed from cryoanaesthetized animals. A 1-mm-thick slice was cut at the level of the midbrain flexure from which a block of tissue, approximately 2mm³ in size, was surgically isolated. This block was found previously to contain most neuronal populations immunoreactive for tyrosine hydroxylase. The blocks were digested in papaïn for 30 min at 37 °C before being gently triturated. The dissociated cells were collected by centrifugation, counted, and plated at a concentration of 350 000 living cells per milliliter. This concentration gave consistent levels of extracellular dopamine and was optimal for neuronal viability. In order to provide an extracellular milieu as rich as possible in natural growth factors, we kept a flask plated with astrocytes and filled with BME+ for two weeks

and then collected the conditioned BME+. Neuronal cultures were thus maintained in a solution composed of (1:2) conditioned BME+ and supplemented Neurobasal A with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1, 10% fetal calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, USA), and B27 serum extender (Invitrogen). FUDR was added to the medium 24 hour after neurons were plated to prevent cell division of newly plated cells, and Kynurenate (0.5 mM), a glutamate receptor antagonist, was added 7 days after plating in order to prevent excitotoxicity. Cell cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Some electrophysiological recordings were performed on neurons from “ μ -droplet” cultures. In this model, cultured neurons grow on μ -droplets of substrate that limit synaptic connectivity to the cells within the droplets. Under such conditions, single neurons establish synaptic connections onto themselves, called autapses, thus allowing measurements of evoked post-synaptic currents (Michel & Trudeau, 2000; Sulzer et al, 1998; Bekkers & Stevens, 1991). The collagen/poly-L-lysine coating was modified for this type of cell culture. Coverslips were first coated with poly-L-ornithine and then agarose, which prevents cell adhesion. Application of the collagen on top of the agarose, using a micro-sprayer, established droplets or islands of substrate that are suitable for cell growth. Astrocytes and neurons were then plated in much the same way as for standard cultures, although final concentrations for astrocytes and neurons were respectively 60 000 and 100 000 living cells per milliliters. These proportions maximized the number of μ -droplets containing single neurons.

Confocal imaging experiments were performed with standard neuronal cultures plated onto coverslips 25mm in diameter to fit the experimental chamber used in these experiments (see below). The rest of the procedure, including the coverslip coating with collagen/poly-L-lysine, remained the same.

Sampling procedure and dopamine assay

Our sampling procedure was adapted from Rougé-Pont et al. (1999). In order to examine extracellular dopamine levels, standard neuronal cultures were deposited in a well containing 400 μL of Krebs ringer buffer (KRB), from which 100 μL samples were drawn every 3 min. The KRB was composed of (in mM): NaCl 140; KCl 5; MgCl_2 2; CaCl_2 2; Sucrose 6; Glucose 10; HEPES 10; pH adjusted to 7.35 with NaOH 5N. Numbered aliquots were prepared prior to the experiment containing 4 μL of preservative solution (pH 6.5) consisting of ethylene glycol-bis-amino-ethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (95 mg/ml) and glutathione (60 mg/ml) in order to prevent oxidation of dopamine. The aliquots also contained 20 μL of distilled water to yield sufficient volume for the automatic injection into the HPLC system (automatic injection of 100 μL). The data shown in this paper were corrected for this dilution. The collected 100 μL -samples of extracellular medium (25% of total volume) withdrawn from the well were dropped into numbered aliquots and immediately replaced with an equivalent volume of fresh KRB. The aliquots were put on dry ice for the duration of the experiment (usually 50min) and then stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until analysis with the HPLC system. The first four aliquots were usually not analyzed since preliminary experiments showed that extracellular levels of dopamine required 15 min to stabilize. Samples were thawed and then placed onto the stage of the HPLC system (Gilson,

Villiers-Le-Bel, France), to be injected automatically every 10 min. HPLC coupled to a coulometric detector (Coulochem II; ESA, Bedford, USA) was used to detect dopamine (detection limit: 5 pg/100 μ l sample).

Drugs were dissolved into the 100 μ L replacement volume. For the first application, drugs were dissolved at a concentration four-fold higher than the desired final concentration and subsequent replacement volumes contained the drug at a concentration equal to the final concentration. This ensured that the administered dose remained constant in the well for the entire treatment duration. For experiments with 0.5 mM Ca^{2+} , the concentration of MgCl_2 was raised to 3.5 mM to maintain a stable concentration of divalent cations. For experiments evaluating release evoked with 40 mM potassium, NaCl was lowered by 40 mM to prevent changes in osmolarity. Finally, the composition of the saline for experiments in 0 mM calcium was as follow (in mM): NaCl 140; KCl 5; MgCl_2 4; EGTA 1; Sucrose 4; Glucose 10; HEPES 10; pH adjusted to 7.35 with NaOH 5N.

Electrophysiology

Signals were recorded with a WARNER PC-505 patch clamp amplifier (Warner Instrument Corp., Hamden, USA), filtered at 2 kHz, digitized at 5 kHz and analyzed with Clampfit 8 software (Axon Instruments, Foster City, USA). Patch pipettes were prepared with borosilicate glass and had a resistance of $5.5 \pm 0.5 \text{ M}\Omega$. The intrapipette solution for autaptic current measurements contained (in mM): KMeSO_4 120; KCl 20; EGTA 0.1; MgATP 2; GTP 0.5; HEPES 10; Phosphocreatine 10; NaCl 5; pH adjusted at 7.35 with KOH 5N; 300 mOsm. KMeSO_4 was replaced with CsMeSO_4 for measurements of

mEPSCs (see below). Postsynaptic currents were recorded from isolated neurons in μ -droplet cultures. To evoke postsynaptic currents, voltage-clamped neurons were stimulated every 15 s with a brief (1 ms) voltage command pulse to +20 mV from a holding potential of -40 to -60 mV. Previously published works shows that the presence of an inhibitory postsynaptic current (IPSC) following the un-clamped sodium spike indicates a GABAergic phenotype. Because dopamine neurons in culture also release glutamate as a co-transmitter, detection of an excitatory postsynaptic currents (EPSC) and inhibition of this response by 10 μ M quinpirole, a D2 agonist, indicates a dopaminergic phenotype (Bourque & Trudeau, 2000; Congar et al., 2002; Dalbo et al., 2004). Neurons showing an EPSC but unresponsive to quinpirole were considered glutamatergic. Postsynaptic currents were recorded in normal KRB or KRB with 0.5 mM calcium. Because inhibitory postsynaptic currents were much smaller in amplitude than excitatory currents, the corresponding proportional relative inhibition in 0.5 mM calcium would appear smaller. We therefore measured inhibitory postsynaptic currents in the presence of 5 μ M SR95531 (a GABA_A antagonist) and subtracted this current from the current left in 0.5 mM calcium. This procedure ensured that we did not overestimate the remaining postsynaptic current left in 0.5 mM calcium.

Spontaneous miniature EPSCs (mEPSCs) were recorded from standard neuronal cultures in solutions containing 0.5 μ M tetrodotoxin (TTX) and 5 μ M SR95531. Events were analyzed with Mini Analysis Software (version 5.6) by Synaptosoft Inc. (Leonia, USA). K⁺ stimulation induced a large inward current associated with noise (see Fig. 3C), which momentarily prevented analysis of the mEPSC frequency. Preliminary experiments

performed in the presence of CNQX 10 μM to block all mEPSCs showed that the noise induced by the strong depolarization mostly disappeared 1 min after K^+ application. We therefore chose to average the mEPSC frequency during the second minute after K^+ application as an index of the effect of K^+ depolarization.

Confocal imaging

Standard neuronal cultures on 25 mm coverslips were mounted in a closed bath imaging chamber with platinum stimulating electrodes from Warner Instruments (Hamden, USA). The chamber was installed onto the stage of the microscope and connected to the perfusion system. Cells were then exposed for 2 min to 200 μM FM2-10 (Molecular Probes, Eugene, USA) diluted in a solution of 40 mM potassium. They were subsequently rinsed for 5 min in normal KRB and then 5 more min in either normal KRB, a solution containing 0.5 mM calcium or a solution containing 0mM calcium, depending on the experiment. A final 10 min rinse eliminated the extracellular signal of FM2-10 that was not internalized. Images were acquired using a point-scanning confocal microscope from Prairie Technologies LLC (Middleton, WI, USA) and were taken every 10 s. Excitation was achieved using the 488 nm line of an argon ion laser and we measured emitted fluorescence between 505-545 nm. Images were analyzed using Metamorph software v4.5 from Universal Imaging Corp (USA). In some experiments, a field electrical stimulation was delivered at 5 Hz (1 ms/pulse) during 60 s using a S88 stimulator from Grass Instruments (Quincy, USA). Preliminary experiments showed that the effect of the electrical stimulation was blocked by TTX 0.5 μM , thus indicating that it induced action potentials rather than directly depolarizing axon terminals. Cells were finally exposed to

high potassium saline to completely release any remaining releasable FM2-10 from the terminals. Data are represented relative to the intensity of the first 6 images (1 min), prior to any treatment.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 100% methanol for 5 min at 4 °C, permeabilized with 0.1% triton X-100 for 10min and bathed for 5min in a solution containing BSA (0.5%) in order to block unspecific binding sites. Cells were then incubated overnight at 4 °C with mouse monoclonal antibodies against TH (1:1000; Pelfrez Biological, USA) or rabbit polyclonal anti-DAT (1:500; Chemicon, Temecula, USA). Primary antibodies were detected using Alexa-488 or Alexa-647 (1:200) fluorescently labelled secondary antibodies (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) before being finally mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Images were acquired using the confocal microscope. Excitation was achieved using the 488 nm line of an argon ion laser as well as the 633 nm line of a helium neon laser.

Drugs and statistical analyses

Most drugs were dissolved from a frozen stock solution into KRB. GBR12909 was prepared fresh each day in KRB and was used at 1 μ M. All drugs came from Sigma (Oakville, Ont., Canada) except when stated otherwise. Statistical analyses consisted of either analysis of variance (ANOVA) or Student's t-test. Data are always shown as mean \pm SEM.

Results

Extracellular dopamine levels vary with extracellular calcium concentrations and necessitate cell firing

We took advantage of HPLC's high sensitivity to measure basal as well as K^+ -evoked dopamine levels in culture. Our culture conditions ensured that between 300 and 800 neurons immunoreactive against TH developed on the individual coverslips (figures 1A,B). This allowed consistent measurements of dopamine over time. Samples were taken every 3 min and the first 4 samples were not analyzed as preliminary experiments showed that 15 min were required for dopamine levels to stabilize.

Using a midbrain slice preparation, Chen and Rice (2001, 2003) recently showed that evoked terminal dopamine release was completely abolished when extracellular calcium concentrations were lowered to 0.5 mM, whereas evoked somatodendritic dopamine release persisted under these conditions. To validate our cell culture model, we evaluated dopamine levels in different calcium concentrations (Fig. 1C, 1D). In all conditions, we obtained 6 samples of basal activity and 6 samples under 40 mM K^+ stimulation. Lowering extracellular calcium concentrations to 0.5 mM reduced basal dopamine levels from 455 ± 30 pg/ml ($n=10$) to 204 ± 20 pg/ml ($n=14$). Some dopamine was still measurable without calcium present in the bath (52 ± 24 pg/ml; $n=9$; Fig. 1D). A one-way ANOVA performed on group means revealed a significant main effect ($F = 61.50$, $p < 0.001$) and post-hoc Tukey test showed that the average dopamine levels were significantly different between control, 0.5 mM and 0 mM calcium ($p < 0.001$ for all

comparisons). Application of 40 mM K^+ to produce sustained depolarisation of neurons drastically increased dopamine levels (Fig. 1C) in both normal and 0.5 mM calcium concentrations, whereas it was ineffective in 0 mM calcium. The peak increase in dopamine levels was not significantly different between normal calcium (3723 ± 338 pg/ml, $n=10$) and 0.5 mM calcium (3034 ± 221 pg/ml, $n=14$) (Unpaired Student's t-test, $t = -1.82$, $DF = 22$, $p = 0.082$, Fig. 1D).

Dopamine neurons in our cultures are spontaneously active and discharge at a frequency between 1-2 Hz (not shown) (St-Gelais et al., 2004). Therefore, we next examined whether the measured dopamine levels necessitated cell firing. Application of the sodium channel blocker TTX ($1\mu\text{M}$) reduced dopamine levels to $16 \pm 2\%$ ($n=8$) and $30 \pm 1\%$ ($n=10$) of basal values in normal and 0.5 mM calcium respectively (Fig. 2). We performed a two-way ANOVA on the TTX data with time ($T=0$ to $T=27$) and calcium concentration (NS and 0.5 mM) as the 2 factors. We obtained a significant effect of TTX over time ($F = 52.03$, $p < 0.001$), and a significant interaction between this effect and the calcium concentration ($F = 2.78$, $p < 0.005$). Post hoc analyses with the Bonferroni test revealed significantly different ($p < 0.05$) dopamine levels between normal and 0.5 mM calcium for the last three times ($T=21$, 24 and 27 min after TTX application). Dopamine levels in normal and 0.5 mM calcium concentrations require cellular activity in order to remain stable.

K⁺ evokes terminal release even in low calcium

To clarify the action of K⁺ depolarisation on terminal release, we first studied its effect on synaptic terminals loaded with FM2-10, an activity-dependent indicator of synaptic vesicle recycling in axon terminals. Coupled with confocal imaging, this technique allowed us to visualize exocytotic activity over time (Betz et al., 1996; Congar et al., 2002; Aravanis et al., 2003; see for review Cousin & Robinson, 1999). The dotted appearance of the fluorescent signal (Fig. 3A) has been attributed to the varicose nature of axonal terminals (Everett et al., 2002), where the dye accumulates within synaptic vesicles. After the cells were loaded with 200 μ M of FM2-10 and rinsed thoroughly, we performed two consecutive 1min-applications of 40 mM K⁺. The first K⁺ application was given under the test calcium concentration (normal, 0.5 mM or 0 mM) while the second application was always given in normal calcium concentration and served to completely release any remaining releasable FM2-10 from the terminals. The intensity of FM2-10 fluorescence was expressed as a percentage of the average of the first 6 images (first 60 s of recording), representing the control period before treatment. As seen in figure 3B, the first K⁺ stimulation still evoked fluorescence loss in 0.5 mM calcium, although to a lesser extent than in normal calcium. The first K⁺ stimulation was ineffective in 0mM calcium. These results indicate that K⁺ stimulation can still induce exocytosis from axon terminals when extracellular calcium concentrations are lowered to 0.5 mM.

To obtain an independent index of the activity of axonal terminals, we measured miniature postsynaptic currents (mEPSCs) in the presence of TTX. We measured mEPSCs under varying calcium concentrations to see if spontaneous exocytosis was enhanced by K⁺

stimulation in low calcium (Fig. 3C). Experiments were performed at a holding potential of -65 mV. As in the imaging experiments, we perfused the cells during at least 5 min with the tested calcium concentration before applying the K^+ stimulation. Basal mEPSC frequency was taken as the mean frequency during the minute immediately before K^+ application, while the K^+ stimulated frequency was measured as the mean frequency during the second minute after K^+ application. This delay was chosen because mEPSCs could not be reliably measured in the presence of K^+ because of the large inward current and associated noise (Fig. 3C) (see methods). Figure 3D shows that the application of 40 mM K^+ significantly increased the frequency of mEPSCs in normal calcium (Student's t-test, $t = -5.635$, $DF = 32$, $p < 0.001$) as well as in 0.5 mM calcium (Student's t-test, $t = -2.277$, $DF = 14$, $p < 0.001$). There was no statistically significant change in 0 mM calcium (Student's t-test, $t = -1.273$, $DF = 16$, $p = 0.221$). The t-tests were performed on group means. Basal mEPSC frequencies in normal (3.7 ± 1 Hz, $n=17$), 0.5 mM (3.5 ± 1 Hz, $n=8$) and 0 mM (3.4 ± 1 Hz, $n=9$) calcium concentrations were comparable. Taken with the results from FM2-10 imaging experiments, these data show that the stimulation of terminal exocytosis by 40 mM K^+ persists in 0.5 mM calcium. The strong augmentation of extracellular dopamine induced by K^+ in the presence of 0.5 mM calcium (Fig. 1C) therefore involved at least in part terminal release, and such conditions are therefore not suitable to study somatodendritic dopamine release in isolation.

Basal spontaneous terminal release is abolished in low calcium

Although K^+ stimulation cannot be used to study somatodendritic dopamine release in our preparation, our results (Fig. 1) show that dopamine release mediated by spontaneous

firing still occurs in 0.5 mM calcium. We therefore attempted to verify whether this was mediated through release from terminal or somatodendritic compartments. First, we loaded terminals with FM2-10 and applied low frequency electrical field stimulation under varying calcium concentrations (normal, 0.5 mM and 0 mM). The loading and imaging protocols were the same as described previously, except that the first K^+ stimulation was replaced by an electrical stimulation at 5 Hz (1 ms/pulse). Such short-lasting electrical stimuli were intended to increase the spontaneous firing rate, without stimulating the terminals directly (see methods and Aravanis et al., 2003; Pyle et al., 2000; Klingauf et al., 1998). Figure 4A shows that electrical stimulation induced a partial fluorescence loss in normal calcium, and that it was completely ineffective in 0.5 mM and 0 mM calcium. Electrical stimulation was thus effective at inducing terminal exocytosis in normal calcium, but this was prevented in low calcium concentrations.

These observations were confirmed by recording autaptic postsynaptic currents in normal and 0.5 mM calcium concentrations as an index of terminal function. Isolated neurons growing in μ -droplet cultures establish synaptic connections onto themselves, called “autapses”, and can thus be utilized for postsynaptic current recordings (Michel & Trudeau, 2000; Sulzer et al, 1998). Cells were voltage-clamped between -40 mV and -60 mV. Unclamped action potentials were induced by brief (1 ms) depolarizing voltage steps to +20 mV every 15 s (Fig. 4B). Synaptic currents were measured for 2-3 min in normal calcium concentration before switching to 0.5 mM calcium for at least 6min and then back to normal calcium. We compared the amplitude of postsynaptic currents during the last minute of each condition (normal, 0.5 mM calcium, and washout). As seen in figures 4B

and C, the action potential-evoked postsynaptic currents were practically abolished in 0.5 mM calcium ($3.7 \pm 1\%$ of control, $n=9$). For statistical analyses, we averaged the amplitudes of postsynaptic currents before and after 0.5 mM calcium to account for rundown, and compared the mean to the average amplitude in 0.5 mM calcium with a Student's t-test ($t = 23.66$, $DF = 16$, $p < 0.001$).

Overall, the results from figure 4 show that action potential-evoked terminal activity was practically absent in 0.5 mM calcium. Therefore, dopamine levels measured under these conditions have a somatodendritic origin.

The DAT is present and functional in cultures

Because somatodendritic dopamine release could be mediated in part or completely by reverse transport, we next examined whether the DAT was indeed present and functional under our experimental conditions. Figure 5A shows images from immunocytochemistry against DAT and TH. Numerous neurons were immuno-positive for DAT protein, and they were all also positive for TH. GBR12909 is a selective DAT blocker that does not induce reverse transport (Andersen, 1989; Nomikos et al., 1990). Application of 1 μ M GBR12909 (Fig 5B) resulted in basal dopamine concentrations of 855 ± 66 pg/ml ($n=7$), compared to 455 ± 30 pg/ml ($n=52$) without GBR12909 (Student's t-test, $t = 4.680$, $DF = 57$, $p < 0.001$). Dopamine reuptake thus contributes to establishing stable extracellular dopamine levels in our culture model. Finally, application of 10 μ M amphetamine, known to induce dopamine release by reverse transport (Khoshbouei et al., 2003; Sulzer & Rayport, 1990; Fisher & Cho, 1979), significantly increased dopamine levels to $233 \pm 38\%$ ($n=11$) of basal values

after 18 min (one-way ANOVA, $F = 8.12$, $p < 0.001$; Fig. 5C). These data hence show that the DAT is present and functional in our cultures.

Reverse transport is not involved in somatodendritic dopamine release

Blocking the DAT with GBR12909 should either *decrease* basal dopamine levels in 0.5 mM calcium if somatodendritic release relies on reverse transport, or it should *increase* dopamine levels if somatodendritic release relies on another mechanism, such as exocytosis. We applied 1 μM of GBR12909 in 0.5 mM calcium saline and measured dopamine levels (Fig. 6A). Basal dopamine levels in 0.5 mM calcium averaged 509 ± 52 pg/ml ($n=8$) in the presence of 1 μM GBR12909 compared to 204 ± 20 pg/ml ($n=14$) without GBR12909 (Fig. 6B). GBR12909 thus increased basal dopamine levels in 0.5 mM calcium (Student's t-test, $t = -4.28$, $DF = 20$, $p < 0.001$), as would be expected if somatodendritic dopamine release did not involve reverse transport. K^+ -evoked dopamine accumulation with or without GBR12909 did not differ significantly (Student's t-test, $t = -0.09$, $DF = 20$, $p = 0.93$) (Fig. 6B).

Discussion

The objective of the present study was to establish a cell culture model of somatodendritic dopamine release. Contrary to brain slices, comprising either the somatodendritic compartment of dopaminergic neurons or their terminal compartment, neuron cultures contain full length undamaged neurons. Extracellular dopamine levels therefore reflect a combination of somatodendritic as well as terminal release. In order to dissociate the two, we have relied on the differential calcium sensitivity of terminal and somatodendritic release. Indeed, we confirmed that lowering extracellular calcium concentrations to 0.5 mM abolished electrically-evoked neurotransmitter release from terminals, as had been previously shown in brain slices (Chen & Rice, 2001, 2003). Basal extracellular dopamine measured in 0.5 mM calcium therefore reflected somatodendritic release alone. Our main finding is that basal somatodendritic dopamine release can be reconstituted in a cell culture model and that it most likely involves an exocytotic-like mechanism, because it was not blocked by a selective DAT antagonist.

Dopaminergic neurons in culture fire spontaneously at an average frequency of approximately 2 Hz (Cardozo, 1993; St-Gelais et al., 2004). Under such conditions, axon terminals would also be activated and could account for part of the dopamine release in normal extracellular calcium. However, postsynaptic autaptic currents evoked by depolarizing pulses every 15 s were abolished in 0.5 mM calcium. Similarly, loss of FM2-10 fluorescence induced by electrical field stimulation at 5 Hz was also abolished in 0.5 mM calcium. This clearly shows that terminal release under conditions of low frequency

firing is abolished in 0.5 mM calcium, presumably because calcium influx near release sites is not sufficient to trigger exocytosis of synaptic vesicles. Under the same conditions, the somatodendritic release mechanism is apparently still functional.

Although saline containing 0.5 mM calcium can isolate somatodendritic dopamine release from terminal release, this strategy is not compatible with the use of non-physiological modes of neuronal stimulation, such as K^+ depolarisation. Indeed, loss of FM2-10 fluorescence induced by K^+ stimulation persisted in 0.5 mM calcium. This suggests that the prolonged membrane depolarisation induced by K^+ stimulation permits calcium accumulation within terminals, sufficiently so as to stimulate exocytosis. The fact that K^+ stimulation still increased mEPSC frequency in 0.5 mM calcium confirms this interpretation. Asynchronous release responsible for miniature postsynaptic currents has been shown to be increased by intracellular calcium accumulation (Wojtowicz & Atwood, 1984; Bouron, 2001; Bergevin et al., 2002; Congar et al., 2002).

Mechanism of somatodendritic dopamine release

A number of stimuli have been used to study somatodendritic dopamine release (Elvefors et al., 1997; Cragg et al., 2000; Falkenburger et al., 2001). Stimulation of dopamine release from brain slices of substantia nigra (SN) with high potassium has been shown to be insensitive to DAT antagonists (Elvefors et al., 1997). Similarly, somatodendritic dopamine release evoked by direct electrical stimulation of the SN slice is insensitive to DAT antagonists (Bull et al., 1990; Cragg et al., 1997, 2000, 2001; Chen & Rice, 2001). However, dopamine release from SN evoked with either the sodium channel

opener veratridine, amphetamine, or high concentrations of glutamate can be blocked by DAT antagonists (Elvefors et al., 1997; Falkenburger et al., 2001; see review by Leviel, 2001), thus suggesting that somatodendritic dopamine release could involve reverse transport when stimulated appropriately. These stimuli however seem closer to pathophysiological conditions, as even glutamate stimulation seems to require somewhat high concentrations (1 mM) to induce measurable somatodendritic release (Bergquist et al., 2002; Falkenburger et al., 2001; Rosales et al., 1994; Lonart & Zigmond, 1991; Moghaddam et al., 1990; Araneda & Bustos, 1989).

Our model allowed us to take advantage of the high sensitivity of HPLC to measure somatodendritic dopamine release occurring under low frequency spontaneous firing, thus circumventing the potential bias induced by the chosen stimulatory condition. We found that dopamine release measured under these conditions was insensitive to DAT antagonism. Dopamine accumulation was actually increased. Early experiments on somatodendritic dopamine release using *in vivo* microdialysis sometimes used DAT antagonists to facilitate measurements; they also saw increased levels of dopamine following administration of such agents (Kalivas & Duffy, 1991; Robertson et al., 1991; Westerink et al., 1994). We thus conclude that somatodendritic dopamine release in cultured dopaminergic neurons probably occurs through an exocytotic mechanism. An exocytotic-like mechanism of release is compatible with the physiological characteristics that were established for dopamine release in the SN or the ventral tegmental area (VTA), namely TTX-sensitivity (Robertson et al., 1991; Kalivas & Duffy, 1991; Santiago et al., 1992; Westerink et al., 1994; Heeringa & Aebr Crombie, 1995), calcium-dependence (Beart & McDonald, 1980;

Elvefors et al, 1997; Chen & Rice, 2001), and sensitivity to reserpine (Elvefors & Nissbrandt, 1991; Heeringa & Abercrombie, 1995).

Concerning TTX sensitivity, our data (Fig. 2) would appear to suggest that blocking spontaneous firing was somewhat less effective at decreasing dopamine release in 0.5 mM calcium than in normal calcium. This apparent difference might however be due to the fact that basal dopamine levels in 0.5 mM calcium are lower from the start than dopamine levels in normal calcium. An examination of the raw data confirmed that TTX's effect did not differ in 0.5 mM or normal calcium. The average dopamine levels for the last three samples were 52.4 ± 12 pg/ml (n=8) in normal calcium and 71.8 ± 2 pg/ml (n=10) in 0.5 mM calcium. There was no statistical difference between these values (Student's t-test, $t = -1.782$, $DF = 16$, $p = 0.094$), indicating that dopamine release was similarly blocked in both calcium concentrations and that spontaneous firing was critical under both conditions.

Although somatodendritic release is activity-dependant, some of its physiological characteristics could favour reverse transport. For instance, the ratio between cytosolic dopamine and vesicular dopamine has been shown to be higher in dendrites than in axonal terminals (Heeringa & Abercrombie, 1995). High cytosolic dopamine concentrations represent one of the two factors that are necessary to induce reverse transport, the other being high levels of cytosolic Na^+ (Mosharov et al., 2003; Koshbouei et al., 2003; see reviews by Leviel, 2001, Attwell et al., 1993, and Adam-Vizi, 1992). It has been hypothesized that high concentrations of glutamate could raise intracellular Na^+ concentrations by being co-transported inside the cells through the amino acid transport

system (Lonart & Zigmond, 1991). Other factors have also been found that facilitate dopamine reverse transport, such as the presence of zinc ions (Scholze et al., 2002). Let us note that our experiments were performed at room temperature, which is known to reduce DAT activity (Holz and Coyle, 1974; Cragg et al., 1997). Although we have shown that the DAT was fully functional under our experimental conditions, perhaps varying these conditions (e.g. raising ambient temperature) could uncover a slight contribution for dopamine reverse transport.

We have clearly shown that basal somatodendritic dopamine release did not necessitate reverse transport through the DAT and is thus likely to involve an exocytotic-like mechanism of release. An exciting avenue for future research will be to investigate the molecular machinery underlying the exocytotic-like mechanism of release, using for instance clostridial neurotoxins. Bergquist et al. (2002) have already shown that somatodendritic release appears to be insensitive to botulinum neurotoxin B but sensitive to botulinum neurotoxin A, while terminal release was substantially inhibited by both toxins. Tetanus toxin was however ineffective in the same study, which is somewhat surprising because its molecular target, synaptobrevin, is the same as that of botulinum neurotoxin B. Their results nonetheless point to potential differences between the molecular machineries responsible for exocytosis occurring in dendrites and in axon terminals. Our cell culture model will be ideally suited to pursue such investigations because it will facilitate the use of different molecular, imaging, electrophysiological and electrochemical techniques. This model will also minimize the confounding influence of indirect circuitry effects.

Calcium sensitivity of somatodendritic dopamine release

Our results agree with previous findings showing that prolonged absence of extracellular calcium abolishes somatodendritic dopamine release (Rice et al., 1997; Bergquist et al., 1998; Hoffman & Gerhardt, 1999; Chen & Rice, 2001). Nonetheless, brief removal of extracellular calcium or exposure to lower calcium concentrations does not seem to rapidly eliminate somatodendritic release (Bergquist et al., 1998; Hoffman & Gerhardt, 1999; Chen & Rice, 2001), even though it eliminates terminal release. Concordant with the results of Chen and Rice (2001, 2003), we found that lowering extracellular calcium concentrations to 0.5 mM only abolished terminal exocytosis, while somatodendritic dopamine release persisted. At least two hypotheses could account for this lower sensitivity to extracellular calcium concentrations. First, intracellular calcium stores, like the endoplasmic reticulum (ER), could participate in somatodendritic dopamine release. Indeed, it has been demonstrated that mobilization of intracellular calcium stores could induce or modulate exocytosis of large dense core vesicles (Blöchl & Theonen, 1995, 1996; Peng, 1996). Somatodendritic release of oxytocin for instance has been shown to be induced by calcium efflux from the ER (Ludwig et al., 2002). Second, the exocytotic-like process in the somatodendritic compartment could involve molecular machinery that does not require large intracellular calcium elevations to induce release. Synaptotagmin is a synaptic protein that binds calcium and phospholipids; it is widely recognized as the main calcium sensor responsible for inducing exocytosis upon calcium influx in axon terminals (Koh & Bellen, 2003). Interestingly, recently identified isoforms of synaptotagmin show differential sensitivity to calcium as well as varied ability to bind membrane phospholipids, and could be involved in the control of fusion pore kinetics (Li et al., 1995; Bai et al., 2002;

Wang et al., 2001, 2003). Although not examined at this point, different isoforms of synaptotagmin could mediate terminal and somatodendritic dopamine release.

Off course, the two hypotheses mentioned above are not mutually exclusive. What seems clear however is that induction of somatodendritic dopamine release requires less intracellular calcium than terminal release. This property is reminiscent of endocrine secretion, which requires intracellular calcium concentration of around 5 μM , while terminal exocytosis of synaptic vesicles in neurons requires calcium levels above 100 μM (Zucker, 1996). In nonexcitable cells, calcium release from intracellular stores can also induce or modulate secretion (Fernandez et al., 1984; Penner & Neher, 1988; Tse et al., 1993).

Conclusion

Somatodendritic dopamine release is now recognized as an important physiological property of the central dopamine system. Through activation of D2 receptors, dopamine released from dendrites can modulate the activity of dopaminergic neurons (Groves et al., 1975; Cragg & Greenfield, 1997). Somatodendritic release also appears to play a critical role in the induction of psychostimulant sensitization (Kalivas & Stewart, 1991), a process thought to be central to drug addiction (Berke & Hyman, 2000). Our results have established for the first time a cell culture model suitable to study somatodendritic dopamine release. In this model, somatodendritic dopamine release occurring under low frequency firing does not involve reverse transport, and thus probably relies on an

exocytotic-like mechanism. This model will facilitate future research aimed at identifying the differential mechanism of somatodendritic and terminal exocytosis.

References

- Adam-Vizi V (1992) External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J Neurochem* 58:395-405.
- Andersen PH (1989) The dopamine inhibitor GBR 12909: selectivity and molecular mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 166:493-504.
- Araneda R, Bustos G (1989) Modulation of dendritic release of dopamine by N-methyl-D-aspartate receptors in rat substantia nigra. *J Neurochem* 52:962-70.
- Aravanis AM, Pyle JL, Harata NC, Tsien RW (2003) Imaging single synaptic vesicles undergoing repeated fusion events: kissing, running, and kissing again. *Neuropharmacology* 45:797-813.
- Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11:401-7.
- Bai J, Wang P, Chapman ER (2002) C2A activates a cryptic Ca^{2+} -triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1665-70.
- Beart PM, McDonald D (1980) Neurochemical studies of the mesolimbic dopaminergic pathway: somatodendritic mechanisms and GABAergic neurones in the rat ventral tegmentum. *J Neurochem* 34:1622-9.
- Bekkers JM, Stevens CF (1991) Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated

hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7834-8.

Bergevin A, Girardot D, Bourque MJ, Trudeau LE (2002) Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology* 42:1065-78.

Bergquist F, Jonason J, Pileblad E, Nissbrandt H (1998) Effects of local administration of L-, N-, and P/Q-type calcium channel blockers on spontaneous dopamine release in the striatum and the substantia nigra: a microdialysis study in rat. *J Neurochem* 70:1532-40.

Bergquist F, Niazi HS, Nissbrandt H (2002) Evidence for different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. *Brain Res* 950:245-53.

Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-32.

Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-71.

Bjorklund A, Lindvall O (1975) Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res* 83:531-7.

Bloch A, Thoenen H (1995) Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci* 7:1220-8.

Bloch A, Thoenen H (1996) Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary

cultures of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 7:173-90.

Bouron A (2001) Modulation of spontaneous quantal release of neurotransmitters in the hippocampus. *Prog Neurobiol* 63:613-35.

Bourque MJ, Trudeau LE (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* 12:3172-80.

Bull DR, Palij P, Sheehan MJ, Millar J, Stamford JA, Kruk ZL, Humphrey PP (1990) Application of fast cyclic voltammetry to measurement of electrically evoked dopamine overflow from brain slices in vitro. *J Neurosci Methods* 32:37-44.

Cardozo DL (1993) Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56:409-21.

Chen BT, Rice ME (2001) Novel Ca²⁺ dependence and time course of somatodendritic dopamine release: substantia nigra versus striatum. *J Neurosci* 21:7841-7.

Chen BT, Rice ME (2003) Calcium dependence of dopamine release in the VTA reveals both somatodendritic and synaptic characteristics. *Society for Neurosciences Abstracts session 461:poster 16*.

Cheramy A, Leviel V, Glowinski J (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289:537-42.

Congar P, Bergevin A, Trudeau LE (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol* 87:1046-56.

Cousin MA, Robinson PJ (1999) Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J Neurochem* 73:2227-39.

Cragg S, Rice ME, Greenfield SA (1997a) Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurophysiol* 77:863-73.

Cragg SJ, Greenfield SA (1997b) Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci* 17:5738-46.

Cragg SJ, Hille CJ, Greenfield SA (2000) Dopamine release and uptake dynamics within nonhuman primate striatum in vitro. *J Neurosci* 20:8209-17.

Cragg SJ, Nicholson C, Kume-Kick J, Tao L, Rice ME (2001) Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *J Neurophysiol* 85:1761-71.

Cuello AC, Iversen LL (1978) Interactions of dopamine with other neurotransmitters in the rat substantia nigra: A possible functional role of dendritic dopamine. In: *Interactions between putative neurotransmitters in the brain* (Gerattini S, Pujol JF, Samanin R, eds), pp 127-149. New York, USA: Raven Press.

Dal Bo G, St-Gelais F, Danik M, Williams S, Cotton M, Trudeau LE (2004) Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J Neurochem* 88:1398-405.

Elverfors A, Nissbrandt H (1991) Reserpine-insensitive dopamine release in the substantia nigra? *Brain Res* 557:5-12.

Elverfors A, Pileblad E, Lagerkvist S, Bergquist F, Jonason J, Nissbrandt H (1997) 3-Methoxytyramine formation following monoamine oxidase inhibition is a poor index of dendritic dopamine release in the substantia nigra. *J Neurochem* 69:1684-92.

Everett AW, Edwards SJ, Etherington SJ (2002) Structural basis for the spotted appearance of amphibian neuromuscular junctions stained for synaptic vesicles. *J Neurocytol* 31:15-25.

Falkenburger BH, Barstow KL, Mintz IM (2001) Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293:2465-70.

Fernandez JM, Neher E, Gomperts BD (1984) Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature* 312:453-5.

Fischer JF, Cho AK (1979) Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. *J Pharmacol Exp Ther* 208:203-9.

Geffen LB, Jessell TM, Cuello AC, Iversen LL (1976) Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260:258-60.

Groves PM, Linder JC (1983) Dendro-dendritic synapses in substantia nigra: descriptions based on analysis of serial sections. *Exp Brain Res* 49:209-17.

Groves PM, Wilson CJ, Young SJ, Rebec GV (1975) Self-inhibition by dopaminergic neurons. *Science* 190:522-8.

Hajdu F, Hassler R, Bak IJ (1973) Electron microscopic study of the substantia nigra and the strio-nigral projection in the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 146:207-21.

Hattori T, McGeer PL, McGeer EG (1979) Dendro axonic neurotransmission. II. Morphological sites for the synthesis, binding and release of neurotransmitters in dopaminergic dendrites in the substantia nigra and cholinergic dendrites in the neostriatum. *Brain Res* 170:71-83.

Heeringa MJ, Abercrombie ED (1995) Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *J Neurochem* 65:192-200.

Hoffman AF, Gerhardt GA (1999) Differences in pharmacological properties of dopamine release between the substantia nigra and striatum: an in vivo electrochemical study. *J Pharmacol Exp Ther* 289:455-63.

Holz RW, Coyle JT (1974) The effects of various salts, temperature, and the alkaloids veratridine and batrachotoxin on the uptake of [³H] dopamine into synaptosomes from rat striatum. *Molecular Pharmacology* 10:746-758.

Jomphe C, Levesque D, Trudeau LE (2003) Calcium-dependent, D2 receptor-independent induction of c-fos by haloperidol in dopamine neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367:480-9.

Kalivas PW, Duffy P (1991a) A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *J Neurochem* 56:961-7.

Kalivas PW, Stewart J (1991b) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16:223-44.

Khoshbouei H, Wang H, Lechleiter JD, Javitch JA, Galli A (2003) Amphetamine-induced dopamine efflux. A voltage-sensitive and intracellular Na⁺-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278:12070-7.

Klingauf J, Kavalali ET, Tsien RW (1998) Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature* 394:581-5.

Koh TW, Bellen HJ (2003) Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 26:413-22.

Leviel V (2001) The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int* 38:83-106.

Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RG, Brose N, Sudhof TC (1995) Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375:594-9.

Lonart G, Zigmond MJ (1991) High glutamate concentrations evoke Ca⁺⁺-independent dopamine release from striatal slices: a possible role of reverse dopamine transport. *J Pharmacol Exp Ther* 256:1132-8.

Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, Leng G (2002) Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* 418:85-9.

Michel FJ, Trudeau LE (2000) Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* 39:1536-43.

Moghaddam B, Gruen RJ, Roth RH, Bunney BS, Adams RN (1990) Effect of L-glutamate on the release of striatal dopamine: in vivo dialysis and electrochemical studies. *Brain Res* 518:55-60.

Mosharov EV, Gong LW, Khanna B, Sulzer D, Lindau M (2003) Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *J Neurosci* 23:5835-45.

Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1990) In vivo characterization of locally applied dopamine uptake inhibitors by striatal microdialysis. *Synapse* 6:106-12.

Peng Y (1996) Ryanodine-sensitive component of calcium transients evoked by nerve firing at presynaptic nerve terminals. *J Neurosci* 16:6703-12.

Penner R, Neher E (1988) The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. *J Exp Biol* 139:329-45.

Prekeris R, Foletti DL, Scheller RH (1999) Dynamics of tubulovesicular recycling endosomes in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:10324-37.

Pyle JL, Kavalali ET, Piedras-Renteria ES, Tsien RW (2000) Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 28:221-31.

Rice ME, Cragg SJ, Greenfield SA (1997) Characteristics of electrically evoked

somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *J Neurophysiol* 77:853-62.

Robertson GS, Damsma G, Fibiger HC (1991) Characterization of dopamine release in the substantia nigra by in vivo microdialysis in freely moving rats. *J Neurosci* 11:2209-16.

Rouge-Pont F, Abrous DN, Le Moal M, Piazza PV (1999) Release of endogenous dopamine in cultured mesencephalic neurons: influence of dopaminergic agonists and glucocorticoid antagonists. *Eur J Neurosci* 11:2343-50.

Santiago M, Machado A, Cano J (1992) Fast sodium channel dependency of the somatodendritic release of dopamine in the rat's brain. *Neurosci Lett* 148:145-7.

Scholze P, Norregaard L, Singer EA, Freissmuth M, Gether U, Sitte HH (2002) The role of zinc ions in reverse transport mediated by monoamine transporters. *J Biol Chem* 277:21505-13.

St-Gelais F, Legault M, Bourque M-J, Rompré P-P, Trudeau L-E (2004) Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *Journal of Neuroscience* 24:2566-74.

Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4588-602.

Sulzer D, Rayport S (1990) Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action. *Neuron* 5:797-808.

Tse A, Tse FW, Almers W, Hille B (1993) Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes. *Science* 260:82-4.

Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2001) Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 294:1111-5.

Wang CT, Lu JC, Bai J, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2003) Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* 424:943-7.

Wassef M, Berod A, Sotelo C (1981) Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience* 6:2125-39.

Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92:759-72.

Westerink BH, de Boer P, Santiago M, De Vries JB (1994) Do nerve terminals and cell bodies of nigrostriatal dopaminergic neurons of the rat contain similar receptors? *Neurosci Lett* 167:109-12.

Wilson CJ, Groves PM, Fifkova E (1977) Monoaminergic synapses, including dendrodendritic synapses in the rat substantia nigra. *Exp Brain Res* 30:161-74.

Wojtowicz JM, Atwood HL (1984) Presynaptic membrane potential and transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 52:99-113.

Zucker RS (1996) Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17:1049-55.

Figure legends

Figure 1. **Dopamine release persists at low calcium concentrations.** (A) Phase contrast image showing the characteristic appearance of mesencephalic neurons in cultures. (B) Same neurons as in A after immunostaining for tyrosine hydroxylase (green). (C) Time course of the change in extracellular dopamine concentration. Samples were taken every 3min and dopamine was measured with HPLC. Cells were bathed in three different calcium concentrations [normal saline (2mM; NS): $n=10$; 0.5 mM: $n=14$; and 0 mM: $n=9$] and were stimulated with 40 mM K^+ at $t=30$ min. (D) Bar graphs comparing the average dopamine concentrations during the control period and K^+ stimulation. Data from the control period represent the mean of all 6 samples taken before K^+ application, while data for K^+ stimulation represent the peak dopamine levels measured 3 min after K^+ application.

Figure 2. **Dopamine release in low calcium is activity-dependent.** Graph showing the action of 1 μ M tetrodotoxin (TTX) on relative dopamine levels in both normal saline (2mM; NS) ($n=8$) and 0.5 mM calcium ($n=10$). Data are expressed as a percentage of the mean dopamine levels before TTX application. The control trace was obtained in normal calcium concentration ($n=52$).

Figure 3. **K^+ -stimulated terminal release persists at low calcium concentrations.** (A) Confocal fluorescence images showing the presence of the synaptic vesicle indicator FM2-10 in punctuate structures that are presumed to be axon terminals. This signal disappears after a 1 min depolarization with 40 mM K^+ in normal calcium, indicating the exocytosis of

the dye and neurotransmitter. (B) Graph showing the kinetic of FM2-10 fluorescence loss over time in response to two 1 min-40 mM K^+ stimulations. The first K^+ stimulation was performed in varying calcium concentrations [normal saline (2mM; NS): $n=44$ terminals; 0.5 mM: $n= 88$; and 0 mM: $n=88$] while the second was always performed in normal calcium. Dye intensity is expressed as the percentage of the average intensity during the first 6 images. (C) Patch-clamp recordings of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) from cultured mesencephalic neurons at a holding potential of -65 mV. Two 1 min-stimulations with 40 mM K^+ were performed, where the first was applied at different calcium concentrations (NS: $n= 17$; 0.5 mM: $n=8$; and 0 mM: $n=9$) while the second was performed in normal calcium. Note that K^+ application induced a strong inward current accompanied by noise due to a shift in K^+ equilibrium potential. The frequency of mEPSCs was increased by K^+ stimulation even in 0.5 mM calcium. (D) Bar graph comparing the basal mEPSC frequency to the K^+ -stimulated frequency at various calcium concentrations. The basal mEPSC frequency was taken 1 min before the first K^+ stimulation and the average stimulated frequency was taken 1 min after the end of the K^+ stimulation because mEPSCs could not be resolved during K^+ stimulation.

Figure 4. Terminal release evoked by low frequency firing is abolished in low calcium.

(A) Graph showing FM2-10 relative intensity over time. Electrical field stimulation at 5 Hz (1ms/pulse) was used to evoke dye release under the different calcium concentrations [normal saline (2 mM; NS): $n=110$ terminals; 0.5 mM: $n=132$; and 0 mM: $n=110$). This was followed by stimulation with 40 mM K^+ in normal calcium to release any remaining FM2-10. Note that electrically-evoked FM2-10 release was prevented in low calcium. (B)

Representative recording of autaptic excitatory postsynaptic currents made in isolated neurons growing in μ -droplet cultures. Postsynaptic currents were induced by a brief (1ms) depolarizing voltage step to +20 mV from a holding potential of -60 mV. The postsynaptic current was abolished in 0.5 mM calcium leaving only a small stimulation artefact. (C) Histogram comparing the average autaptic current amplitude in normal calcium, 0.5 mM calcium and during washout ($n=9$). Data are expressed relative to the average amplitude in normal calcium.

Figure 5. The dopamine transporter is present and functional in mesencephalic cultures. (A) Sample confocal images from an immunostaining experiment using antibodies directed against DAT (red) and tyrosine hydroxylase (TH; green). Note that neurons positive for DAT were also positive for TH. (B) Average dopamine levels measured in normal calcium concentrations (2mM; NS) with ($n=7$) or without ($n=52$) 1 μ M GBR12909. (C) Time course of extracellular dopamine concentrations in response to 10 μ M amphetamine applied in normal calcium concentration at $t=30$ min ($n=11$). For comparison purposes, data from figure 2 is reproduced (gray) to show the stability of basal dopamine concentrations in normal calcium ($n=52$).

Figure 6. Reverse transport is not involved in somatodendritic dopamine release. (A) Time course of extracellular dopamine concentrations measured by HPLC in 0.5 mM calcium. The DAT blocker GBR12909 (1 μ M) increased basal levels of dopamine but did not perturb K^+ -evoked dopamine release ($n=8$). For comparison purposes, a trace from figure 1C is reproduced (gray) to show dopamine levels measured in 0.5 mM calcium

without GBR12909. (B) Bar graphs comparing basal dopamine concentrations in 0.5 mM calcium with and without 1 μ M GBR12909. Average K⁺-evoked peak dopamine concentrations are also shown with and without GBR12909.

Figure 1

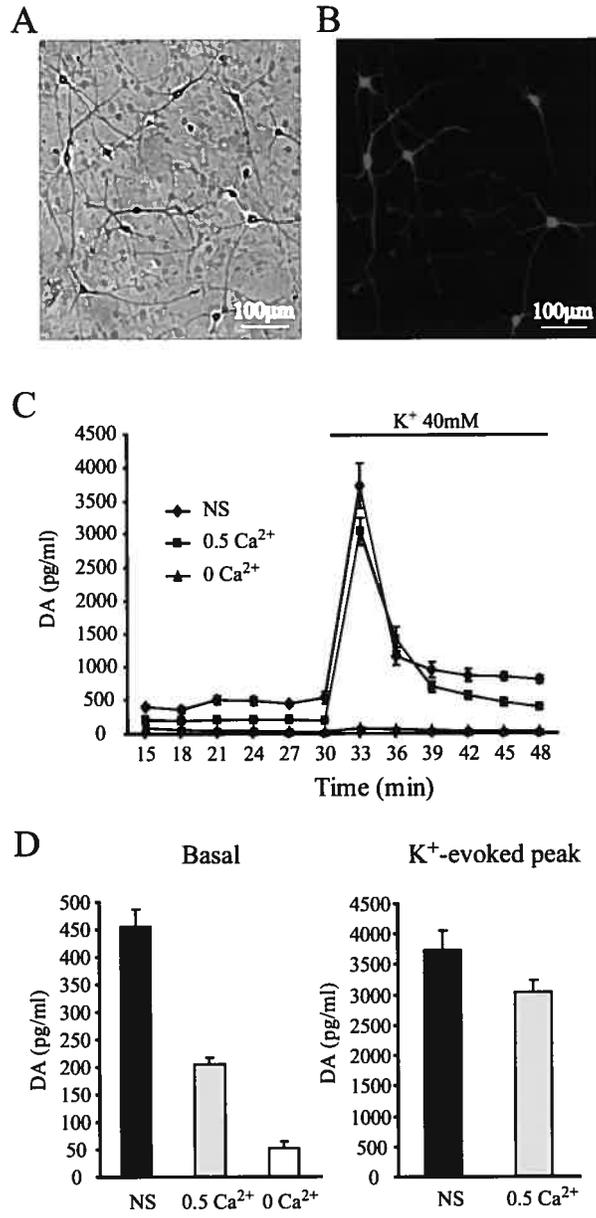


Figure 2

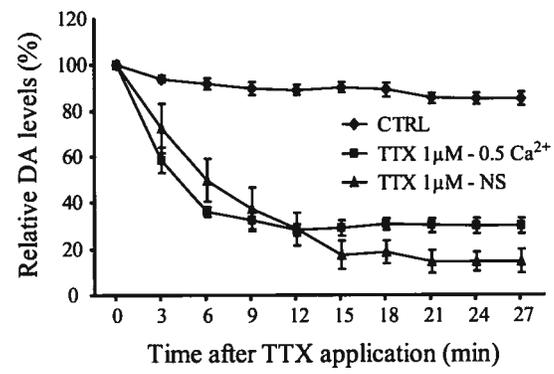


Figure 3

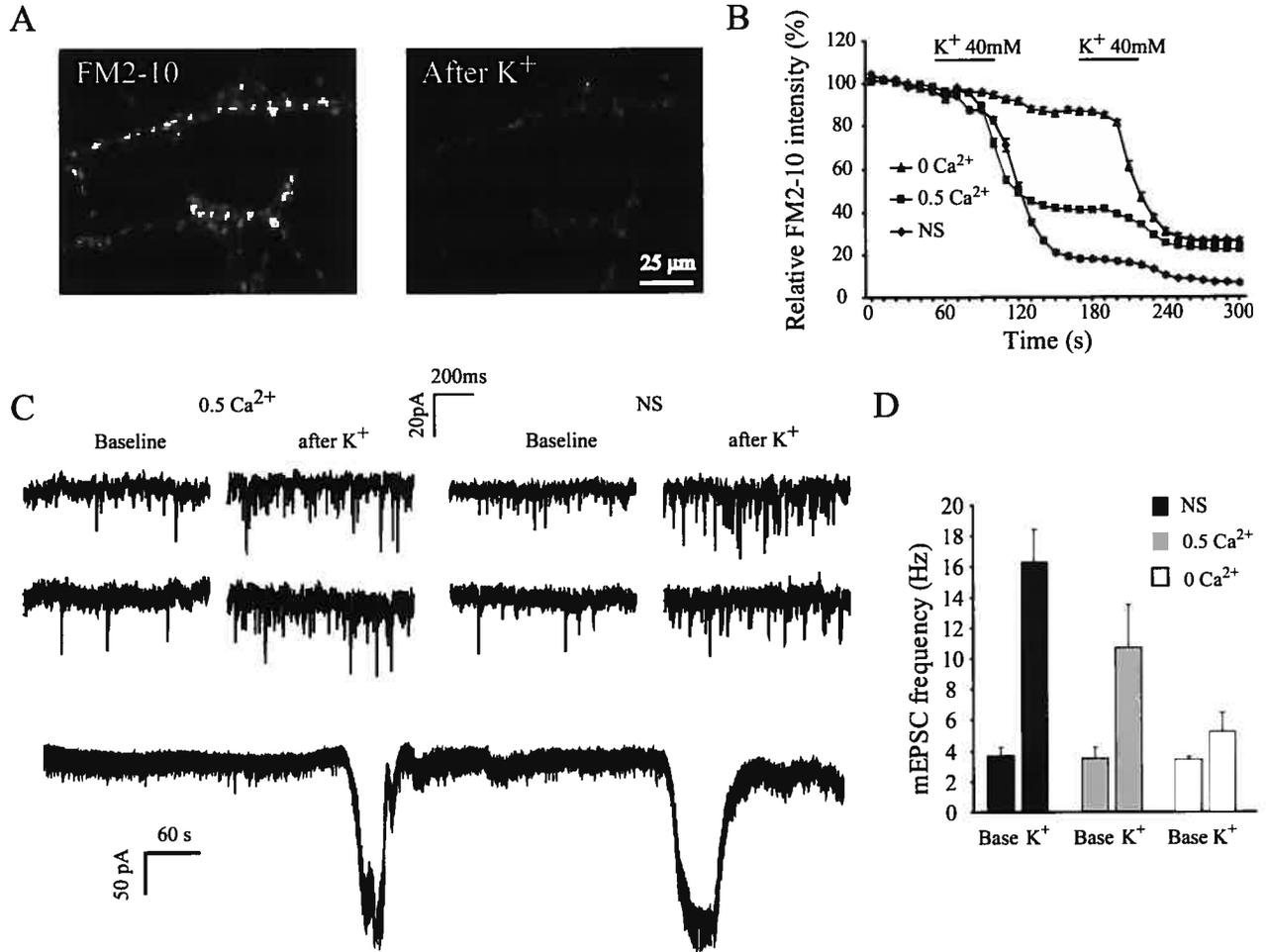


Figure 4

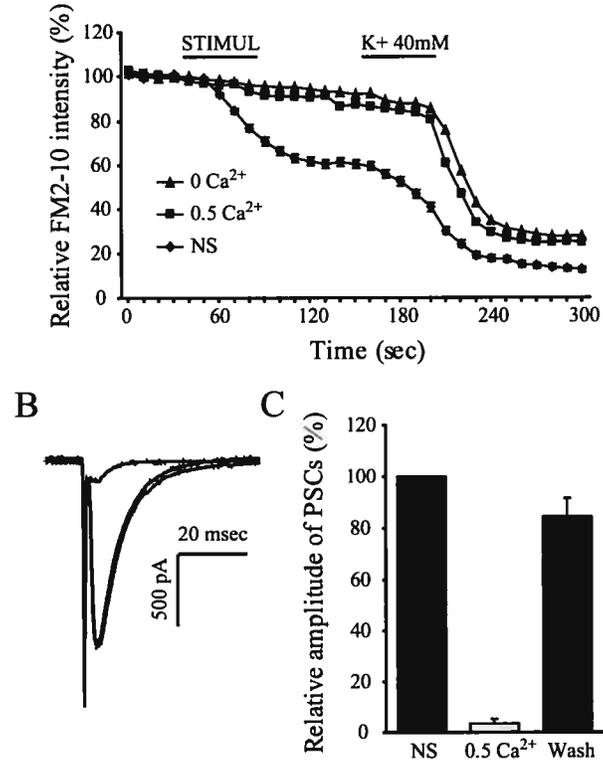


Figure 5

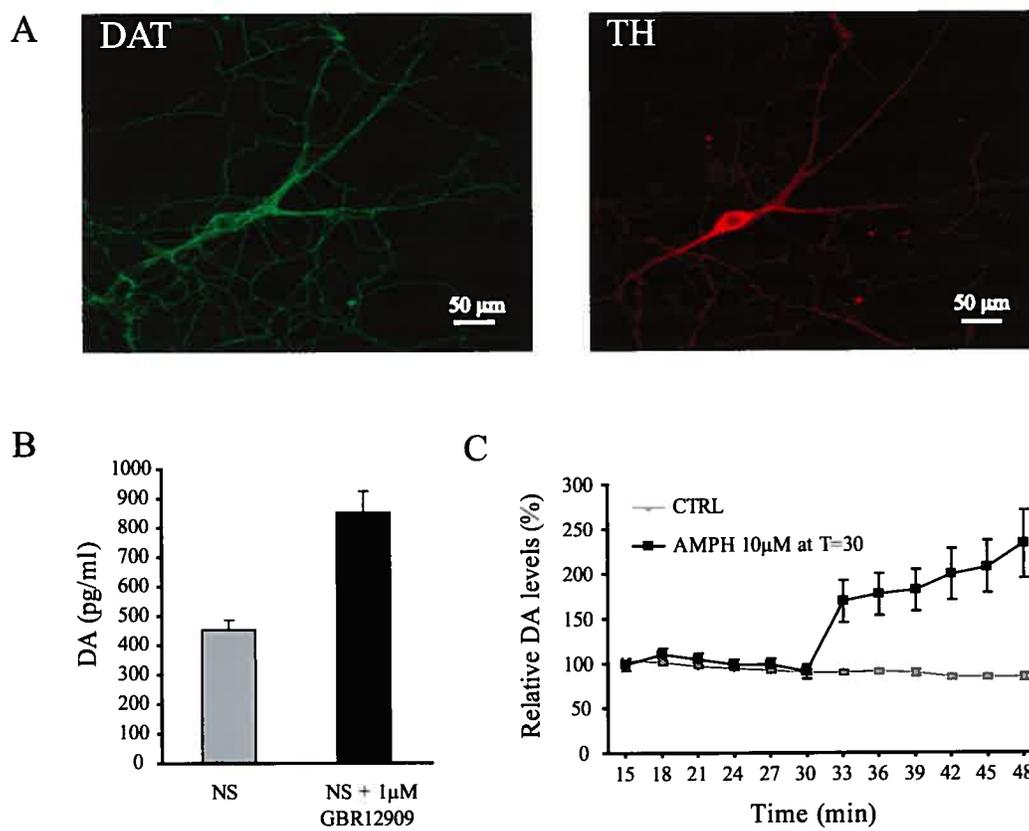
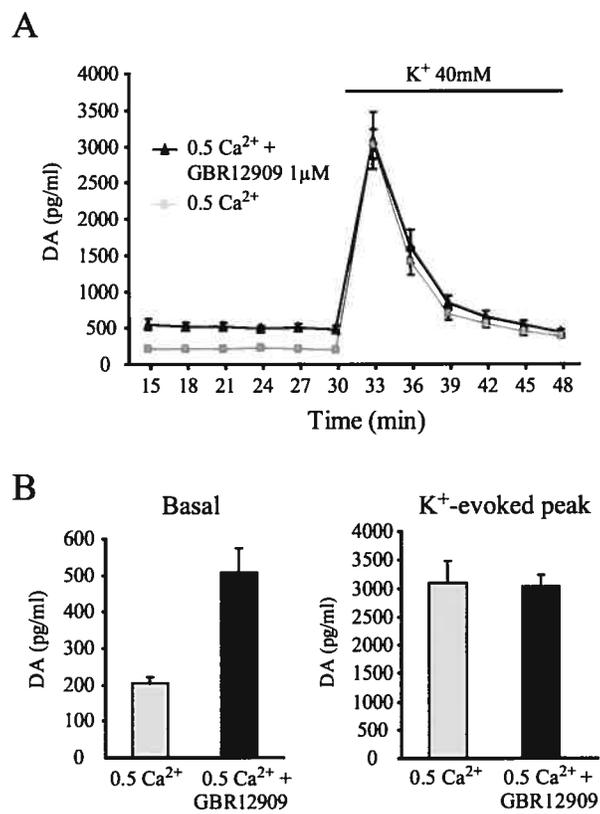


Figure 6



Discussion

5. Considérations méthodologiques

5.1 Utilisation de la culture cellulaire

De nombreux modèles expérimentaux ont été utilisés afin d'étudier la libération somatodendritique de dopamine. La tranche de cerveau a été abondamment employée (pour ne donner que quelques exemples : Geffen et al., 1976; Cuello & Iversen, 1978; Beart & McDonald, 1980; Cragg et al., 1997; Hoffman et Gerhardt, 1998; Chen & Rice, 2001), entre autre puisque la préparation d'une tranche au niveau du mésencéphale isole le compartiment somatodendritique et permet ainsi d'éliminer simplement une éventuelle contribution de la libération terminale. Ce modèle se prête aussi fort bien à l'utilisation de techniques variées, telles que l'électrophysiologie ou l'électrochimie. La microdialyse *in vivo* permet elle aussi l'étude sélective de la libération somatodendritique de dopamine (pour quelques exemples : Bradberry & Roth, 1989; Kalivas et al., 1989; Robertson et al., 1991; Kalivas & Duffy, 1991; Heeringa & Aebrcrombie, 1995; Bergquist et al., 1998, 2002). Cependant, bien que permettant une démonstration directe de la libération de dopamine endogène dans les zones somatodendritiques chez l'animal vivant, les résultats obtenus avec cette méthode sont souvent difficiles à interpréter en raison de la possibilité d'effets indirects incontrôlables. En effet, les manipulations expérimentales, comme l'administration de drogues ou la stimulation électrique de voies afférentes, peuvent engendrer une série d'effets secondaires qui à leur tour influenceront le phénomène sous étude. Ces effets indirects sont difficiles à prévoir et souvent impossibles à éliminer. Pour

ce qui est de la culture cellulaire, elle a surtout servi à étudier les mécanismes susceptibles d'induire le renversement du transport de la dopamine (Sulzer & Rayport, 1990; Larsen et al., 2002; Khoshbouei et al., 2003; Mosharov et al., 2003). Son utilisation a permis de mieux comprendre la stœchiométrie du transport membranaire par le DAT, notamment l'implication des ions Na^+ et Cl^- et le rôle de la température; elle a de plus permis de préciser le mécanisme d'action de l'amphétamine, ou encore d'étudier l'effet de diverses drogues qui induisent aussi le transport inverse, comme la ouabaïne ou la vératridine.

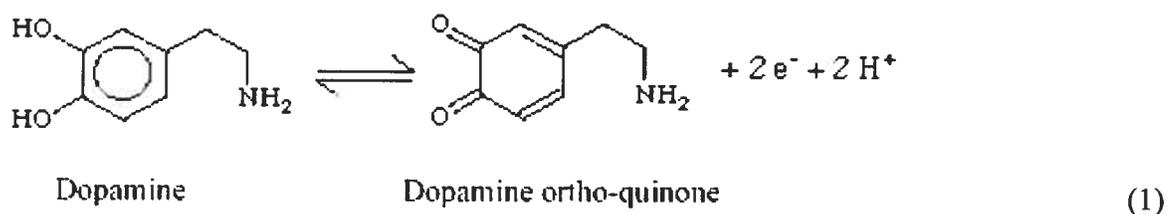
L'utilisation de la culture de neurones dans le but d'étudier la libération somatodendritique de dopamine présente un certain défi. Comment, en effet, isoler la contribution somatodendritique de la contribution terminale? Les neurones dopaminergiques présents dans la culture demeurent intacts, de sorte que les dendrites ainsi que les terminaisons axonales contribuent à la libération de dopamine. Il faut donc trouver un moyen expérimental permettant de les dissocier, ce que nous avons pu faire grâce à la sensibilité différente au calcium entre les libérations terminales et somatodendritiques. Dans un modèle de tranche, Chen et Rice (2001, 2003) ont effectivement montré que la diminution de la concentration du calcium extracellulaire à 0.5 mM abolissait la libération terminale, alors que la libération somatodendritique perdurait. Quelques autres groupes ont aussi observé que la libération somatodendritique semblait moins affectée que la libération terminale par une diminution du calcium extracellulaire (Bergquist et al., 1998; Hoffman & Gerhardt, 1999). Nos résultats ont confirmé cette observation, ce qui nous a permis d'isoler la contribution somatodendritique de la libération de dopamine.

À 0.5mM calcium, les niveaux de dopamine extracellulaire se situent à environ 200 pg/ml, alors qu'ils atteignent à peu près 450 pg/ml en présence de salin normal, ce qui suggère que la libération somatodendritique contribue à près de 50% des niveaux de dopamine mesurés à la concentration normale de calcium. Cette contribution importante de la libération somatodendritique par rapport à la libération terminale peut paraître surprenante, car tous s'entendent pour affirmer que les niveaux de dopamine libérée dans l'ATV ou la SN sont bien en deçà des niveaux libérés dans le striatum, le NAcc ou le cortex préfrontal (Heeringa & Abercrombie, 1995; Beart & McDonald; 1980; Robertson et al., 1991; Westerink et al., 1994; Bergquist et al., 2002). Afin d'expliquer cet état de fait, on peut supposer que les neurones mis en culture développent moins de terminaisons axonales qu'*in vivo*. Il est possible que les conditions de culture inhibent ou défavorisent la croissance axonale. Nous savons à cet égard que les cellules des régions cibles émettent de nombreux signaux qui régulent et stimulent la croissance des axones, ainsi que l'établissement de synapses viables. Notons simplement que cette situation prévilégie l'utilisation des cultures neuronales pour l'étude de la libération somatodendritique de dopamine.

5.2 Échantillonnage et mesure de la dopamine

Les techniques expérimentales permettant de mesurer la dopamine sont elles aussi multiples. Les principales approches utilisées aujourd'hui sont néanmoins l'HPLC et la

voltamétrie¹¹. Ces deux méthodes d'électrochimie tirent profit de la réaction d'oxydation (1) décrite ci-dessous. Grâce à la mesure du courant induit par la perte de deux électrons pour chaque molécule de dopamine oxydée, on arrive à une estimation de la quantité de dopamine présente au départ.



Bien que reposant sur le même principe électrochimique de base, ces deux méthodes diffèrent à bien des égards et comportent donc avantages et inconvénients respectifs (révisés récemment par Finlay et Zigmond, 1995). L'HPLC implique le passage d'un échantillon à travers une colonne de filtration qui séparera les composants de l'échantillon avant qu'ils ne soient oxydés par un courant électrique, de sorte que l'on connaîtra en plus de leur quantité, le temps mis pour traverser la colonne, appelé temps de rétention. Par comparaison avec un échantillon témoin d'une composition connue, la filtration permettra de déterminer avec une précision remarquable la composition chimique de l'échantillon. Le principal inconvénient de l'HPLC vient de la quantité de substance nécessaire au passage à travers la colonne. L'obtention d'une quantité suffisante de liquide extracellulaire nécessite plusieurs minutes (en général 20 min pour la microdialyse *in vivo*). Au contraire, la

¹¹ L'ampérométrie est aussi un outil efficace dont l'utilisation offre quelques avantages par rapport à la voltamétrie, comme une plus grande sensibilité. L'ampérométrie permet aujourd'hui de mesurer des événements unitaire de relâche vésiculaire et a ainsi été utilisé pour étudier la libération somatodendritique (Jaffe et al., 1998). Toutefois, son utilisation dans des tranches et encore davantage *in vivo* est compliquée par le fait que l'ampérométrie ne permet pas de reconnaître l'identité de la substance oxydée, de sorte que des substances comme la noradrénaline ou l'acide ascorbique peuvent être confondues avec la dopamine.

voltamétrie permet de mettre en contact direct l'électrode d'oxydation et le milieu extracellulaire, grâce à son insertion à l'intérieur d'une pipette de verre que l'on peut enfonce au cœur du tissu nerveux. On arrive de la sorte à mesurer la dopamine extracellulaire en temps réel, avec une résolution temporelle de l'ordre de 100 msec. Malheureusement, la sensibilité de la voltamétrie est moindre que celle de l'HPLC et ne permet pas de mesurer les niveaux de base de dopamine. Son utilisation requiert donc une stimulation de la libération, qui peut, comme nous l'avons mentionné précédemment, engendrer divers biais. Étant donné leurs caractéristiques distinctes, l'HPLC et la voltamétrie offrent des résultats complémentaires plutôt que redondants.

Puisque notre objectif consistait à étudier la libération somatodendritique de dopamine associée à l'activité spontanée à faible fréquence des neurones dopaminergiques, l'utilisation de l'HPLC s'imposait. Afin de mettre au point le protocole d'échantillonnage du milieu où reposent les cultures, nous nous sommes inspirés des travaux de Rougé-Pont et al. (1999), qui sont, à notre connaissance, le seul autre groupe ayant réalisé un protocole semblable en culture. Rougé-Pont et al. (1999) ont montré que les niveaux extracellulaires de dopamine augmentent en fonction de l'âge des cultures (entre 9 et 33 jours) et qu'ils sont proportionnels au nombre de neurones dopaminergiques présentes sur la lamelle (entre 300 et 2300). Nos conditions de culture produisent entre 300 et 800 neurones dopaminergiques par lamelle, que nous utilisons entre 12 et 24 jours après la mise en culture. Selon leurs résultats, des cultures âgées en moyenne de 18 jours et contenant en moyenne 500 neurones dopaminergiques devaient donner lieu à des niveaux extracellulaires de dopamine avoisinant 80-100 pg/ml. Nous avons obtenu des niveaux de base moyens de 453 ± 16

pg/ml ($n=52$). Cette légère différence pourrait provenir de la composition différente entre notre salin physiologique et celui de Rougé-Pont et al., contenant respectivement 2 mM versus 1.2 mM de CaCl_2 . Peut-être leurs conditions de culture étaient-elles aussi moins favorables, de sorte que l'activité cellulaire et donc la libération de dopamine y auraient été plus faibles. Dans tous les cas, ces différences avec les niveaux mesurés par Rougé-Pont et al. (1999) sont à notre avantage. Ayant par ailleurs administré comme eux 10 μM d'amphétamine ainsi que 1 μM de TTX, nous avons obtenu des résultats fort similaires.

Soulignons finalement qu'*in vitro* comme *in vivo*, la dopamine extracellulaire reflète un équilibre entre la libération, la recapture et la dégradation (Schmitz et al., 2003). De nombreux facteurs peuvent influencer cet équilibre. Nous avons ainsi observé que la présence d'un antagoniste du DAT déplaçait cet équilibre de manière à augmenter les niveaux ambiants de dopamine. Une fois libérée, la dopamine extracellulaire agira sur les récepteurs à dopamine de type D2 présents en culture afin de diminuer la libération (Congar et al, 2002), ce qui contribuera à maintenir la stabilité de la concentration extracellulaire de dopamine. Par ailleurs, le maintien de cet équilibre dynamique sera grandement affecté par la fréquence et l'ampleur de l'échantillonnage. Par exemple, un échantillonnage trop rapide ou trop important pourrait engendrer des niveaux extracellulaires irréguliers si la libération n'arrive pas à compenser la disparition de la dopamine extracellulaire. Nous avons aussi remarqué que les cellules nécessitent une période de 15 min suivant le transfert dans le bain expérimental afin que les niveaux ambiants de dopamine se stabilisent. Bien entendu, la température aura aussi un impact sur les niveaux de dopamine, en influençant le taux de décharge des cellules ainsi que l'activité du DAT. Il aura par conséquent fallu quelques

expériences préliminaires afin de mettre au point un protocole qui permette de maintenir des niveaux de dopamine stable avec un échantillonnage du milieu extracellulaire aux 3 min, contrairement aux 5 min chez Rougé-Pont et al. (1999).

5.3 Étude de l'activité terminale versus somatodendritique

À défaut de pouvoir mesurer la libération somatodendritique directement, nous avons eu recours à une approche par élimination. L'enregistrement de courants postsynaptiques ainsi que du signal fluorescent FM2-10 nous ont permis de mesurer des paramètres reflétant l'activité terminale uniquement, et donc de confirmer la réduction drastique de l'activité terminale en présence de 0.5 mM calcium. Ces résultats portent à croire que la dopamine libérée dans ces conditions doit être d'origine somatodendritique.

Divers facteurs compliquent l'étude directe de la libération somatodendritique de dopamine, par exemple sa nature asynaptique. Les études morphologiques démontrent effectivement la grande rareté de synapses dendro-dendritiques (Cuello & Iversen, 1978; Reubi & Sandri, 1979; Wassef et al., 1981). L'activation de la libération somatodendritique de dopamine sera donc difficilement détectable dans les neurones voisins, d'autant plus que les récepteurs à la dopamine sont métabotropes, de sorte que leur activation ne produit pas de courants membranaires rapides de forte amplitude comme les courants postsynaptiques ionotropes évoqués par la libération synaptique des neurotransmetteurs tels que le glutamate ou le GABA. Néanmoins, la libération somatodendritique de dopamine est

reconnue pour activer les autorécepteurs D2 sur les neurones dopaminergiques eux-mêmes (Groves et al., 1975; Cragg & Greenfield, 1997). L'activation du D2 induit d'ailleurs une hyperpolarisation membranaire détectable avec la technique de patch clamp (Kim et al., 1995; Uchida et al., 2000; Lacey et al., 1987). Ainsi, il est possible d'enregistrer le potentiel membranaire d'un neurone dopaminergique et de se servir de l'hyperpolarisation induite suite à l'activation du récepteur D2 (que l'on peut bloquer avec un antagoniste sélectif tel que le sulpiride) comme index de la libération somatodendritique. Ce type d'expérience, menée à bien par un seul groupe à notre connaissance (Falkenburger et al., 2001), requiert cependant une méthode pour stimuler la libération somatodendritique, comme par exemple la stimulation de voies afférentes bien connues, telles que celles qui proviennent du noyau sous-thalamique. La culture cellulaire se prête donc assez mal à cette approche, puisque la connectivité du tissu n'y est pas maintenue.

La visualisation de la libération somatodendritique avec un marqueur vésiculaire fluorescent comme le FM2-10 apparaîtrait certainement comme une approche prometteuse. Cependant, ici encore, certaines caractéristiques de la libération somatodendritique de dopamine font obstacle. En premier lieu, il a été montré que le signal fluorescent émis par le FM2-10 et retrouvé dans les prolongements axonaux représente en fait la somme du signal émit par plusieurs vésicules regroupées et chargées en FM2-10 (Everitt et al., 2002). Or, dans les dendrites, il ne semble pas y avoir d'agregats importants de vésicules (Mercer et al., 1978; Cuello & Iversen, 1978; Reubi & Sandri, 1979; Wassef et al., 1981; Hattori et al., 1979), ce qui devrait compliquer l'identification de sites de libération dans les dendrites. En second lieu, l'internalisation du marqueur fluorescent requiert l'endocytose et le

recyclage rapide des vésicules ayant libérées leur contenu par exocytose. Or, on ignore si les mécanismes d'endocytose et de recyclage dans les dendrites sont aussi efficaces qu'aux terminaisons axonales. Seul le groupe du Dr. Roberto Malinow semble avoir utilisé avec succès un marqueur vésiculaire (FM1-43) afin de visualiser un processus d'exocytose somatodendritique (Maletic-Savatic & Malinow, 1998a, b). L'internalisation du FM1-43 dans des neurones d'hippocampe en culture a nécessité une incubation d'une nuit, contrairement à 2 min lors d'études sur la libération terminale. À l'aide d'immunomarquages, ces auteurs ont associé la majeure partie de la fluorescence intracellulaire à l'appareil de Golgi. Dans cette étude, une stimulation avec un ionophore calcique a induit la perte d'une partie du signal ainsi que la libération du FM1-43 dans le milieu extracellulaire. Rien ne montre cependant que cette exocytose dendritique ait été associée à la libération de neurotransmetteur; les auteurs eux-mêmes proposent que ce mouvement de vésicules soit plutôt impliqué dans le transport régulé de protéines à la membrane plasmique. Ces mêmes auteurs ont étudié la localisation du FM1-43 suite à une incubation de 2 min et ont conclu que seules les terminaisons synaptiques étaient alors marquées (Maletic-Savatic & Malinow, 1998a).

La mesure de la dopamine extracellulaire par HPLC en culture dans des conditions où la libération terminale est pratiquement abolie constitue donc, en fin de compte, une approche tout à fait acceptable pour l'étude de la libération somatodendritique de dopamine. En plus d'offrir une mesure directe de la libération de dopamine endogène et de permettre ainsi l'étude de son mécanisme, cette approche s'avère prometteuse quant à la poursuite des travaux sur les caractéristiques de cette libération. Effectivement, notre

modèle permettra non seulement l'étude de la machinerie moléculaire responsable de l'exocytose de la dopamine somatodendritique, en utilisant notamment les toxines clostridiales, mais aussi l'étude du mécanisme responsable de sa sensibilité particulière envers le calcium extracellulaire. Ce genre de manipulations, ainsi que leurs interprétations, seraient difficiles *in vivo* ou dans une préparation de tranche de cerveau. Nous abordons ces perspectives dans la prochaine section.

6. Perspectives

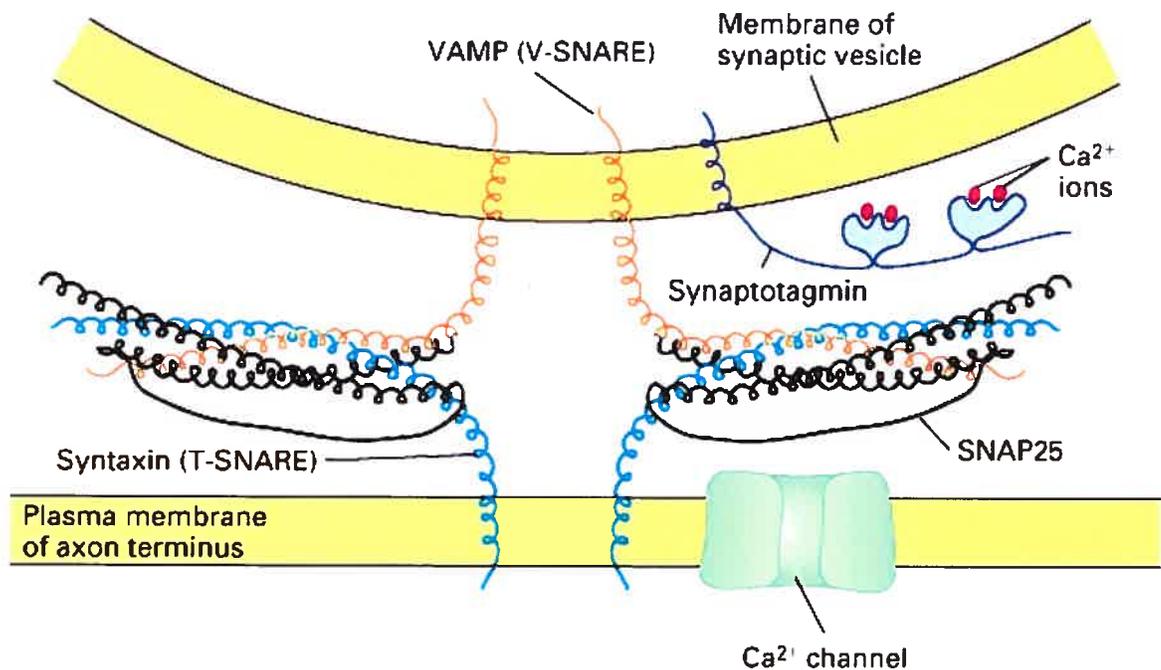
6.1 Machinerie d'exocytose dans les dendrites

Bien que les caractéristiques physiologiques de la libération somatodendritique de dopamine soient compatibles avec un mécanisme impliquant l'exocytose, plusieurs études anatomiques ont eu du mal à repérer les structures vésiculaires qui pourraient participer à l'exocytose dans les dendrites des neurones dopaminergiques (Mercer et al., 1978; Cuello & Iversen, 1978; Reubi & Sandri, 1979; Wassef et al., 1981; Hattori et al., 1979). Certains groupes ont donc proposé l'implication de compartiments vésiculaires qui seraient différents des vésicules synaptiques typiques, telles que les tubulovésicules (Hattori et al., 1979; Wassef et al., 1981; Mercer et al., 1978). Ces tubulovésicules pourraient être dérivées des extensions du RE retrouvé dans les dendrites et pourraient à leur tour impliquer une machinerie d'exocytose différente. Il serait donc intéressant de déterminer la présence et le fonctionnement dendritique de la machinerie moléculaire normalement responsable de la fusion des vésicules avec la membrane plasmique.

Jusqu'ici, on a identifié un minimum de trois protéines susceptibles de former un complexe de fusion membranaire (Weber et al., 1998), soit la syntaxine, la SNAP-25 et la VAMP (aussi connue sous le nom de synaptobrevine). On classe ces protéines en deux groupes, selon qu'elles se retrouvent sur les vésicules (v-SNARE) ou bien sur la membrane plasmique (t-SNARE). VAMP fait partie du premier groupe, alors que syntaxine et SNAP-

25 feraient partie du second. Le modèle SNARE propose ainsi que la liaison serrée entre les v-SNARE et les t-SNARE soit responsable de mettre en apposition les vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (voir figure 3).

Figure 3 – Complexe SNARE de fusion vésiculaire



Tiré du site web: <http://www.zoology.ubc.ca/~auld/bio350/lectures/figures/neurons/F21-31.GIF>

Afin d'étudier l'implication de ces protéines, il serait intéressant d'évaluer l'effet de toxines pouvant sélectivement affecter les protéines du complexe SNARE. Les bactéries du genre *Clostridium* produisent des neurotoxines qui agissent comme protéases et vont sélectivement cliver l'une ou l'autre des protéines SNARE, faisant en sorte de perturber la libération de neurotransmetteur. Ainsi, la neurotoxine botulique C (BoNT C) cible la

syntaxine, les BoNT A, C et E ciblent SNAP-25, tandis que VAMP est clivée par les BoNT B, D, F et G, ainsi que par la toxine tétanique. Ces neurotoxines se sont ainsi révélées des outils inestimables pour l'étude du mécanisme d'exocytose synaptique et pourraient être utilisées de manière fort avantageuse pour mieux comprendre la libération somatodendritique de dopamine. Bergquist et al. (2002) ont déjà tenté l'expérience dans un modèle de microdialyse *in vivo* chez le rat. Ils ont comparé la sensibilité de la libération terminale et somatodendritique aux BoNT A et B et ont démontré que la libération de dopamine dans la SN n'était sensible qu'à la BoNT A, alors que la libération dans le striatum était inhibée par les BoNT A et B. Ces travaux suggèrent que la machinerie d'exocytose somatodendritique ne nécessite pas l'action de VAMP, ou bien, plus vraisemblablement, qu'elle implique un isoforme de la VAMP insensible à la BoNT B. À ce titre, un tel isoforme a bel et bien été identifié, TI-VAMP/VAMP-7. Bien que les résultats de Bergquist et al. (2002) soient très prometteurs, une action indirecte sur les neurones voisins dans la SN ou sur les fibres afférentes à la SN ne peut pas être éliminée. De plus, ces auteurs ont aussi noté une absence de sensibilité envers la toxine tétanique autant pour la libération somatodendritique que terminale, ce qui s'explique difficilement et suggère l'existence de problèmes expérimentaux. Nous croyons donc que notre modèle se prêterait particulièrement bien à l'utilisation des toxines botuliques puisqu'il minimiserait les effets indirectes de ces drogues, et permettrait donc de clarifier l'effet de ces toxines sur la libération somatodendritique de dopamine. Ces travaux devraient à leur tour conduire à une meilleure compréhension du mécanisme d'exocytose dans les dendrites.

6.2 Sensibilité envers le calcium

Nos travaux confirment la sensibilité particulière de la libération somatodendritique de la dopamine envers le calcium. Bien que la libération perdure en présence de niveaux faibles, une quantité minimale de calcium extracellulaire est néanmoins nécessaire. Cette différence par rapport à la libération terminale représente donc un terrain tout à fait intéressant pour la poursuite de nos travaux.

La synaptotagmine, une protéine présente à la membrane des vésicules, peut lier deux t-SNARE, syntaxine et SNAP-25 (Adolfson & Littleton, 2001). De plus, elle possède deux domaines de forte affinité pour le calcium, dont l'activation augmente considérablement son affinité pour les phospholipides (Davis et al., 1999; Bai et al., 2002). Pour ces raisons, la synaptotagmine apparaît aujourd'hui comme l'une des protéines principales expliquant le déclenchement de l'exocytose en réponse à l'entrée massive du calcium dans les terminaisons axonales (Koh & Bellen, 2003). Or, il existe plusieurs isoformes de synaptotagmine dont l'activité dépend plus ou moins de la présence du calcium (Li et al., 1995). La synaptotagmine IV par exemple, présente une mutation naturelle dans un de ses deux domaines d'interaction avec le calcium, ce qui fait en sorte que son affinité pour les phospholipides est altérée (Thomas et al., 1999; Bai et al., 2002). Il en résulte un contrôle particulier du pore de fusion, en l'occurrence une diminution des fusions complètes et une augmentation de la libération par « kiss and run » (Wang et al., 2001, 2003). La présence de cet isoforme de synaptotagmine dans le compartiment somatodendritique des neurones dopaminergiques pourrait peut-être expliquer la sensibilité

moindre envers le calcium extracellulaire. Nos prochains travaux devraient donc vérifier si la synaptotagmine IV ou un autre isoforme sont présents dans les dendrites des neurones dopaminergiques. De plus, il serait intéressant de vérifier si la libération somatodendritique est de type « kiss and run ». Sans entrer dans les détails, notons tout de même que les enregistrements ampérométriques de la libération somatodendritique de dopamine réalisés par Jaffe et al. (1998) sur des neurones en tranche semblent correspondre à des événements de ce type. Effectivement, l'examen des tracés montrés dans l'article révèle que la majorité des réponses ampérométriques ont une amplitude plus petite que 1 pA, alors qu'une amplitude de plus de 2,5 pA devrait être détectée suite à des événements impliquant une fusion complète (Wang et al., 2003).

En second lieu, il serait intéressant de vérifier l'implication potentielle des stocks intracellulaires de calcium, puisque ceux-ci pourraient permettre d'amplifier un influx calcique modeste. Il a effectivement été démontré que ceux-ci pouvaient jouer un rôle lors de la libération somatodendritique des vésicules à cœur dense contenant les neuropeptides, ainsi que lors de la sécrétion endocrine (Blöchl & Theonen, 1995, 1996; Peng, 1996; Ludwig et al., 2002). Il serait donc facile de tester l'effet sur la libération somatodendritique de dopamine de drogues telles que la thapsigargin ou la ryanodine, qui permettent d'éliminer la contribution des stocks internes de calcium (associés au réticulum endoplasmique).

Finalement, certaines études suggèrent que les canaux calciques sensibles au voltage (VDCC) responsables de l'influx calcique déclenchant l'exocytose ne soient pas les mêmes

dans les dendrites que dans les terminaisons axonales. Bergquist et al. (1998), toujours en microdialyse *in vivo*, ont effectivement montré que des bloqueurs de canaux de type N et P/Q bloquaient la libération terminale, sans toutefois diminuer la libération somatodendritique. Cependant, Elvefors et al., (1997) ont quant à eux observé que la libération somatodendritique de dopamine évoquée par une stimulation au K^+ était bel et bien inhibée par un bloqueur des canaux de type P/Q. L'apparente contradiction entre ces travaux pourrait être due au fait que Bergquist et al. ont mesuré la libération spontanée alors qu'Elvefors et al. ont mesuré la libération évoquée. Cependant, l'interprétation est compliquée dans les deux cas par de possibles effets indirects. Dans un second article, toujours en microdialyse *in vivo*, Bergquist et al. (2003) ont suggéré une implication des canaux calciques de type R dans la libération de dopamine dans la SN. Notre modèle en culture, où il est possible de mesurer la libération basale et la libération évoquée, permettrait de clarifier l'implication des différents canaux calciques sensibles au voltage en minimisant le risque d'effets indirects. Par ailleurs, il a été suggéré que la libération somatodendritique de dopamine puisse être spécialement influencée par les courants calciques dans les dendrites. En effet, il a été montré que des stimuli connus pour favoriser la libération somatodendritique de dopamine, comme la 5-HT et l'acétylcholine, augmentaient l'amplitude de courants calciques dans les neurones dopaminergiques (Nedergaard et al., 1988, 1989). Nedergaard et al. ont d'ailleurs suggéré que les courants calciques dans les dendrites soient susceptibles de moduler la libération somatodendritique directement. À notre connaissance, le test direct de cette hypothèse n'a pourtant pas été réalisé, ce que nous pourrions aisément faire avec notre modèle à l'aide du patch clamp et de l'imagerie calcique.

7. Conclusion

Nos travaux ont permis la mise au point du premier modèle en culture permettant l'étude de la libération somatodendritique de dopamine. Grâce à ce modèle, nous avons montré que la libération somatodendritique de dopamine, lorsque les neurones déchargent spontanément à basse fréquence, n'implique pas le transport inverse, et donc implique fort probablement un mécanisme d'exocytose. Nous avons par ailleurs confirmé que la libération somatodendritique de dopamine perdurait en présence de faibles concentrations de calcium extracellulaire, contrairement à la libération terminale. Ainsi, notre modèle permettra d'améliorer notre compréhension de la libération somatodendritique de dopamine, notamment en ce qui concerne les mécanismes moléculaires impliqués dans l'exocytose dendritique, ainsi que la sensibilité particulière envers le calcium. La contribution du transport inverse dans des conditions physiologiques restera à éclaircir. Une autre contribution potentielle du transport inverse n'est pas à négliger puisque de nombreuses drogues (médicaments ou drogues d'abus) agissent comme bloqueurs du DAT, et pourraient donc influencer la libération somatodendritique de dopamine.

On reconnaît aujourd'hui l'importance physiologique de la libération somatodendritique de dopamine. Suite à l'activation des auto-récepteurs D2, la dopamine libérée par les dendrites peut moduler l'activité des neurones dopaminergiques et donc influencer les multiples fonctions auxquelles le système dopaminergique participe. De plus, la libération somatodendritique de dopamine semble jouer un rôle crucial dans l'induction

de la sensibilisation aux psychostimulants, processus que l'on considère central au développement de la dépendance aux drogues d'abus. Ainsi, une réelle compréhension du système dopaminergique passe invariablement par une bonne connaissance de la libération somatodendritique de dopamine.

Bibliographie

Adam-Vizi V (1992) External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J Neurochem* 58:395-405.

Adolfson B, Littleton JT (2001) Genetic and molecular analysis of the synaptotagmin family. *Cell Mol Life Sci* 58:393-402.

Agnati LF, Fuxe K (2000) Volume transmission as a key feature of information handling in the central nervous system possible new interpretative value of the Turing's B-type machine. *Prog Brain Res* 125:3-19.

Agnati LF, Fuxe K, Zoli M, Ozini I, Toffano G, Ferraguti F (1986) A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol Scand* 128:201-7.

Araneda R, Bustos G (1989) Modulation of dendritic release of dopamine by N-methyl-D-aspartate receptors in rat substantia nigra. *J Neurochem* 52:962-70.

Archibald JT, White TD (1974) Rapid reversal of internal Na⁺ and K⁺ contents of synaptosomes by ouabain. *Nature* 252:595-6.

Arsenault MY, Parent A, Seguela P, Descarries L (1988) Distribution and morphological characteristics of dopamine-immunoreactive neurons in the midbrain of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol* 267:489-506.

Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11:401-7.

Bai J, Wang P, Chapman ER (2002) C2A activates a cryptic Ca(2⁺)-triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1665-70.

Bannon MJ, Granneman JG, Kapatos G (1995) The dopamine transporter. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress* (Bloom FE, Kupfer DJ, eds), pp 179-188. New York, USA: Raven Press Ltd.

Bargh JA, Ferguson MJ (2000) Beyond behaviorism: on the automaticity of higher mental processes. *Psychol Bull* 126:925-45.

Bayer VE, Pickel VM (1990) Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *J Neurosci* 10:2996-3013.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (1997) *Neurosciences: A la découverte du cerveau*. Éditions Pradel.

Beart PM, McDonald D (1980) Neurochemical studies of the mesolimbic dopaminergic pathway: somatodendritic mechanisms and GABAergic neurones in the rat ventral tegmentum. *J Neurochem* 34:1622-9.

Bergquist F, Jonason J, Pileblad E, Nissbrandt H (1998) Effects of local administration of L-, N-, and P/Q-type calcium channel blockers on spontaneous dopamine release in the striatum and the substantia nigra: a microdialysis study in rat. *J Neurochem* 70:1532-40.

Bergquist F, Niazi HS, Nissbrandt H (2002) Evidence for different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. *Brain Res* 950:245-53.

Bergquist F, Nissbrandt H (2003) Influence of R-type (Cav2.3) and t-type (Cav3.1-3.3) antagonists on nigral somatodendritic dopamine release measured by microdialysis. *Neuroscience* 120:757-64.

Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-32.

Bjorklund A, Lindvall O (1975) Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res* 83:531-7.

Bjorklund A, Lindvall O, Svensson LA (1972) Mechanisms of fluorophore formation in the histochemical glyoxylic acid method for monoamines. *Histochemie* 32:113-31.

Blanchard V, Raisman-Vozari R, Vyas S, Michel PP, Javoy-Agid F, Uhl G, Agid Y (1994) Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain*

Res 22:29-38.

Blochl A, Thoenen H (1995) Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci* 7:1220-8.

Blochl A, Thoenen H (1996) Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 7:173-90.

Bloom FE, Battersberg EL (1976) A rapid, simple and sensitive method for the demonstration of central catecholamine-containing neurons and axons by glyoxylic acid-induced fluorescence. II. A detailed description of methodology. *J Histochem Cytochem* 24:561-71.

Bogdanski DF, Brodie BB (1969) The effects of inorganic ions on the storage and uptake of H³-norepinephrine by rat heart slices. *J Pharmacol Exp Ther* 165:181-9.

Bogerts B, Hantsch J, Herzer M (1983) A morphometric study of the dopamine-containing cell groups in the mesencephalon of normals, Parkinson patients, and schizophrenics. *Biol Psychiatry* 18:951-69.

Bradberry CW, Roth RH (1989) Cocaine increases extracellular dopamine in rat nucleus accumbens and ventral tegmental area as shown by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 103:97-102.

Bull DR, Palij P, Sheehan MJ, Millar J, Stamford JA, Kruk ZL, Humphrey PP (1990)

Application of fast cyclic voltammetry to measurement of electrically evoked dopamine overflow from brain slices in vitro. *J Neurosci Methods* 32:37-44.

Bunney BS, Walters JR, Roth RH, Aghajanian GK (1973) Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* 185:560-71.

Carlsson A (1975) Monoamine-depleting drugs. *Pharmacol Ther [B]* 1:393-400.

Carlsson A, Falck B, Hillarp NA (1962) Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand* 56(Suppl 196):1-28.

Carlsson A, Lindqvist M (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidole on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 20:140-4.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127:471.

Cass WA, Gerhardt GA (1994) Direct in vivo evidence that D2 dopamine receptors can modulate dopamine uptake. *Neurosci Lett* 176:259-63.

Chang MY, Lee SH, Kim JH, Lee KH, Kim YS, Son H, Lee YS (2001) Protein kinase C-mediated functional regulation of dopamine transporter is not achieved by direct phosphorylation of the dopamine transporter protein. *J Neurochem* 77:754-61.

Chen BT, Rice ME (2001) Novel Ca²⁺ dependence and time course of somatodendritic dopamine release: substantia nigra versus striatum. *J Neurosci* 21:7841-7.

Chen BT, Rice ME (2002) Synaptic regulation of somatodendritic dopamine release by glutamate and GABA differs between substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurochem* 81:158-69.

Chen BT, Rice ME (2003) Calcium dependence of dopamine release in the VTA reveals both somatodendritic and synaptic characteristics. *Society for Neurosciences Abstracts session 461:poster 16.*

Chen N, Reith ME (2000) Structure and function of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* 405:329-39.

Cheramy A, Leviel V, Glowinski J (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289:537-42.

Chiodo LA, Bannon MJ, Grace AA, Roth RH, Bunney BS (1984) Evidence for the absence of impulse-regulating somatodendritic and synthesis-modulating nerve terminal autoreceptors on subpopulations of mesocortical dopamine neurons. *Neuroscience* 12:1-16.

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. *J Comp Neurol* 409:38-56.

Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI (1995) The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci* 15:1714-23.

Cobb WS, Abercrombie ED (2002) Distinct roles for nigral GABA and glutamate receptors

in the regulation of dendritic dopamine release under normal conditions and in response to systemic haloperidol. *J Neurosci* 22:1407-13.

Congar P, Bergevin A, Trudeau LE (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol* 87:1046-56.

Cragg S, Rice ME, Greenfield SA (1997a) Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurophysiol* 77:863-73.

Cragg SJ, Greenfield SA (1997b) Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci* 17:5738-46.

Cragg SJ, Hille CJ, Greenfield SA (2000) Dopamine release and uptake dynamics within nonhuman primate striatum in vitro. *J Neurosci* 20:8209-17.

Cragg SJ, Nicholson C, Kume-Kick J, Tao L, Rice ME (2001) Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *J Neurophysiol* 85:1761-71.

Cuello AC, Iversen LL (1978) Interactions of dopamine with other neurotransmitters in the rat substantia nigra: A possible functional role of dendritic dopamine. In: Interactions between putative neurotransmitters in the brain (Gerattini S, Pujol JF, Samanin R, eds), pp 127-149. New York, USA: Raven Press.

D'Amato RJ, Lipman ZP, Snyder SH (1986) Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. *Science* 231:987-9.

Dahlstroem A, Fuxe K (1964a) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of stem neurons. *Acta Physiol Scand* 62:SUPPL 232:1-55.

Dahlstroem A, Fuxe K (1964b) A method for the demonstration of monoamine-containing nerve fibres in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 60:293-4.

Davis AF, Bai J, Fasshauer D, Wolowick MJ, Lewis JL, Chapman ER (1999) Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron* 24:363-76.

Descarries L, Beaudet A, Watkins KC (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100:563-88.

Descarries L, Bosler O, Berthelet F, Des Rosiers MH (1980) Dopaminergic nerve endings visualised by high-resolution autoradiography in adult rat neostriatum. *Nature* 284:620-2.

Descarries L, Mechawar N (2000) Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 125:27-47.

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

Dickinson SD, Sabeti J, Larson GA, Giardina K, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Gerhardt GA, Zahniser NR (1999) Dopamine D2 receptor-deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum. *J Neurochem* 72:148-56.

Duman JG, Singh G, Lee GY, Machen TE, Forte JG (2002) Ca^{2+} and Mg^{2+} /ATP independently trigger homotypic membrane fusion in gastric secretory membranes. *Traffic* 3:203-17.

Elverfors A, Jonason J, Jonason G, Nissbrandt H (1997) Effects of drugs interfering with sodium channels and calcium channels on the release of endogenous dopamine from superfused substantia nigra slices. *Synapse* 26:359-69.

Elverfors A, Nissbrandt H (1991) Reserpine-insensitive dopamine release in the substantia nigra? *Brain Res* 557:5-12.

Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* 22:3312-20.

Falkenburger BH, Barstow KL, Mintz IM (2001) Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293:2465-70.

Fallon JH, Moore RY (1978a) Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. *J Comp Neurol* 180:533-44.

Fallon JH, Moore RY (1978b) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV.

Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-80.

Feldmen RS, Meyer JS, Quenzer LF (1997) *Principles of Neuropharmacology*. Sunderland, USA: Sinauer Associates Inc.

Finlay JM, Zigmond MJ (1995) A critical analysis of neurochemical methods for monitoring transmitter dynamics in the brain. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress* (Bloom fE, Kupfer DJ, eds), pp 29-40. New York, USA: Raven Press Ltd.

Fischer JF, Cho AK (1979) Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. *J Pharmacol Exp Ther* 208:203-9.

Flores C, Rodaros D, Stewart J (1998) Long-lasting induction of astrocytic basic fibroblast growth factor by repeated injections of amphetamine: blockade by concurrent treatment with a glutamate antagonist. *J Neurosci* 18:9547-55.

Flores C, Samaha AN, Stewart J (2000a) Requirement of endogenous basic fibroblast growth factor for sensitization to amphetamine. *J Neurosci* 20:RC55.

Flores C, Stewart J (2000b) Basic fibroblast growth factor as a mediator of the effects of glutamate in the development of long-lasting sensitization to stimulant drugs: studies in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 151:152-65.

Garris PA, Wightman RM (1994) Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci*

14:442-50.

Geffen LB, Jessell TM, Cuello AC, Iversen LL (1976) Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260:258-60.

Gerfen CR, Baimbridge KG, Thibault J (1987a) The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems. *J Neurosci* 7:3935-44.

Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J (1987b) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* 7:3915-34.

Gerhardt GA, Cass WA, Yi A, Zhang Z, Gash DM (2002) Changes in somatodendritic but not terminal dopamine regulation in aged rhesus monkeys. *J Neurochem* 80:168-77.

German DC, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, Saper CB (1989) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann Neurol* 26:507-14.

German DC, Manaye KF (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol* 331:297-309.

Gibb WR, Lees AJ (1991) Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:388-96.

Giros B, el Mestikawy S, Bertrand L, Caron MG (1991) Cloning and functional

characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett* 295:149-54.

Grace AA (1990) Evidence for the functional compartmentalization of spike generating regions of rat midbrain dopamine neurons recorded in vitro. *Brain Res* 524:31-41.

Grace AA, Bunney BS (1995) Electrophysiological properties of midbrain dopamine neurons. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress* (Bloom FE, Kupfer DJ, eds), pp 163-177. New York, USA: Raven Press Ltd.

Graybiel AM, Flaherty AW, Gimenez-Amaya JM (1991) Striosomes and matrisomes. In: *The basal ganglia III* (Bernardi Geal, ed), pp 3-12. New York, USA: Plenum Press.

Graybiel AM, Moratalla R (1989) Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9020-4.

Groppetti A, Algeri S, Cattabeni F, Di Giulio AM, Galli CL, Ponzio F, Spano PF (1977) Changes in specific activity of dopamine metabolites as evidence of a multiple compartmentation of dopamine in striatal neurons. *J Neurochem* 28:193-7.

Groves PM (1980) Synaptic endings and their postsynaptic targets in neostriatum: synaptic specializations revealed from analysis of serial sections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6926-9.

Groves PM, Linder JC (1983) Dendro-dendritic synapses in substantia nigra: descriptions based on analysis of serial sections. *Exp Brain Res* 49:209-17.

Groves PM, Wilson CJ, Young SJ, Rebec GV (1975) Self-inhibition by dopaminergic neurons. *Science* 190:522-8.

Haber SN, Ryoo H, Cox C, Lu W (1995) Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 362:400-10.

Hajdu F, Hassler R, Bak IJ (1973) Electron microscopic study of the substantia nigra and the strio-nigral projection in the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 146:207-21.

Hallman H, Jonsson G (1984) Neurochemical studies on central dopamine neurons--regional characterization of dopamine turnover. *Med Biol* 62:198-209.

Hattori T, McGeer PL, McGeer EG (1979) Dendro axonic neurotransmission. II. Morphological sites for the synthesis, binding and release of neurotransmitters in dopaminergic dendrites in the substantia nigra and cholinergic dendrites in the neostriatum. *Brain Res* 170:71-83.

Hausser M, Stuart G, Racca C, Sakmann B (1995) Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 15:637-47.

Heeringa MJ, Abercrombie ED (1995) Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *J Neurochem* 65:192-200.

Herdon H, Strupish J, Nahorski SR (1985) Differences between the release of radiolabelled and endogenous dopamine from superfused rat brain slices: effects of depolarizing stimuli, amphetamine and synthesis inhibition. *Brain Res* 348:309-20.

Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-8.

Hoffman AF, Gerhardt GA (1998) In vivo electrochemical studies of dopamine clearance in the rat substantia nigra: effects of locally applied uptake inhibitors and unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *J Neurochem* 70:179-89.

Hoffman AF, Gerhardt GA (1999) Differences in pharmacological properties of dopamine release between the substantia nigra and striatum: an in vivo electrochemical study. *J Pharmacol Exp Ther* 289:455-63.

Holz RW, Coyle JT (1974) The effects of various salts, temperature, and the alkaloids veratridine and batrachotoxin on the uptake of [³H] dopamine into synaptosomes from rat striatum. *Molecular Pharmacology* 10:746-758.

Hurd YL, Pristupa ZB, Herman MM, Niznik HB, Kleinman JE (1994) The dopamine transporter and dopamine D2 receptor messenger RNAs are differentially expressed in limbic- and motor-related subpopulations of human mesencephalic neurons. *Neuroscience* 63:357-62.

Hurd YL, Ungerstedt U (1989) Influence of a carrier transport process on in vivo release and metabolism of dopamine: dependence on extracellular Na⁺. *Life Sci* 45:283-93.

Ibata Y, Nojyo Y, Matsuura T, Sano Y (1974) Letter: The effect of high dosage of 5-hydroxydopamine on the arcuate nucleus of the cat and its possible uptake by the catecholamine-containing neuronal soma. *J Electron Microsc (Tokyo)* 23:295-9.

Iribe Y, Moore K, Pang KC, Tepper JM (1999) Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 82:925-33.

Jaffe EH, Marty A, Schulte A, Chow RH (1998) Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J Neurosci* 18:3548-53.

Javoy F, Glowinski J (1971) Dynamic characteristic of the 'functional compartment' of dopamine in dopaminergic terminals of the rat striatum. *J Neurochem* 18:1305-11.

Jimenez-Castellanos J, Graybiel AM (1987) Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neuroscience* 23:223-42.

Kalivas PW, Bourdelais A, Abhold R, Abbott L (1989) Somatodendritic release of endogenous dopamine: in vivo dialysis in the A10 dopamine region. *Neurosci Lett* 100:215-20.

Kalivas PW, Duffy P (1991a) A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *J Neurochem* 56:961-7.

Kalivas PW, Stewart J (1991b) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16:223-44.

Kalivas PW, Weber B (1988) Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 245:1095-

102.

Karvar S, Yao X, Crothers JM Jr, Liu Y, Forte JG (2002) Localization and function of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-25 and vesicle-associated membrane protein-2 in functioning gastric parietal cells. *J Biol Chem* 277:50030-5.

Katz B (1969) The release of neural transmitter substances. Liverpool, UK: Liverpool University Press.

Kelly E, Jenner P, Marsden CD (1985) Evidence that. *J Neurochem* 45:137-44.

Khoshbouei H, Wang H, Lechleiter JD, Javitch JA, Galli A (2003) Amphetamine-induced dopamine efflux. A voltage-sensitive and intracellular Na⁺-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278:12070-7.

Kilty JE, Lorang D, Amara SG (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* 254:578-9.

Kim KT, Westhead EW (1989) Cellular responses to Ca²⁺ from extracellular and intracellular sources are different as shown by simultaneous measurements of cytosolic Ca²⁺ and secretion from bovine chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9881-5.

Koh TW, Bellen HJ (2003) Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 26:413-22.

Korf J, Zielesman M, Westerink BH (1976) Dopamine release in substantia nigra? *Nature* 260:257-8.

Krueger BK (1990) Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J Neurochem* 55:260-7.

Kuczenski R, Segal DS (1994) Neurochemistry of amphetamine. In: Amphetamine and its analogs (Cho AK, Segal DS, eds), pp 81-113. San Diego, USA: Academic Press inc.

Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol* 392:397-416.

Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J Neurosci* 22:8951-60.

Le Moal M, Simonnet G (1995) [Neurobiology of dependence]. *Rev Prat* 45:1351-8.

Leahey TH (1987) *A History of Psychology*. Englewood Cliffs, USA: Prentice-Hall inc.

Leviel V (2001) The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int* 38:83-106.

Leviel V, Gobert A, Guibert B (1989) Direct observation of dopamine compartmentation in striatal nerve terminal by 'in vivo' measurement of the specific activity of released dopamine. *Brain Res* 499:205-13.

Leviel V, Guibert B, Mallet J, Faucon-Biguet N (1991) Induction of tyrosine hydroxylase in the rat substantia nigra by local injection of forskolin. *J Neurosci Res* 30:427-32.

Leviel V, Olivier V, Guilbert B (1994) The role of calcium ions in dopamine synthesis and dopamine release. In: The basal ganglia IV (Percheron G, McKenzie JS, Féger J, eds), pp 403-409. New York, USA: Plenum Press.

Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S (1965) Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart . J Pharmacol Exp Ther 148:1-8.

Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RG, Brose N, Sudhof TC (1995) Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. Nature 375:594-9.

Llinas R, Greenfield SA, Jahnsen H (1984) Electrophysiology of pars compacta cells in the in vitro substantia nigra--a possible mechanism for dendritic release. Brain Res 294:127-32.

Lonart G, Zigmond MJ (1991) High glutamate concentrations evoke Ca⁺⁺-independent dopamine release from striatal slices: a possible role of reverse dopamine transport. J Pharmacol Exp Ther 256:1132-8.

Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, Leng G (2002) Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. Nature 418:85-9.

Maletic-Savatic M, Koothan T, Malinow R (1998a) Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part II: mediation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. J Neurosci 18:6814-21.

Maletic-Savatic M, Malinow R (1998b) Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured

hippocampal neurons. Part I: trans-Golgi network-derived organelles undergo regulated exocytosis. *J Neurosci* 18:6803-13.

Manaye KF, Sonsalla PK, Barnett G, Heikkila RE, Woodward DJ, Smith WK, German DC (1989) 1-Methyl-4-(2'-methylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (2'CH₃-MPTP)-induced degeneration of mesostriatal dopaminergic neurons in the mouse: biochemical and neuroanatomical studies. *Brain Res* 491:307-15.

Matuszewich L, Yamamoto BK (1999) Modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra. *Synapse* 32:29-36.

McMillen BA, German DC, Shore PA (1980) Functional and pharmacological significance of brain dopamine and norepinephrine storage pools. *Biochem Pharmacol* 29:3045-50.

Meiergerd SM, Patterson TA, Schenk JO (1993) D₂ receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J Neurochem* 61:764-7.

Melikian HE, Buckley KM (1999) Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter. *J Neurosci* 19:7699-710.

Mercer L, del Fiacco M, Cuello AC (1979) The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurones. *Experientia* 35:101-3.

Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AI, Caron MG (1999) Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci* 20:424-9.

Miller HH, Shore PA, Clarke DE (1980) In vivo monoamine oxidase inhibition by d-amphetamine. *Biochem Pharmacol* 29:1347-54.

Mintz I, Hammond C, Guibert B, Leviel V (1986) Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra. *Brain Res* 376:406-8.

Miyazaki T, Lacey MG (1998) Presynaptic inhibition by dopamine of a discrete component of GABA release in rat substantia nigra pars reticulata. *J Physiol* 513 (Pt 3):805-17.

Moghaddam B, Gruen RJ, Roth RH, Bunney BS, Adams RN (1990) Effect of L-glutamate on the release of striatal dopamine: in vivo dialysis and electrochemical studies. *Brain Res* 518:55-60.

Moron JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22:389-95.

Mosharov EV, Gong LW, Khanna B, Sulzer D, Lindau M (2003) Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *J Neurosci* 23:5835-45.

Nass R, Blakely RD (2003) The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:521-44.

Nedergaard S, Bolam JP, Greenfield SA (1988) Facilitation of a dendritic calcium conductance by 5-hydroxytryptamine in the substantia nigra. *Nature* 333:174-7.

Nedergaard S, Webb C, Greenfield SA (1989) A possible ionic basis for dendritic release of dopamine in the guinea-pig substantia nigra. *Acta Physiol Scand* 135:67-8.

Neering IR, McBurney RN (1984) Role for microsomal Ca storage in mammalian neurones? *Nature* 309:158-60.

Nieoullon A, Cheramy A, Glowinski J (1977) Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. *Nature* 266:375-7.

Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, Edwards RH, Pickel VM (1996a) Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J Neurosci* 16:4135-45.

Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM (1996b) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 16:436-47.

Nissbrandt H, Carlsson A (1987) Turnover of dopamine and dopamine metabolites in rat brain: comparison between striatum and substantia nigra. *J Neurochem* 49:959-67.

Nissbrandt H, Pileblad E, Carlsson A (1985) Evidence for dopamine release and metabolism beyond the control of nerve impulses and dopamine receptors in rat substantia nigra. *J Pharm Pharmacol* 37:884-9.

Paden C, Wilson CJ, Groves PM (1976) Amphetamine-induced release of dopamine from the substantia nigra in vitro. *Life Sci* 19:1499-506.

Parent A, Lavoie B (1993) The heterogeneity of the mesostriatal dopaminergic system as

revealed in normal and parkinsonian monkeys. *Adv Neurol* 60:25-33.

Parizek J, Hassler R, Bak IJ (1971) Light and electron microscopic autoradiography of substantia nigra of rat after intraventricular administration of tritium labelled norepinephrine, dopamine, serotonin and the precursors. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 115:137-48.

Peng Y (1996) Ryanodine-sensitive component of calcium transients evoked by nerve firing at presynaptic nerve terminals. *J Neurosci* 16:6703-12.

Philippu A, Beyer J (1973) Dopamine and noradrenaline transport into subcellular vesicles of the striatum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 278:387-402.

Pletscher A, da Prada M, Steffen H, Lutold B, Berneis KH (1973) Mechanisms of catecholamine accumulation in adrenal chromaffin granules. *Brain Res* 62:317-26.

Prekeris R, Foletti DL, Scheller RH (1999) Dynamics of tubulovesicular recycling endosomes in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:10324-37.

Pristupa ZB, McConkey F, Liu F, Man HY, Lee FJ, Wang YT, Niznik HB (1998) Protein kinase-mediated bidirectional trafficking and functional regulation of the human dopamine transporter. *Synapse* 30:79-87.

Ralston HJ 3rd (1971) Evidence for presynaptic dendrites and a proposal for their mechanism of action. *Nature* 230:585-7.

Reubi JC, Sandri C (1979) Ultrastructural observations on intercellular contacts of nigral dendrites. *Neurosci Lett* 13:183-8.

Rice ME, Cragg SJ, Greenfield SA (1997) Characteristics of electrically evoked somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *J Neurophysiol* 77:853-62.

Robertson GS, Damsma G, Fibiger HC (1991) Characterization of dopamine release in the substantia nigra by in vivo microdialysis in freely moving rats. *J Neurosci* 11:2209-16.

Robinson TE, Becker JB (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396:157-98.

Roitman MF, Stuber GD, Phillips PE, Wightman RM, Carelli RM (2004) Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *J Neurosci* 24:1265-71.

Ross SB, Renyi AL (1964) Blocking action of sympathomimetic amines on the uptake of tritiated noradrenaline by mouse cerebral cortex tissues in vitro. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 21:226-39.

Roth RH, Elsworth JD (1995) Biochemical pharmacology of midbrain dopamine neurons. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress* (Bloom FE, Kupfer DJ, eds), pp 227-243. New York, USA: Raven Press Ltd.

Rouge-Pont F, Abrous DN, Le Moal M, Piazza PV (1999) Release of endogenous dopamine in cultured mesencephalic neurons: influence of dopaminergic agonists and glucocorticoid antagonists. *Eur J Neurosci* 11:2343-50.

Sachs C, Jonsson G (1975) Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem*

Pharmacol 24:1-8.

Sacks O (1996) *Un anthropologue sur Mars*. Paris, France: Editions du Seuil.

Santiago M, Machado A, Cano J (1992) Fast sodium channel dependency of the somatodendritic release of dopamine in the rat's brain. *Neurosci Lett* 148:145-7.

Schmitz Y, Benoit-Marand M, Gonon F, Sulzer D (2003) Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *J Neurochem* 87:273-89.

Schoemaker H, Nickolson VJ (1983) Dopamine uptake by rat striatal synaptosomes: a compartmental analysis. *J Neurochem* 41:684-90.

Schultz W, Apicella P, Ljungberg T (1993) Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci* 13:900-13.

Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275:1593-9.

Schultz W, Dickinson A (2000) Neuronal coding of prediction errors. *Annu Rev Neurosci* 23:473-500.

Sesack SR, Aoki C, Pickel VM (1994) Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci* 14:88-106.

Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G

(1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254:576-8.

Sitges M, Reyes A, Chiu LM (1994) Dopamine transporter mediated release of dopamine: role of chloride. *J Neurosci Res* 39:11-22.

Smith Y, Kieval JZ (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 23:S28-33.

Stein WD (1967) In: *The movement of molecules across cell membranes* pp 177-206. New York, USA: Academic Press.

Sulzer D, Rayport S (1990) Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action. *Neuron* 5:797-808.

Tennyson VM, Heikkila R, Mytilineou C, Cote L, Cohen G (1974) 5-Hydroxydopamine 'tagged' neuronal boutons in rabbit neostriatum: interrelationship between vesicles and axonal membrane. *Brain Res* 82:341-8.

Thomas DM, Ferguson GD, Herschman HR, Elferink LA (1999) Functional and biochemical analysis of the C2 domains of synaptotagmin IV. *Mol Biol Cell* 10:2285-95.

Tiffany ST (1990) A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. *Psychol Rev* 97:147-68.

Tranzer JP (1972) A new amine storing compartment in adrenergic axons. *Nat New Biol* 237:57-8.

- Tranzer JP, Thoenen H (1967) Electronmicroscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new 'false' sympathetic transmitter. *Experientia* 23:743-5.
- Uchida J, Kiuchi Y, Ohno M, Yura A, Oguchi K (1998) Ca(2+)-dependent enhancement of. *Brain Res* 809:155-64.
- Uchikawa T, Kiuchi Y, Yura A, Nakachi N, Yamazaki Y, Yokomizo C, Oguchi K (1995) Ca(2+)-dependent enhancement of. *J Neurochem* 65:2065-71.
- Ulbricht W (1969) The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb Physiol* 61:18-71.
- Ungerstedt U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:1-48.
- Usdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11168-71.
- Vezina P, Stewart J (1990) Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. *Brain Res* 516:99-106.
- Waelti P, Dickinson A, Schultz W (2001) Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature* 412:43-8.
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2001) Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-

core vesicles. *Science* 294:1111-5.

Wang CT, Lu JC, Bai J, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2003) Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* 424:943-7.

Wassef M, Berod A, Sotelo C (1981) Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration. *Neuroscience* 6:2125-39.

Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92:759-72.

Westerink BH, de Boer P, Santiago M, De Vries JB (1994) Do nerve terminals and cell bodies of nigrostriatal dopaminergic neurons of the rat contain similar receptors? *Neurosci Lett* 167:109-12.

Westerink BH, De Vries JB (1988) Characterization of in vivo dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantations: methodological aspects. *J Neurochem* 51:683-7.

Wilson CJ, Groves PM, Fifkova E (1977) Monoaminergic synapses, including dendro-dendritic synapses in the rat substantia nigra. *Exp Brain Res* 30:161-74.

Wong DT, van Frank RM, Horng JS, Fuller RW (1972) Accumulation of amphetamine and p-chloroamphetamine into synaptosomes of rat brain. *J Pharm Pharmacol* 24:171-3.

Yung KK, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI (1995)

Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65:709-30.

