

2111.3445.6

Université de Montréal

Étude du mécanisme d'inhibition de la libération de dopamine par les autorécepteurs D2

par
Philippe Martel

Département de Pharmacologie
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 Pharmacologie

Août 2006

© Philippe Martel, 2006



W

4

U58

2006

V.138

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 d'inhibition de la libération de
dopamine par les autorécepteurs D2**

présenté par :

Philippe Martel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Beaulieu
président-rapporteur

Dr Louis-Éric Trudeau
directeur de recherche

Dr Richard Robitaille
membre du jury

RÉSUMÉ

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur qui joue un rôle primordial dans la régulation des émotions et du contrôle moteur. La DA est impliquée dans plusieurs pathologies comme la schizophrénie et la maladie de Parkinson. La libération de DA est contrôlée par des autorécepteurs de type D_2 localisés sur les terminaisons axonales. Ce mécanisme demeure incompris. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé une approche de voltamétrie cyclique par fibre de carbone afin de mesurer en temps réel la libération axonale de DA dans des coupes de striatum de rats, une structure cérébrale recevant une forte innervation dopaminergique. Nos résultats ont montré que le quinpirole, un agoniste des récepteurs D_2 , cause une inhibition de la libération de DA. À l'aide d'un antagoniste à large spectre des canaux potassiques dépendants du voltage, la 4-aminopyridine, nous avons démontré que l'autorécepteur D_2 peut activer des canaux potassiques de type K_v . En utilisant plusieurs bloqueurs spécifiques pour les sous-unités des canaux K_v , nous avons confirmé l'implication des sous-unités $K_v1.1$, 1.2, 1.3 et/ou 1.6, tout en éliminant une contribution des sous-unités $K_v4.2$. À l'aide de bloqueurs spécifiques pour les canaux calciques, nous avons montré qu'une partie du mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 implique également l'inhibition des canaux calciques de type N, mais pas des canaux de type P/Q et L. En résumé, nous proposons un mécanisme d'action double par lequel l'autorécepteur D_2 peut agir. Cette dualité est parfaitement adaptée afin de produire une inhibition rapide de la libération de DA aux terminaisons axonales dopaminergiques.

Mots-clés : Canaux potassiques, canaux calciques, dopamine, récepteur D_2 , présynaptique, voltamétrie cyclique, striatum

ABSTRACT

Dopamine (DA) is an important neurotransmitter implicated in motivated behaviors and motor control. It is also well known to be implicated in several diseases like schizophrenia and Parkinson's disease. DA release is tightly regulated through the activation of presynaptic D₂ autoreceptors located on axon terminals. The mechanism responsible for this fast regulation of DA exocytosis in the brain is currently unknown. Here, we used fast-scan cyclic voltammetry to study electrically-evoked DA release in rat dorsal striatal brain slices, which contain a high density of dopaminergic terminals. Initial results demonstrated that quinpirole, a D₂ receptor agonist, inhibits DA release. Thereafter, using a pharmacological approach, we characterized this phenomenon. We found that 4-aminopyridine, a broad-spectrum blocker of K_v potassium channels, strongly reduced the ability of quinpirole to inhibit evoked DA overflow. K_v subtype-selective blockers confirmed the implication of K_v1.3 together with K_v1.1 and/or 1.2 and/or 1.6, but not K_v4.2. In addition to potassium channel regulation, voltage-gated calcium channel inhibition could also contribute to D₂ autoreceptor action. In accordance with this, we found that the ability of quinpirole to inhibit electrically-evoked DA overflow is increased after partial blockade of N-type, but not P/Q-type calcium channels. In summary, our work shows that D₂ autoreceptors activate two complementary mechanisms to inhibit calcium-dependent exocytosis of DA from axon terminals. Such a dual mechanism is ideally suited to rapidly shut down DA release.

Keywords: Potassium channels, calcium channels, dopamine, D₂ receptor, presynaptic, cyclic voltammetry, striatum

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
DÉDICACE.....	XIII
REMERCIEMENTS.....	XIV
AVANT-PROPOS	XV
INTRODUCTION.....	1
1. Le système dopaminergique (anatomie macroscopique).....	6
1.1 Les voies dopaminergiques centrales	6
<i>1.1.1 La voie nigrostriée.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2 Les voies mésolimbique et mésocorticale.....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.3 Les autres systèmes dopaminergiques.....</i>	<i>12</i>
1.2 Symptomatologie des pathologies reliées à la dopamine	16

2. Le système dopaminergique (anatomie moléculaire)	22
2.1 La dopamine	22
2.2 Métabolisme de la dopamine.....	24
2.2.1 <i>Synthèse enzymatique de la dopamine</i>	24
2.2.2 <i>Catabolisme enzymatique de la dopamine</i>	27
2.3 La terminaison dopaminergique	30
2.3.1 <i>Synthèse et stockage de la dopamine</i>	30
2.3.2 <i>Libération de dopamine</i>	31
2.3.3 <i>Élimination extracellulaire de la dopamine</i>	34
2.4 Neurotransmission de la dopamine	36
2.4.1 <i>Concept de transmission volumétrique</i>	37
2.4.2 <i>Implications de la transmission volumétrique</i>	41
2.5 Récepteurs de la dopamine	43
2.5.1 <i>Les récepteurs de la famille D1</i>	47
2.5.2 <i>Les récepteurs de la famille D2</i>	48
2.5.3 <i>Localisation des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau</i>	50
3. L'autorécepteur D2	53
3.1 Rôles de l'autorécepteur D2	53
3.2 Voies de signalisation intracellulaire.....	56
3.3 Mécanisme d'action de l'autorécepteur D2.....	58
3.3.1 <i>Les canaux calciques</i>	60
3.3.2 <i>Les canaux potassiques</i>	63
3.3.3 <i>La machinerie d'exocytose vésiculaire</i>	74

4. Données récentes et objectifs de l'étude.....	76
MÉTHODOLOGIE	79
5. Les techniques électrochimiques	80
5.1 Utilité des techniques électrochimiques	81
5.2 Principes théoriques.....	85
5.3 L'ampérométrie	91
5.4 La voltamétrie cyclique	92
ARTICLE	94
PAGE TITRE ET ACKNOWLEDGEMENTS	95
CONTRIBUTION DES COAUTEURS	96
ACCORD DES COAUTEURS.....	97
ABSTRACT	98
INTRODUCTION	99
MATERIALS AND METHODS.....	101
RESULTS.....	104
DISCUSSION.....	111
REFERENCES.....	116
FIGURE LEGENDS	128
FIGURES	134

DISCUSSION.....	140
6. Considérations méthodologiques	141
6.1 Dosage de la dopamine.....	142
6.1.1 <i>Techniques diverses</i>	142
6.1.2 <i>Techniques électrochimiques</i>	144
6.2 Libération terminale de dopamine dans le striatum	147
6.2.1 <i>Identification de la substance oxydable</i>	147
6.2.2 <i>Considérations physiologiques et pharmacologiques</i>	150
7. Mécanisme d'action de l'autorécepteur D2	158
7.1 Canaux potassiques dépendants du voltage.....	159
7.2 Canaux potassiques à rectification entrante	165
7.3 Canaux calciques dépendants du voltage	168
7.4 Mécanismes intracellulaires de régulation	175
7.5 Exocytose vésiculaire	178
8. Conclusion	180
BIBLIOGRAPHIE	182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I

Outils pharmacologiques utilisés dans l'étude du système dopaminergique..... 45

Tableau II

Sous-unités des canaux potassiques dépendants du voltage..... 65

Tableau III

Sous-unités des canaux potassiques de fuite..... 69

Tableau IV

Sous-unités des canaux potassiques à rectification entrante..... 71

Tableau V

Profils d'oxydo-réduction des monoamines..... 88

Tableau VI

Spectre d'action des différents antagonistes utilisés..... 155

LISTE DES FIGURES

FIGURES DU MÉMOIRE DE MAÎTRISE

Figure 1	Anatomie simplifiée des voies dopaminergiques centrales chez le rat.....	8
Figure 2	Interconnexions entre les noyaux dopaminergiques mésencéphaliques.....	14
Figure 3	Structures chimiques des monoamines.....	21
Figure 4	Biosynthèse des catécholamines.....	23
Figure 5	Voies cataboliques de la dopamine.....	26
Figure 6	La terminaison dopaminergique.....	29
Figure 7	Schématisation du récepteur D _{2S} humain.....	52
Figure 8	Diversité moléculaire des canaux calciques.....	59
Figure 9	Diversité moléculaire des canaux potassiques.....	62
Figure 10	Protéines impliquées dans l'exocytose vésiculaire.....	73
Figure 11	Voltamétrie cyclique sur coupe de striatum de rat.....	83
Figure 12	Schématisation d'une électrode d'enregistrement.....	84
Figure 13	L'oxydo-réduction de la dopamine.....	87
Figure 14	Interférence de la vitamine C avec l'oxydation de la dopamine.....	146
Figure 15	Représentation schématique des résultats obtenus.....	157
Figure 16	Méta-analyse sur la dépendance calcique de la libération striatale de DA en fonction de l'âge chez le rat.....	170

LISTE DES FIGURES (SUITE)

FIGURES DE L'ARTICLE

Figure 1	Dose-dependent inhibition of dopamine overflow by quinpirole.....	134
Figure 2	Effect of K _V channel blockers on evoked DA overflow.....	135
Figure 3	Implication of Kv1 channels in D2-mediated inhibition of DA release.....	136
Figure 4	Lack of implication of GIRK and K _{ATP} channels in D2-mediated inhibition of DA release.....	137
Figure 5	Electrically-evoked DA overflow requires N-type calcium channels.....	138
Figure 6	Implication of N-type Ca ²⁺ channels in D2-mediated inhibition of DA release.....	139

N.B. Afin d'éviter toute confusion entre les figures 1 à 6 du mémoire et les figures 1 à 6 de l'article, nous utilisons la méthode suivante. Dans le texte du mémoire de maîtrise, lorsque nous voulons faire une référence à une figure de l'article, nous le mentionnons clairement (par exemple : «voir figure 1 de l'article»). L'article ne fait référence qu'aux figures présentes dans l'article.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[DA]	Concentration de dopamine
3-MT	3-Méthoxytyramine
4-AP	4-Aminopyridine
Ag/AgCl	Électrode de référence (argent recouvert d'une gaine de chlore)
AHP	Phase d'hyperpolarisation suivant un potentiel d'action
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATV	Aire tegmentaire ventrale
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
Courants A	Courants potassiques transitoires sortants
D _{2L}	Isoforme long du récepteur D ₂
D _{2S}	Isoforme court du récepteur D ₂
DA	Dopamine
DAG	Diacylglycérol
DAT	Transporteur membranaire de la dopamine
DHPA	3,4-Dihydroxyphénylacétaldéhyde
DOPAC	Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
GIRK	Canal potassique à rectification entrante
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HVA	<i>High voltage activated</i>
IP ₃	Inositol triphosphates
IUPHAR	Union Internationale de Pharmacologie
K _{2P}	Canaux potassiques de fuite
K _{ATP}	Canaux potassiques sensibles aux niveaux d'ATP
K _{Ca}	Canaux potassiques activés par le calcium
K _{ir}	Canaux potassiques à rectification entrante
K _v	Canaux potassiques dépendants du voltage
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LVA	<i>Low voltage activated</i>
MAO	Monoamine oxydase
MFB	Faisceau médian télencéphalique
MHPA	3-Méthoxy-4-hydroxyphénylacétaldéhyde
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
Protéines G	<i>Guanine nucleotide binding proteins</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SN	Substance noire
SNC	Substance noire pars compacta
TH	Tyrosine hydroxylase
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines

À mes grands-parents

Wilfrid Martel (1899-1975)

et

Cécile Leclerc (1911-1984)

Simone Bouvier (1913-2005)

et

Émilien Chabot (1913-1998)

REMERCIEMENTS

Entreprendre une maîtrise exige énormément de volonté et d'organisation. À ce sujet, j'aimerais remercier mon directeur de maîtrise, Dr Louis-Éric Trudeau, pour son aide, sa constante disponibilité ainsi que son support rigoureux tout au long de ce projet. Je voudrais aussi remercier Dr François Michel qui m'a supervisé lors de mon premier contact avec la recherche à l'été 2002. Je voudrais aussi remercier Marie-Josée Bourque, une technicienne hors-pair, qui a su m'inculquer la rigueur et le questionnement que tout scientifique doit posséder afin d'obtenir des résultats solides et de qualité. J'aimerais remercier tous les étudiants du laboratoire Trudeau. L'ambiance joyeuse ainsi que leur disponibilité font en sorte que nous pouvons bénéficier d'un climat propice à l'apprentissage et à l'entraide. J'aimerais finalement remercier tout particulièrement mon entourage immédiat : mes parents, Daniel Martel et Ginette Chabot, mon frère, Bruno Martel ainsi que ma conjointe, Mélanie Villeneuve. Ces derniers ont fait preuve de support et m'ont donné de nombreux encouragements tout au long de mes études universitaires.

AVANT-PROPOS

Tout au long de ma formation universitaire, j'ai eu la chance de me familiariser au monde de la recherche fondamentale par l'entremise de ma maîtrise en pharmacologie et au monde de la clinique par l'entremise de mes études médicales. J'ai souvent été surpris par la dichotomie qui existe entre ces deux domaines qui m'apparaissent pourtant complémentaires. Avant de comprendre la complexité des pathologies et de maîtriser la symptomatologie médicale, il faut selon moi saisir la complexité et la diversité des phénomènes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces pathologies. La connaissance pointue du système dopaminergique, le sujet du présent mémoire, m'a permis de percevoir d'une façon différente les patients atteints des pathologies reliées à ce système. Inversement, pour saisir toute l'importance des travaux en recherche fondamentale, il faut être minimalement familiarisé à la présentation clinique des pathologies et à la souffrance qui les accompagne. Sans cette connaissance, on peut rapidement perdre cette vision globale et rester confiné à une perception restreinte du travail de laboratoire. À mon avis, nos travaux en recherche fondamentale se veulent ultimement un travail à portée humanitaire. Ces travaux ont d'ailleurs pour mission la meilleure compréhension des phénomènes reliés à la vie humaine et aux dysfonctionnements pathologiques qui, plus souvent qu'autrement, engendrent malheur, souffrance et perte de la qualité de vie.

INTRODUCTION

Le cerveau n'a pas toujours été considéré comme le siège de la pensée humaine. Les Égyptiens (2500 avant J.-C.) croyaient que le cœur était l'organe le plus important du corps humain et considéraient le cerveau comme un organe plutôt inutile. D'ailleurs, lors du processus de momification, les Égyptiens ne conservaient pas le cerveau alors qu'ils conservaient plusieurs autres organes (Henry et Lorrain, 1990). Les Grecs étaient plus mitigés face à la fonction du cerveau. Hippocrate (460-379 avant J.-C.) soutenait que le cerveau était le siège des fonctions sensibles et de l'intelligence, tandis qu'Aristote (384-322 avant J.-C.) pensait que le cœur était l'organe qui contrôlait toutes ces fonctions.

Depuis, les études anatomophysiologiques portant sur le cerveau n'ont cessé de foisonner et notre compréhension actuelle du cerveau se base sur deux principes fondamentaux : la localisation anatomique des diverses fonctions cérébrales et l'existence d'une unité cellulaire de base qui est le neurone (Glickstein, 2006). Vers la fin du XIX^{ème} siècle, les preuves établissant la localisation anatomique des diverses fonctions cérébrales commençaient à s'accumuler. Citons en exemple Fritsch et Hitzig qui montrèrent, en 1870, qu'une stimulation du cerveau pouvait entraîner des mouvements de pattes chez le chien (Fritsch et Hitzig, 1960). En 1906, Camillo Golgi et Santiago Ramón y Cajal se partagèrent le prix Nobel de médecine et physiologie pour leurs travaux respectifs sur le fonctionnement des neurones. Grâce à sa méthode, Golgi présenta les premières images de neurones (Golgi, 1885), tandis que Cajal réfuta la théorie d'un réseau neuronal réticulé¹ (Cajal, 1899). Il était dès lors sous-entendu que les neurones pouvaient communiquer

¹ À l'époque, on croyait que les prolongements neuronaux étaient fusionnés, donnant ainsi naissance à un réseau neuronal continu, qu'on comparait souvent au système sanguin.

entres eux via des structures spécialisées, que Charles Sherrington nomma synapse en 1897 (consulter Bennett, 1999 pour une perspective historique).

En 1921, Otto Loewi montra qu'une substance chimique (l'acétylcholine) pouvait être libérée par le nerf vague (Loewi, 1921). Ces observations permirent de comprendre que la communication entre neurones pouvait s'effectuer via des substances chimiques, les neurotransmetteurs. La présence de catécholamines¹ dans le système nerveux fut proposée pour la toute première fois en 1921 lorsqu'on réussit à trouver de la noradrénaline à l'intérieur du système nerveux autonome (Cannon et Uridil, 1921). Quelque trente années plus tard, on retrouva cette même molécule à l'intérieur du cerveau (Holtz, 1950), mais il fallut attendre les travaux de Marthe Vogt, en 1954, pour qu'on comprenne que les catécholamines pouvaient bel et bien jouer le rôle de neurotransmetteurs (Vogt, 1954). À cette époque, le Dr Karl Felix Hermann Blaschko s'intéressait grandement aux catécholamines et à leur métabolisme (Blaschko et al., 1937; Bhagvat et al., 1939; Blaschko, 1952, 1954). Lorsqu'il s'intéressa à l'action de la L-DOPA décarboxylase, une enzyme importante dans la biosynthèse des catécholamines, il réussit à prédire que la noradrénaline et l'adrénaline provenaient toutes deux de la dopamine (hydroxytyramine) (Blaschko, 1939). Voici ce qu'on pouvait lire au sujet des catécholamines chez les vertébrés dans les années 1950: «*Three sympathicomimetic amines have so far been found: adrenaline, noradrenaline and hydroxytyramine. Only the first two are known to act as hormone and mediator; for hydroxytyramine no similar function has hitherto been established.* » (Blaschko, 1952).

¹ La dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline sont trois neurotransmetteurs qui font partie de la classe des catécholamines.

Durant toute la première moitié du XX^{ème} siècle, on considérait la dopamine comme une simple étape dans la biosynthèse des catécholamines. Il fallut patienter jusqu'à la fin des années 1950, lorsque le Dr Arvid Carlsson, lauréat du prix Nobel en médecine et physiologie de 2000, étudia la distribution des catécholamines dans le cerveau. Il montra que les niveaux de dopamine étaient très élevés dans une région où la noradrénaline l'était très peu, soit le striatum de chien. Logiquement parlant, la dopamine devait posséder d'autres fonctions que celle de précurseur métabolique (Carlsson, 1959). La dopamine fut dès lors considérée comme un neurotransmetteur à part entière. Cette simple notion ouvrit la porte à plusieurs découvertes historiques importantes. Carlsson et ses collaborateurs montrèrent qu'un précurseur métabolique de la dopamine, la L-DOPA, était capable d'améliorer des symptômes de type Parkinsonien dans un modèle animal de cette maladie (lapins traités à la réserpine) (Carlsson et al., 1957). Une dizaine d'années plus tard, le Dr Oliver Sacks utilisa ce concept pour traiter ses patients humains atteints de la maladie. Il relate dans son livre *«Awakenings»*, un éveil presque instantané à partir d'un état d'immobilité permanente dont souffraient les patients atteints de la maladie de Parkinson (Sacks, 1973). Depuis, la recherche sur la dopamine ne cesse d'avancer ; on retrouve plus de 19 000 articles publiés à ce sujet depuis les cinq dernières années sur la base de données *Pubmed*.

On sait aujourd'hui que la dopamine est un neurotransmetteur présent dans le cerveau des mammifères et qu'elle est sécrétée par les neurones dopaminergiques. La dopamine est essentielle à la régulation de l'activité motrice, de la cognition, des émotions, des renforcements positifs, de la motivation, de la faim et de la douleur (Missale et al.,

1998; Cragg et Rice, 2004; Hagelberg et al., 2004). En dehors du système nerveux, la dopamine joue aussi un rôle dans la régulation de l'activité cardio-vasculaire, de la fonction rénale et de la motilité intestinale (Missale et al., 1998). Dans ce mémoire, une attention particulière sera portée à la dopamine contenue dans le système nerveux central.

Les neurones dopaminergiques sont modulés par des autorécepteurs (Farnebo et Hamberger, 1971). L'objectif principal de nos travaux était l'élucidation du mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂. Ce récepteur possède une activité inhibitrice et module négativement le fonctionnement des neurones dopaminergiques. Il serait fort utile de revoir tout d'abord en détail le système dopaminergique du système nerveux central. Comme son nom l'indique, ce système regroupe tous les neurones dopaminergiques sécrétant la dopamine dans le cerveau. Afin de donner une vue générale de ce système, nous allons nous attarder sur son anatomie macroscopique, c'est-à-dire les voies dopaminergiques en tant que telles. Nous en profiterons pour glisser un mot sur les pathologies associées à la dopamine. Par la suite, nous nous attarderons sur l'anatomie microscopique du système dopaminergique, c'est-à-dire la molécule de dopamine, ses rôles, son métabolisme et ses différents récepteurs (dont fait partie l'autorécepteur D₂). Finalement, nous entrerons dans le vif du sujet, c'est-à-dire une recension de la littérature sur le fonctionnement de l'autorécepteur D₂.

1. Le système dopaminergique (anatomie macroscopique)

1.1 Les voies dopaminergiques centrales

Les neurones dopaminergiques ont une organisation bien spéciale à l'intérieur du système nerveux central. Ils sont regroupés en divers îlots tels que la substance noire pars compacta (SNc) et l'aire tegmentaire ventrale (ATV). Les voies dopaminergiques centrales sont constituées de ces îlots et de leurs projections qui rejoignent plusieurs structures cérébrales lointaines. Les voies dopaminergiques remplissent plusieurs fonctions importantes, mais elles sont aussi impliquées dans diverses pathologies lorsqu'elles sont dérégées. Dans ce travail, nous avons utilisé le rat comme modèle expérimental et c'est pourquoi nous allons limiter notre étude aux voies dopaminergiques centrales de cet animal.

À l'aide de la méthode Falck-Hillarp, une technique histochimique permettant la visualisation en fluorescence de la dopamine (DA) et des autres catécholamines, Dahlström et Fuxe furent les premiers à étudier la localisation anatomique des neurones dopaminergiques (Dahlström et Fuxe, 1964a, b). Depuis, les méthodes immunohistochimiques employant des anticorps spécifiques contre la DA et ses enzymes de synthèse ont permis de raffiner et de compléter l'étude du système dopaminergique (Hökfelt et al., 1976; Geffard et al., 1984; Hökfelt et al., 1984; Decavel et al., 1987a; Decavel et al., 1987b). Selon la nomenclature créée dans les années soixante par Dahlström et Fuxe, on désigne les groupes cellulaires dopaminergiques avec les lettres et chiffres A8 à

A18. Les groupes A8 à A10 sont localisés dans le mésencéphale et les groupes A11 à A14 dans le diencephale. Pour leur part, les groupes A15 et A16 sont situés dans le système olfactif et les groupes A17 et A18 dans le système visuel (Ljungdahl et al., 1977; Kolb et Nelson, 1981; Hida et al., 1999). À titre informatif, les groupes A1 à A7 sont noradrénergiques, les groupes dénommés par la lettre B sont sérotoninergiques et les groupes dénommés par la lettre C sont adrénérgiques (Feldman et al., 1997).

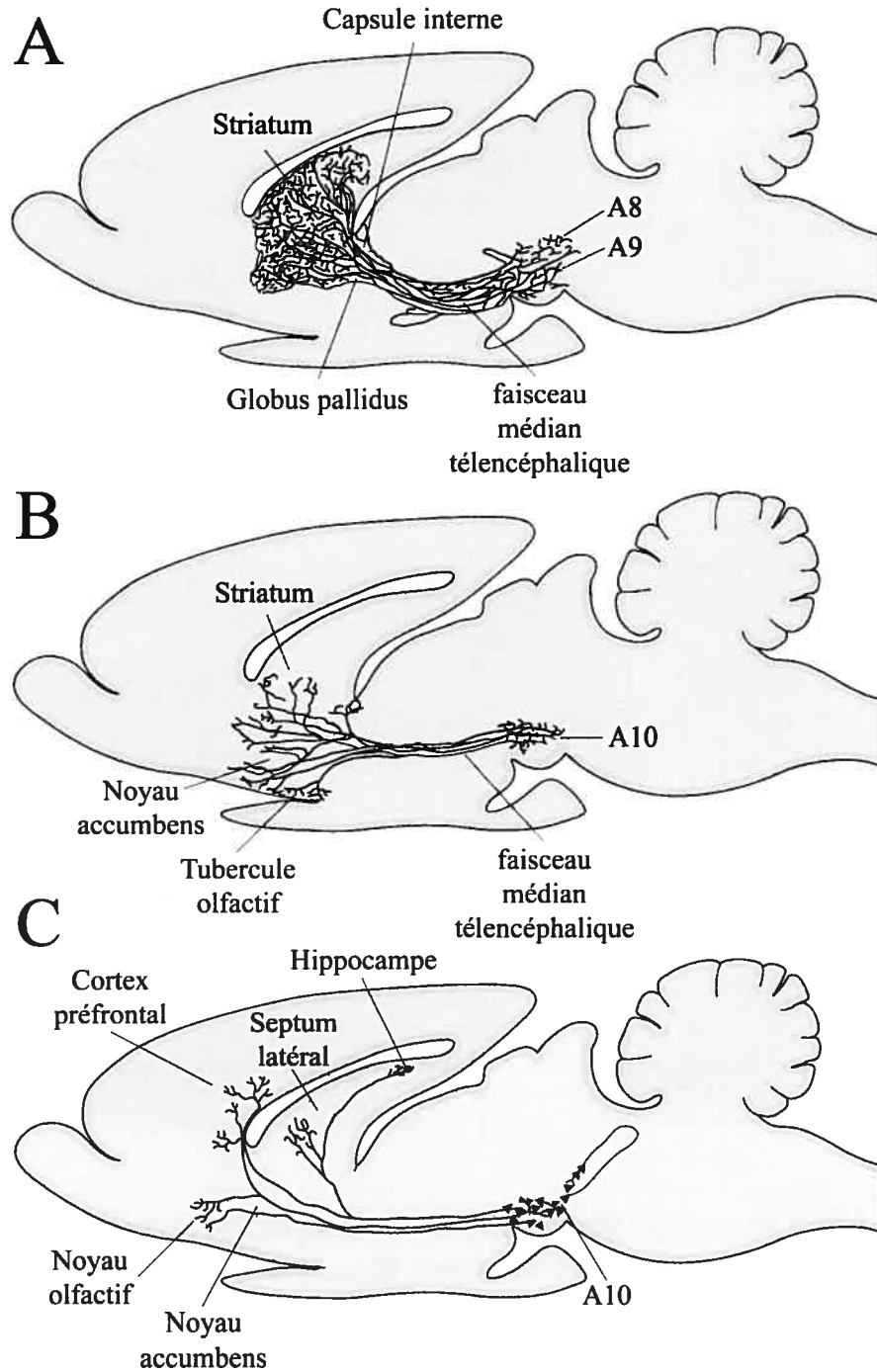


Figure 1 : Anatomie simplifiée des voies dopaminergiques centrales chez le rat (Adapté de Feldman et al., 1997). **(A)** La voie nigrostriée provient des noyaux A8 et A9. **(B)** La voie mésolimbique provient du noyau A10. **(C)** La voie mésocorticale provient du noyau A10.

Comme la figure de la page précédente le montre, les études anatomiques décrites plus haut ont permis d'identifier plusieurs voies dopaminergiques distinctes. Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques sont regroupés majoritairement dans les parties plus caudales du cerveau, comme le mésencéphale. Les voies dopaminergiques que nous décrirons sont les suivantes : la voie nigrostriée, la voie mésolimbique et la voie mésocorticale. Ces voies proviennent toutes d'un ou plusieurs noyaux de neurones dopaminergiques (A8 à A10, soit respectivement le noyau rétrosubstantiel, la SNc et l'ATV). La voie nigrostriée est aussi appelée «système mésostrié dorsal», tandis que la voie mésolimbique arbore parfois l'appellation de «système mésostrié ventral». Ces deux voies forment le système mésostrié. Nous préférons toutefois les appellations «voie nigrostriée» et «voie mésolimbique» pour la suite de ce travail. Les noyaux A8 à A10 comportent quelques 44 000 neurones dopaminergiques chez le rat (German et Manaye, 1993). En comparaison, le cerveau sain d'un humain adulte peut compter jusqu'à un million de neurones dopaminergiques (Feldman et al., 1997).

1.1.1 La voie nigrostriée

La voie nigrostriée a pour origine les groupes cellulaires contenus dans les noyaux A8 et A9, soit respectivement le noyau rétrosubstantiel et la SNc (voir figure 1A). Ces deux noyaux se projettent via le faisceau médian télencéphalique (MFB¹) jusqu'aux ganglions de la base, soit les noyaux caudé-putamen et le globus pallidus. Ces projections

¹ Pour *medial forebrain bundle* en anglais

dopaminergiques innervent majoritairement des neurones GABAergiques dans le striatum, qu'on appelle *medium spiny neurons* en anglais, ainsi que des interneurones cholinergiques (Freund et al., 1984; Stoof et al., 1992). Les neurones GABAergiques constituent environ 95 % des neurones contenus dans le striatum (Smith et Bolam, 1990; Pennartz et al., 1994). Les noyaux caudé et putamen forment ensemble le néostriatum ou tout simplement striatum. Le globus pallidus et le striatum font partie des corps striés. La voie nigrostriée est très importante dans le contrôle moteur et la dégénérescence spécifique de cette voie entraîne une maladie bien connue : la maladie de Parkinson (Hirsch et al., 1988; Gibb et Lees, 1991). L'agent causal n'a pas encore été identifié, mais on suppose qu'il pourrait s'agir soit d'une toxine semblable au MPTP¹ ou de radicaux libres. Le MPTP est une toxine utilisée chez les primates pour produire un modèle expérimental de cette maladie. Au niveau physiopathologique, on sait que les symptômes commencent à apparaître lorsque les niveaux de DA dans le striatum sont diminués de 80 %. Cette baisse est causée par une mort cellulaire extensive des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN) (Langston, 1990).

1.1.2 Les voies mésolimbique et mésocorticale

On considère souvent ces deux voies comme faisant partie d'un tout puisqu'elles proviennent toutes deux du noyau A10 ou l'ATV (figure 1). Ces deux voies sont souvent nommées sous l'appellation combinée de «voie mésocorticolimbique». La voie

¹ Pour 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

mésolimbique provient de l'ATV, passe par le MFB et innerve le noyau accumbens, les tubercules olfactifs, le septum et la portion médiane des noyaux caudé et putamen. Quelques projections mineures de cette voie se rendent jusqu'au cortex préfrontal et à l'hippocampe (Oades et Halliday, 1987) (non montrées dans la figure 1). La voie mésocorticale provient aussi de l'ATV et se projette majoritairement aux cortex cingulaire, entorhinal et préfrontal via le MFB (Thierry et al., 1973; Berger et al., 1974). Cette voie possède un rôle dans l'exécution motrice, la motivation et la cognition.

Les projections au noyau accumbens de la voie mésolimbique auraient un rôle majeur à jouer dans les phénomènes de récompenses, de renforcements positifs et dans les phénomènes d'abus de drogues (Wise et Bozarth, 1987; Kalivas et Stewart, 1991; Koob, 1992). Les études animales sur la dépendance aux drogues d'abus sont utiles afin de comprendre ce phénomène. Dans un paradigme bien connu, les rats ont accès à deux pédales. Une d'entre elles contrôle l'injection de la drogue et l'autre, l'injection de solution saline. Dans ces conditions, les animaux s'auto-administrent des amphétamines lorsqu'une canule les perfuse directement dans le noyau accumbens, mais pas si cette canule est déposée dans le noyau caudé ou le cortex préfrontal (Hoebel et al., 1983; Carr et White, 1986). La littérature démontre aussi qu'il existe un lien entre les projections de l'ATV et les drogues opioïdes. En effet, l'injection directe dans l'ATV d'agonistes opioïdes de type μ et δ augmente les niveaux de DA dans le noyau accumbens, tandis que les agonistes opioïdes de type κ ont une action contraire (Spanagel et al., 1992; Devine et al., 1993). La DA participe donc au mécanisme d'action des drogues d'abus via son rôle dans les phénomènes de récompense.

Dans un tout autre ordre d'idées, certains résultats convaincants font correspondre un dysfonctionnement de la voie mésocorticolimbique à la genèse des symptômes schizophréniques. Mentionnons toutefois que l'étiologie de la schizophrénie est multifactorielle et il ne faut pas faire l'erreur de croire que la DA en est le seul acteur (Kaplan et Sadock, 2003). Néanmoins, il a été observé que les amphétamines ou la cocaïne, deux substances qui augmentent les niveaux de DA, peuvent causer ou aggraver des symptômes psychotiques. De plus, ces symptômes peuvent être diminués par l'administration de médicaments antipsychotiques qui inhibent les récepteurs de la DA de type D₂ ou D₄ (Meltzer et al., 1989; Seeman, 1992). Davis et ses collègues sont à l'origine de l'hypothèse du déséquilibre dopaminergique dans la schizophrénie (Davis et al., 1991). Cette hypothèse stipule qu'une hypertransmission au niveau de la voie mésolimbique serait responsable des symptômes positifs (ex : hallucinations) et que les antipsychotiques auraient un effet inhibiteur sur cette voie. De plus, une hypotransmission au niveau de la voie mésocorticale pourrait expliquer les symptômes négatifs et les défauts cognitifs associés à cette maladie.

1.1.3 Les autres systèmes dopaminergiques

Il existe plusieurs autres systèmes dopaminergiques que nous ne verrons pas en détail dans le présent travail. La voie mésobulbaire (provenant des noyaux A9 et A10) rejoint le locus coeruleus et permet de connecter les neurones dopaminergiques du mésencéphale avec les neurones noradrénergiques du bulbe rachidien (Oades et Halliday,

1987). Les noyaux A11 et A13 sont localisés dans l'hypothalamus et envoient des projections jusqu'à la moelle épinière. Ces projections sont impliquées dans la régulation des neurones préganglionnaires sympathiques. Les noyaux A12 et A14 forment le système tubéroinfundibulaire hypothalamique. Les axones de ces neurones dopaminergiques libèrent la DA directement dans le sang par le système porte hypothalamo-hypophysaire. Rendue à l'hypophyse, la DA effectue une inhibition dominante et tonique sur la libération de prolactine, une hormone endocrinienne impliquée dans la lactation (Ivan et al., 2005). Il est intéressant de noter que chez les patients traités avec des antipsychotiques (diminution de la transmission dopaminergique), on remarque souvent une hyperprolactinémie¹ (Greenspan et Gardner, 2004). Mentionnons, finalement, que les groupes A15, A16 et A17-18 contiennent des neurones dopaminergiques situés respectivement dans le tubercule olfactif, le bulbe olfactif et la rétine (Dahlström et Fuxe, 1964a, b).

¹ Les niveaux élevés de prolactine peuvent être utilisés en clinique afin de prédire l'efficacité d'un traitement antipsychotique.

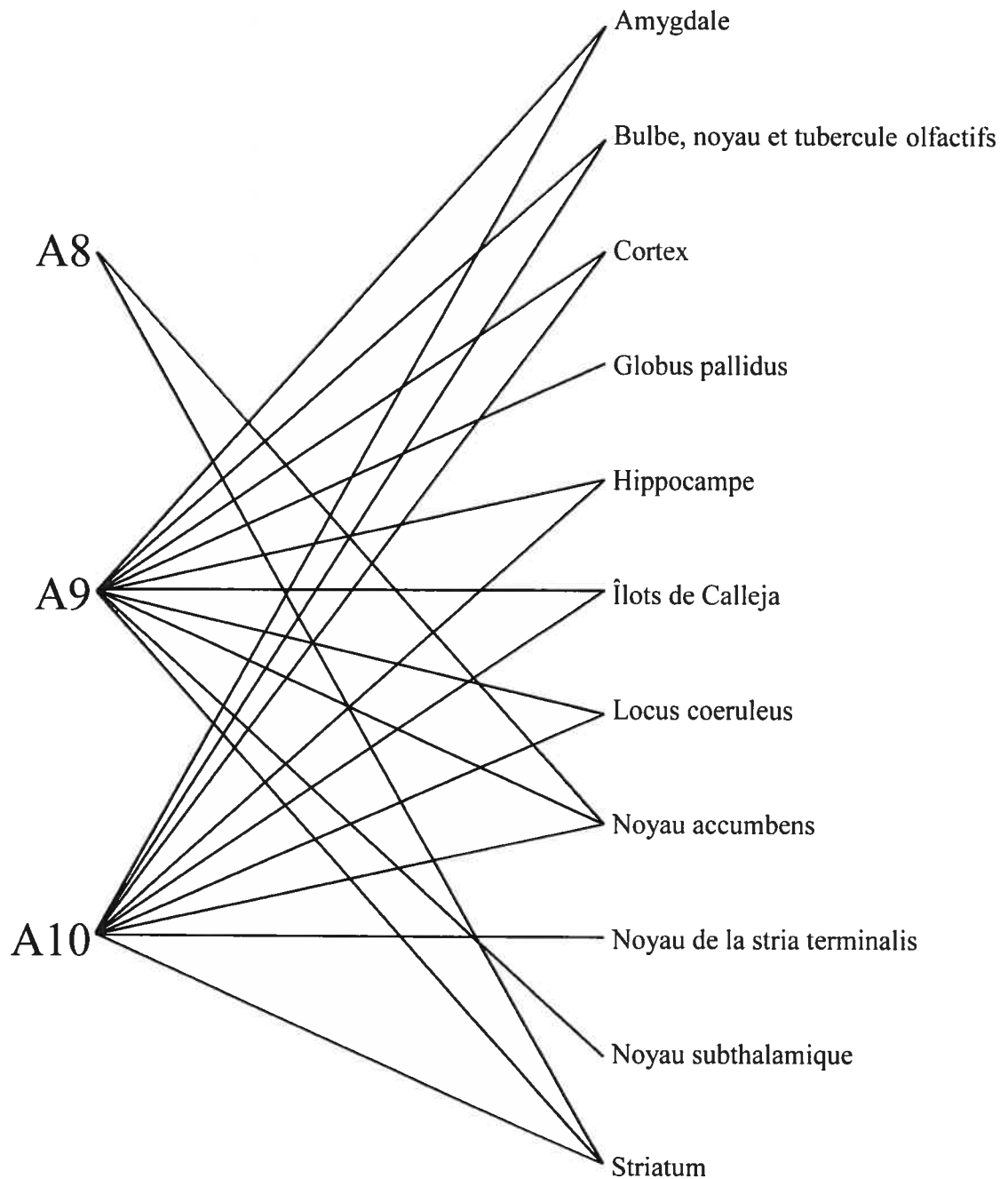


Figure 2 : Interconnexions entre les noyaux dopaminergiques mésencéphaliques (Adapté de Feldman et al., 1997). Ce schéma illustre la complexité et la redondance entre les différents noyaux dopaminergiques du mésencéphale (A8 à A10).

En guise de conclusion générale, il faut comprendre que la schématisation de la figure 1 représente une simplification permettant de mieux comprendre l'anatomie des voies dopaminergiques. En effet, il existe des interconnexions entre les différentes voies dopaminergiques (figure 2). Ces interconnexions engendrent une hétérogénéité du système dopaminergique tant au niveau anatomique que fonctionnel. Par exemple, des neurones de la SNc peuvent se projeter vers le cortex préfrontal, tandis que ceux de l'ATV envoient des projections vers le striatum (Fallon et Moore, 1978; Jimenez-Castellanos et Graybiel, 1987; Arsenault et al., 1988; Parent et Lavoie, 1993). Toutefois, pour les besoins de la cause, nous pouvons nous en tenir à la simplification de la figure 1 afin de bien comprendre les notions qui seront exposées dans les prochaines sections. Il pourrait être utile tout au long de la lecture de ce mémoire de revenir consulter cette figure au besoin.

1.2 Symptomatologie des pathologies reliées à la dopamine

Comme mentionné dans la section précédente, un dysfonctionnement des voies dopaminergiques peut être la cause ou être associé à plusieurs pathologies. On peut séparer ces pathologies en deux grandes classes. La première classe inclut les pathologies causées ou associées à une hypotransmission dopaminergique, comme la maladie de Parkinson, l'hyperprolactinémie et les symptômes négatifs de la schizophrénie. La deuxième classe contient les pathologies causées ou associées à une hypertransmission dopaminergique, comme les symptômes positifs de la schizophrénie, le syndrome de Gilles de la Tourette et la dépendance aux drogues d'abus. Ces pathologies peuvent être présentes simultanément et se potentialiser. Par exemple, il n'est pas rare d'apprendre qu'un patient schizophrène consomme de la drogue. Comme les bases anatomo-pathologiques de ces symptômes ont déjà été décrites dans la section précédente, nous décrivons ici que très brièvement les symptômes reliés à ces divers troubles.

En 1980, Tim Crow proposa de séparer les symptômes de la schizophrénie en symptômes négatifs (déficits) et en symptômes positifs (productifs) (Crow, 1980). Cette classification ne fut pas retenue par le DSM-IV-TR¹ (American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV, 2000). Cette classification est toutefois très utile dans la recherche, puisqu'on croit que ces deux groupes de symptômes sont expliqués par une dysfonction différente des voies mésolimbique et mésocorticale (Davis et al., 1991). Les symptômes positifs regroupent les hallucinations (auditives, tactiles, olfactives ou

¹ Le DSM-IV-TR est un manuel de référence comportant un consensus international sur les critères des maladies psychiatriques. Il est grandement utilisé en clinique par les psychiatres.

visuelles), les délires (de persécution, religieux, etc.), les comportements bizarres (sexuels, sociaux, agressifs, etc.) et les troubles de la pensée (incohérente, illogique, etc.). Les symptômes négatifs regroupent aussi plusieurs types de symptômes, comme un affect plat (peu de contacts visuels, diminution de l'expression faciale, etc.), des alogies (pauvreté du contenu verbal, latence augmentée pour répondre, etc.), de l'apathie, une perte d'intérêt pour diverses activités et finalement, des problèmes d'attention (Kaplan et Sadock, 2003). Mentionnons que les premiers symptômes de la schizophrénie apparaissent souvent vers l'adolescence. Cette maladie touche environ 1 % de la population mondiale à des degrés divers et 10 % des patients accomplissent un acte de suicide (Harrison et Braunwald, 2001).

La maladie de Parkinson commence généralement en milieu de vie ou un peu plus tard. Elle touche d'ailleurs 2 % des personnes de plus de 65 ans (Harrison et Braunwald, 2001). On a nommé cette maladie en l'honneur de James Parkinson qui, en 1817, décrit ce trouble chez des patients atteints de problèmes posturaux (Parkinson, 1817). On peut aussi séparer les symptômes de cette maladie en symptômes positifs et négatifs. Les symptômes positifs sont caractérisés par des tremblements (surtout de repos), de la rigidité musculaire et des mouvements involontaires. Les symptômes négatifs sont constitués d'une bradykinésie¹ et de problèmes posturaux. La maladie comporte plusieurs stades (Hoehn et Yahr, 1967). Les conséquences sur la morbidité sont vastes et s'étendent de problèmes minimes à un confinement permanent au lit. Il est intéressant de noter que dans plusieurs

¹ Ce terme désigne un ralentissement moteur. Il peut en découler des problèmes reliés à la marche, la parole, le clignement des yeux et même à l'expression faciale. Ce symptôme peut évoluer jusqu'à une akinésie complète, ou absence de mouvements. Sacks décrit habilement cette manifestation dans son livre *Awakenings* (1973).

cas, la maladie de Parkinson ne se limite pas à des problèmes moteurs ; les patients peuvent souffrir de démence, de problèmes de mémoire ainsi que de dépression majeure.

L'hyperprolactinémie, ou l'augmentation des niveaux sériques de prolactine, est à l'origine de diverses manifestations endocriniennes telles que l'infertilité ou la galactorrhée, soit un écoulement anormal de lait par les mamelons (Greenspan et Gardner, 2004). Il existe plusieurs causes d'hyperprolactinémie et les principales sont les tumeurs (Harrison et Braunwald, 2001). Comme mentionné précédemment, la DA inhibe d'une façon tonique la libération de prolactine (Ivan et al., 2005). Tous les médicaments qui diminuent l'effet de la DA dans le cerveau (ou sa transmission) peuvent causer une hyperprolactinémie. Mentionnons que plusieurs antipsychotiques, certains antidépresseurs et l' α -méthyldopa (un antihypertenseur) en font partie.

Le syndrome de Gilles de la Tourette touche surtout les enfants (jusqu'à 0,3 % d'entre eux). On définit cette pathologie comme l'association de plusieurs tics moteurs¹ avec un ou plusieurs tics vocaux². Ces tics sont présents pendant toute la journée et pendant de très longues périodes. Lorsqu'une personne présente des tics moteurs *ou* vocaux, on parle plutôt de tics chroniques (American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV, 2000). Les tics chroniques sont de 100 à 1 000 fois plus fréquents que le syndrome de Gilles de la Tourette. Quoique la pathophysiologie des tics chroniques ne soit pas encore

¹ Les tics moteurs les plus courants sont ceux qui affectent le visage et le cou. Il existe par contre plusieurs autres types de tics moteurs.

² Contrairement à ce que la pensée populaire nous dicte, seulement une partie minime des patients présentent de la coprolalie, soit une tendance à proférer des mots orduriers tels des jurons. Les médias contribuent malheureusement à faire croire le contraire. Le raclage de gorge constitue un type de tic vocal très fréquent.

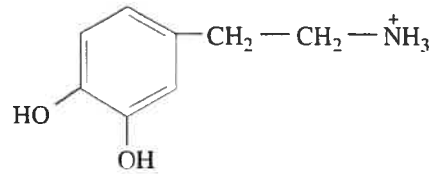
connue, l'idée qu'un excès de DA puisse être impliqué dans ces troubles est née de plusieurs observations empiriques. Les médicaments qui antagonisent le système dopaminergique, comme les antipsychotiques, diminuent les tics. De plus, ceux qui augmentent la transmission dopaminergique, comme les amphétamines et le méthylphénidate (Ritalin®), peuvent aggraver les tics. La DA n'est probablement pas le seul acteur impliqué dans ces dérèglements neurochimiques (Kaplan et Sadock, 2003).

Les études de dépendance effectuées sur des modèles animaux montrent que les projections dopaminergiques au niveau du noyau accumbens sont importantes dans les phénomènes de récompenses associés à la consommation de plusieurs drogues d'abus (Hoebel et al., 1983; Carr et White, 1986; Devine et al., 1993). En clinique, il n'est pas rare de rencontrer une codépendance à différents types de drogues. Les critères qui caractérisent une dépendance et/ou un abus face à une substance donnée sont nombreux. La dépendance à une ou des substances, qu'elle soit physique et/ou psychologique, se caractérise par le besoin de se procurer et de consommer la dite substance en quantité plus ou moins importante. Les individus peuvent mettre fin à plusieurs activités sociales et/ou professionnelles importantes afin de consommer cette substance. Ces derniers peuvent s'engager dans des activités dangereuses telles que la prostitution ou les activités criminelles afin de se procurer la substance. Trop souvent, malheureusement, ils peuvent mettre leur vie et celle des autres en danger en consommant dans des situations où il ne le faudrait pas, par exemple lors de la conduite d'une automobile.

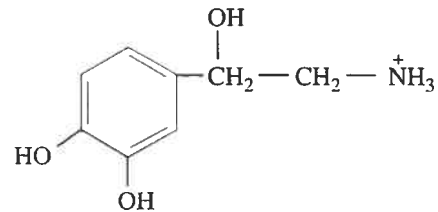
On comprend rapidement l'importance de l'étude du système dopaminergique lorsqu'on côtoie ou connaît des personnes atteintes des fléaux décrits plus haut. Pensons aux milliers d'adolescents handicapés par l'apparition de symptômes schizophréniques ou aux retraites gâchées de personnes du troisième âge atteintes de la maladie de Parkinson. Et que dire d'une personne qui entre dans l'enfer causé par la consommation d'une drogue d'abus ? Maintenant que nous avons discuté des voies dopaminergiques centrales et de leurs implications dans plusieurs pathologies graves, nous aborderons l'étude moléculaire de ce système fascinant.

CATÉCHOLAMINES

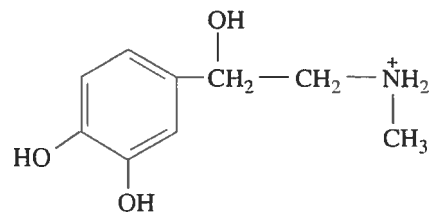
Dopamine



Noradrénaline

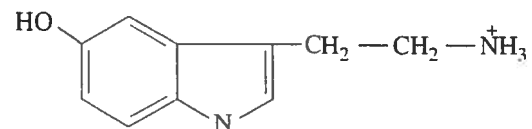


Adrénaline



INDOLAMINE

Sérotonine



IMIDAZOLAMINE

Histamine

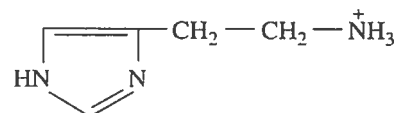


Figure 3 : Structures chimiques des monoamines (Adapté de Purves et Williams, 2001).

Les monoamines regroupent les catécholamines qui possèdent toutes un groupement catéchol (la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline), ainsi que la sérotonine qui est une indolamine et l'histamine qui est une imidazolamine.

2. Le système dopaminergique (anatomie moléculaire)

2.1 La dopamine

Pour être admis en tant que neurotransmetteur, une substance doit remplir plusieurs critères. Tout d'abord, la substance doit être synthétisée et présente dans le neurone présynaptique. Deuxièmement, la libération de cette substance doit être dépendante d'une dépolarisation membranaire et des niveaux intracellulaires de calcium. Cette libération doit être assez abondante pour induire une action sur des récepteurs spécifiques à cette substance. Troisièmement, une application pharmacologique de la substance doit imiter les effets de la substance endogène. Finalement, il doit exister des mécanismes responsables d'éliminer la substance à son site d'action (Kandel et al., 2000; Purves et Williams, 2001). La DA remplit tous ces critères, c'est pourquoi elle est considérée depuis longtemps comme un neurotransmetteur.

D'une façon plus générale, les monoamines regroupent tous les neurotransmetteurs qui possèdent un groupement amine ($-NH_2$), soit la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline, la sérotonine et l'histamine (figure 3). La DA fait partie de la classe des catécholamines qui regroupe, en plus de la DA, la noradrénaline et l'adrénaline. Les catécholamines ont toutes un groupement catéchol, c'est-à-dire un groupement benzène avec deux groupes hydroxyl adjacents ($-OH$).

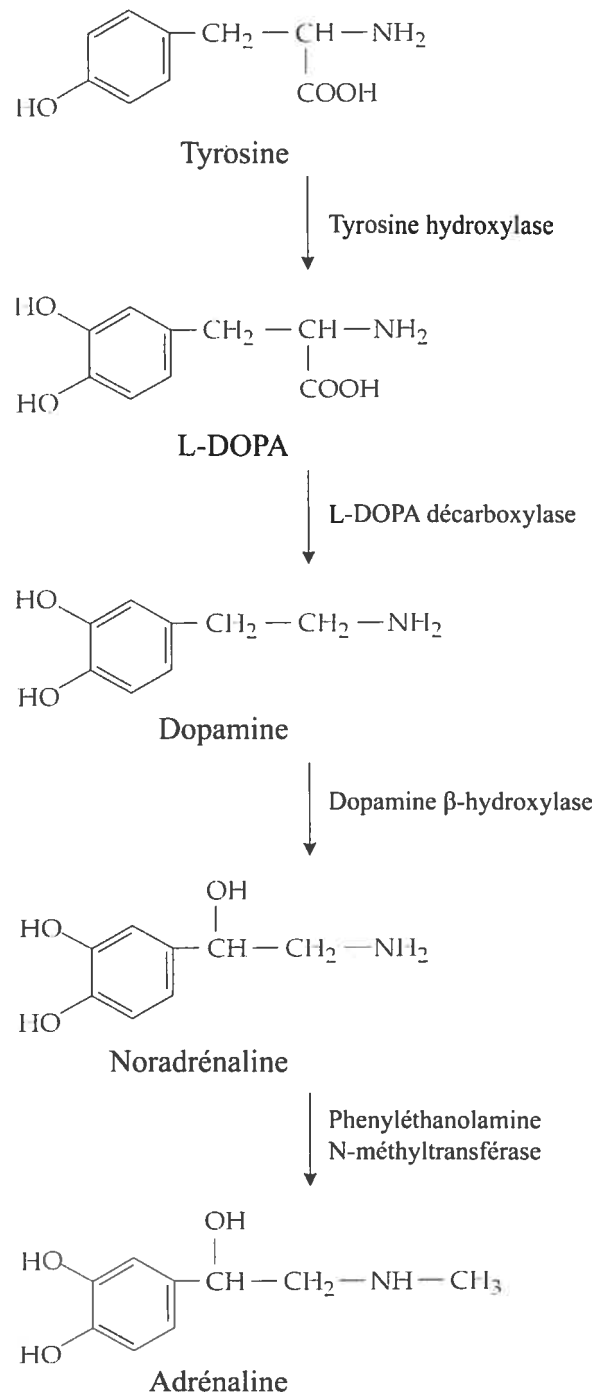


Figure 4 : Biosynthèse des catécholamines (Adapté de Feldman et al., 1997). Le précurseur métabolique des catécholamines est la tyrosine, un acide aminé. La tyrosine est convertie successivement en L-DOPA, dopamine, noradrénaline et adrénaline.

2.2 Métabolisme de la dopamine

2.2.1 Synthèse enzymatique de la dopamine

Le métabolisme de la DA se divise en deux parties, soit sa synthèse enzymatique et son catabolisme. La figure 4 montre la synthèse des différentes catécholamines à partir de la L-tyrosine. Chez l'humain, la L-tyrosine est un acide aminé non essentiel, c'est-à-dire que l'organisme est capable d'en synthétiser. Cet acide aminé provient aussi de la diète (Guyton et Hall, 2000). L'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) catalyse l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). L'enzyme TH constitue l'étape limitante de la synthèse de la DA et des autres catécholamines (Levitt et al., 1965). La prochaine étape implique la formation de DA à partir de la L-DOPA par l'enzyme L-DOPA décarboxylase. La L-DOPA décarboxylase catalyse la déléation du groupement carboxyl (COOH) sur le carbone α de la chaîne latérale de la L-DOPA.

Des études immunohistochimiques montrent que la TH est exprimée au niveau des terminaisons dopaminergiques ainsi que sur les corps cellulaires et dendrites des neurones dopaminergiques. Ces observations sous-tendent que la DA puisse être synthétisée à ces deux endroits (Nirenberg et al., 1996; Hersch et al., 1997). De plus, des études biochimiques *in vitro* ont démontré que l'activité enzymatique de la TH pourrait être augmentée par phosphorylation sur plusieurs résidus et que ce procédé impliquerait la protéine kinase A (PKA) (Joh et al., 1978; Edelman et al., 1981). Les études *in vivo* ont

démontré ce même phénomène dans les neurones dopaminergiques ; la phosphorylation est dépendante de l'activité. Des stimulations répétées du MFB augmentent la phosphorylation de la TH dans le striatum (Haycock et Haycock, 1991). Finalement, les niveaux d'ARNm de la TH peuvent être augmentés dans l'ATV, ce qui suggère que l'activité enzymatique de la TH pourrait être modulée via une augmentation ou une diminution de sa synthèse (Pasinetti et al., 1990). Il est reconnu depuis longtemps que la DA est le précurseur métabolique de la noradrénaline et de l'adrénaline (Blaschko, 1952). Les étapes de la synthèse de ces autres catécholamines se retrouvent aussi à la figure 4, mais elles ne seront pas expliquées en détail dans ce travail.

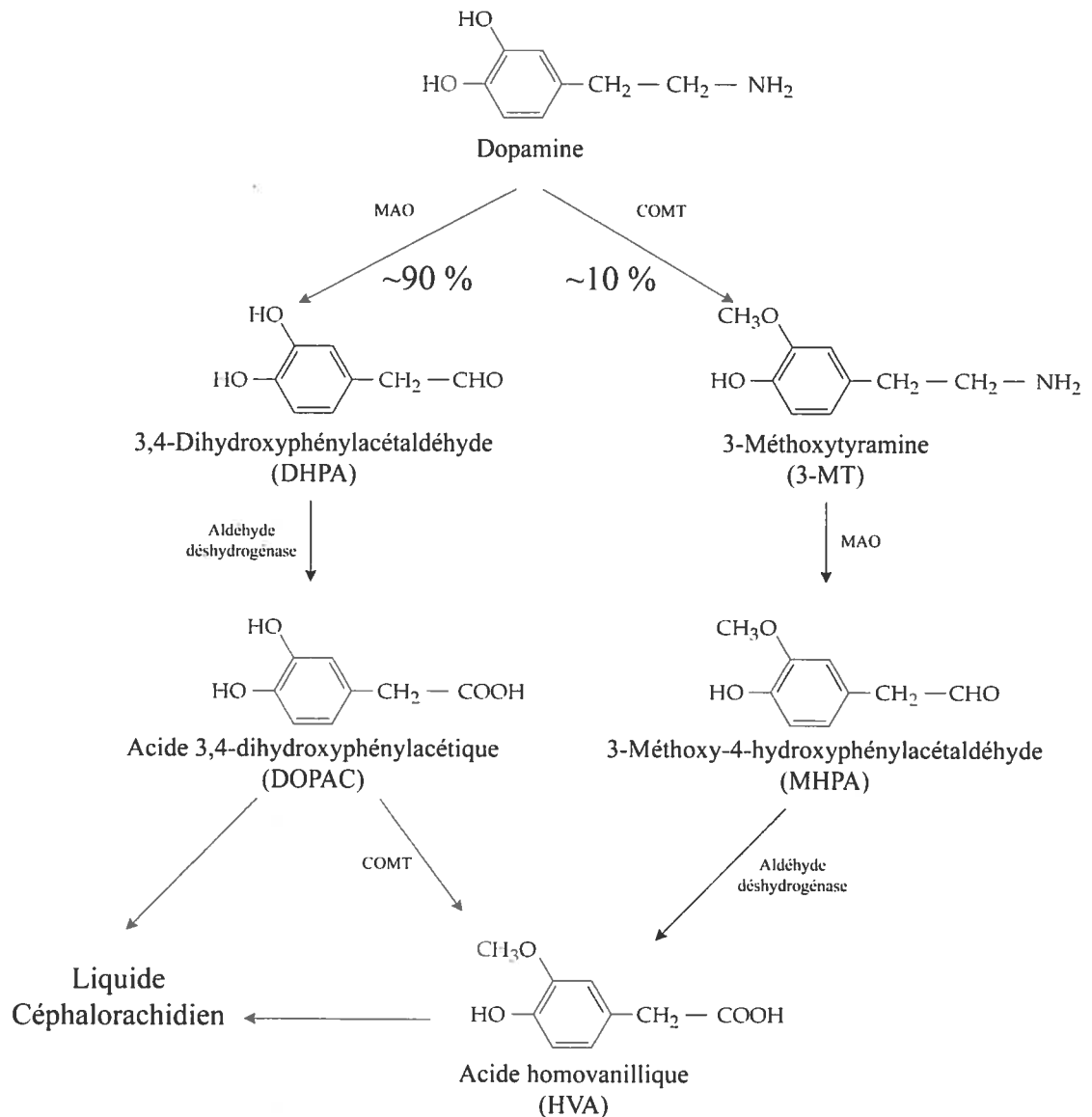


Figure 5 : Voies cataboliques de la dopamine (Adapté de Feldman et al., 1997). L'enzyme COMT contribue d'une façon mineure au catabolisme total, tandis que l'enzyme MAO représente environ 90 % du catabolisme enzymatique total. Les différents métabolites sont excrétés via le liquide céphalorachidien cérébral.

2.2.2 Catabolisme enzymatique de la dopamine

L'action de la DA est terminée majoritairement par la recapture via un transporteur membranaire spécifique, le DAT (pour *dopamine transporter* en anglais). Par contre, la destruction enzymatique de la DA est aussi possible et il existe deux voies distinctes. La principale voie de dégradation implique l'enzyme monoamine oxydase (MAO) et constitue environ 90 % du catabolisme total de la DA. La seconde voie, moins importante, est effectuée par l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase (COMT). La figure 5 montre ces étapes de façon détaillée. L'enzyme COMT est retrouvée dans le cerveau, dans le foie, dans les reins et dans le cœur. Elle existe sous deux formes : liée à la membrane et soluble (Kopin, 1985). Pour sa part, l'enzyme mitochondriale MAO est aussi retrouvée dans le foie, dans les reins et dans le cerveau et il en existe deux isoformes différentes, soit la MAO-A et la MAO-B (Berry et al., 1994). La DA possède une affinité semblable pour ces deux isoformes, tandis que les autres catécholamines, la noradrénaline et l'adrénaline, possèdent une affinité supérieure pour la MAO-A¹. L'enzyme MAO conduit à la formation du 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DHPA), qui est par la suite oxydé en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par l'enzyme aldéhyde déshydrogénase. Environ la moitié du DOPAC est directement évacuée par le liquide céphalorachidien. L'autre moitié est métabolisée par l'enzyme COMT en acide homovanillique (HVA), qui est aussi évacué par le liquide céphalorachidien.

¹ On croit que les niveaux de noradrénaline sont diminués dans la dépression, c'est pourquoi on utilise des inhibiteurs de la MAO-A comme antidépresseurs.

La seconde voie, beaucoup moins importante, débute par l'enzyme COMT et donne la 3-méthoxytyramine (3-MT), qui est ensuite convertie en 3-méthoxy-4-hydroxyphénylacétaldéhyde (MHPA). Par la suite, le MHPA est transformé en HVA par l'enzyme aldéhyde déshydrogénase pour quitter l'organisme en empruntant le liquide céphalorachidien. La connaissance de ces voies métaboliques n'est pas sans utilité, puisque le dosage de certains métabolites en microdialyse, comme le DOPAC et la 3-MT, permettent d'évaluer respectivement les niveaux de catabolisme intracellulaire et la relâche de DA (Kopin, 1985; Brown et al., 1991).

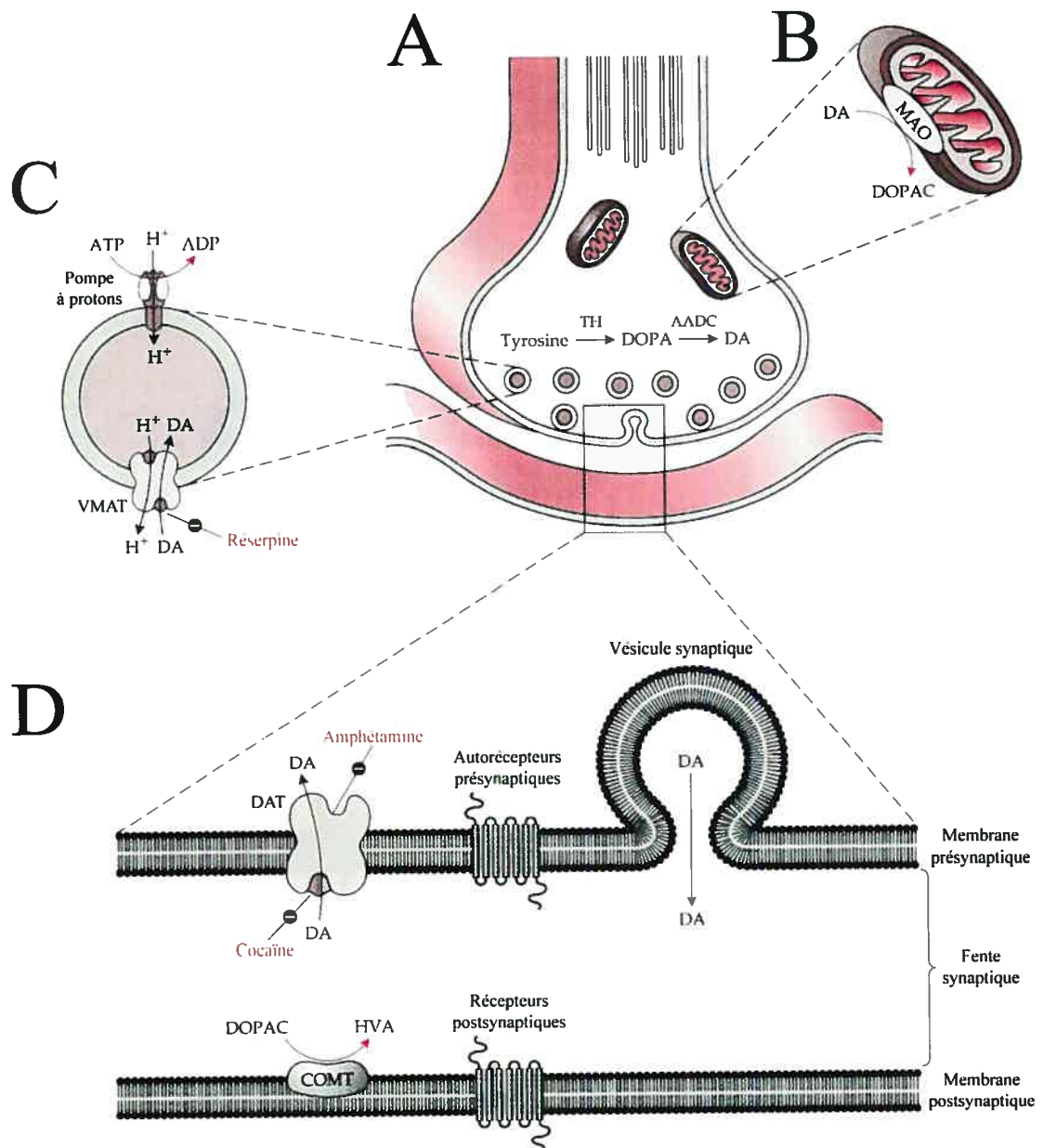


Figure 6: La terminaison dopaminergique (Adapté de Feldman et al., 1997). (A) Vue générale d'une terminaison dopaminergique. La dopamine (DA) est synthétisée dans les terminaisons et empaquetée dans des vésicules. (B) L'enzyme MAO est localisée sur les mitochondries. (C) Gros plan d'une vésicule de DA qui contient deux molécules importantes, le transporteur vésiculaire de la dopamine (VMAT) et une pompe à proton. (D) Grossissement de la fente synaptique. En présynaptique, une vésicule de DA fusionne à la membrane et libère la DA dans la fente synaptique. À cet endroit, il existe plusieurs récepteurs spécifiques de la DA. La DA est finalement éliminée majoritairement par recapture à l'aide du transporteur membranaire de la dopamine (DAT) ou minoritairement par catabolisme effectué par les enzymes COMT et MAO.

2.3 La terminaison dopaminergique

Replaçons maintenant toutes ces informations biochimiques dans le contexte d'une terminaison dopaminergique (figure 6). Lorsque les vésicules de DA fusionnent à la membrane, ce neurotransmetteur atteint l'espace synaptique. À cet endroit, la DA peut se lier à des récepteurs spécifiques localisés sur les membranes présynaptiques et postsynaptiques. Cette liaison initie l'action pharmacologique de la DA. La DA doit ensuite être éliminée de la fente synaptique par des mécanismes de recapture et de catabolisme. Séparons l'étude de la terminaison dopaminergique en trois parties : la synthèse et le stockage de la DA, la libération de DA et finalement, l'élimination extracellulaire de la DA.

2.3.1 Synthèse et stockage de la dopamine

Les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la DA sont synthétisées à partir de l'ADN contenu dans le noyau du neurone et sont envoyées aux terminaisons axonales par le transport axonal lent. Comme mentionné précédemment, l'acide aminé L-tyrosine entre dans la terminaison dopaminergique et la DA y est alors synthétisée (voir figure 4 et figure 6). La DA est ensuite emmagasinée dans les vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT pour *vesicular monoamine transporter* en anglais). Ce transporteur utilise le gradient de protons mis en place par une pompe à protons vésiculaire. Ce gradient de protons fournit l'énergie nécessaire pour faire entrer la DA dans

les vésicules synaptiques (Johnson, 1987). La réserpine effectue son action via l'inhibition du VMAT, ce qui empêche l'accumulation de DA dans les vésicules (figure 6). Puisqu'il est probable que certains symptômes schizophréniques soient causés par un excès de DA, on comprend pourquoi la réserpine était utilisée autrefois comme antipsychotique (Davis et al., 1991). La réserpine était aussi utilisée anciennement pour induire une déplétion dopaminergique chez les animaux et mimer les symptômes Parkinsoniens (Carlsson et al., 1957). L'enzyme MAO est située sur la membrane externe des mitochondries et garde les concentrations intra-cytoplasmiques de DA basses en la transformant en DOPAC (Kopin, 1985). Ce dernier sera par la suite évacué de l'organisme ou transformé en HVA (voir figure 5). Rappelons que plusieurs médicaments peuvent inhiber la MAO. Par exemple, la sélégiline inhibe la MAO-B et est utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson afin d'augmenter les niveaux de DA (Nyholm, 2006).

2.3.2 Libération de dopamine

Les neurones possèdent un mécanisme de biosynthèse spécialisé leur permettant de conserver certaines molécules à l'intérieur de vésicules et de les libérer sur demande (Arvan et Castle, 1998). Ce processus s'appelle l'exocytose vésiculaire. En moyenne, environ dix vésicules par terminaison sont amarrées à une région spécialisée de la membrane présynaptique qu'on nomme zone active (Harlow et al., 2001; Rosenmund et al., 2003). En l'absence de stimulation, on estime qu'une vésicule par terminaison par minute fusionne et libère son contenu. Cela donne lieu à une transmission de base ou exocytose

constitutive (Burgess et Kelly, 1987; Jahn, 2004). À l'opposé, l'exocytose régulée constitue le processus par lequel une dépolarisation entraîne l'entrée de calcium par des canaux calciques dépendants du voltage et provoque la fusion des vésicules présentes à la zone active (Rizo et Sudhof, 2002; Zhang et al., 2002; Brunger, 2005). Les concentrations de calcium nécessaires au déclenchement de l'exocytose sont généralement très élevées (de l'ordre du mM) et sont restreintes à des micro-domaines près des vésicules (Scalettar, 2006). La fusion des vésicules de DA s'effectue par l'entremise d'une machinerie protéique sensible au calcium. Les protéines de la famille des SNARE (synaptobrevine, syntaxine et SNAP-25) font partie de ce complexe moléculaire (Burgoyne et Morgan, 1995; Hanson et al., 1997; Chen et Rice, 2001).

Il a été découvert, vers la fin des années 1970, que les dendrites des neurones dopaminergiques contenus dans la SN contenaient aussi de la DA (Bjorklund et Lindvall, 1975), suggérant ainsi que la libération de DA pouvait également s'effectuer par le compartiment somatodendritique (Geffen et al., 1976). Actuellement, il existe une controverse concernant les mécanismes d'une telle libération. Tout comme la libération terminale, la libération somatodendritique semble s'effectuer par un processus vésiculaire. Tout d'abord, la libération somatodendritique est dépendante de l'activité électrique puisque plusieurs études ont montré une sensibilité à la tétradotoxine, une toxine inhibant l'activité électrique des neurones par blocage de certains canaux sodiques (Kalivas et Duffy, 1991; Robertson et al., 1991; Beckstead et al., 2004; Catterall et al., 2005a). De plus, cette libération est dépendante du calcium, mais d'une façon moins marquée que la relâche terminale (Beart et McDonald, 1980; Elverfors et al., 1997; Chen et Rice, 2001).

Enfin, la réserpine, une substance qui inhibe le stockage vésiculaire de la DA, est capable de bloquer la relâche somatodendritique de DA (Elverfors et Nissbrandt, 1991; Heeringa et Abercrombie, 1995). Notre laboratoire a récemment publié une étude qui fait mention de la nécessité des protéines d'exocytose SNAP-25 et synaptobrevine dans la libération somatodendritique de DA (Fortin et al., 2006).

La théorie du transport inverse est postulée et s'oppose aux observations décrites précédemment. Selon cette théorie, le fonctionnement du DAT serait inversé, ce qui permettrait la sortie plutôt que l'entrée de DA (Raiteri et al., 1979). L'importance du DAT dans la libération somatodendritique a d'ailleurs été récemment démontrée dans un modèle de coupes de mésencéphale à l'aide de l'ampérométrie (Falkenburger et al., 2001), mais une autre étude démontre que le DAT n'est pas important dans un tel mécanisme (Chen et Rice, 2001). Quoi qu'il en soit, la libération somatodendritique de DA pourrait permettre aux neurones dopaminergiques de s'inhiber eux-mêmes via des autorécepteurs localisés sur les corps cellulaires et les dendrites (Groves et al., 1975). Les résultats présentés dans ce mémoire ne s'intéressent qu'à la libération terminale de DA. Notre étude a été effectuée sur des coupes de striatum ; dans ces conditions, le compartiment somatodendritique est complètement absent du modèle.

2.3.3 Élimination extracellulaire de la dopamine

L'inactivation de la DA permet de terminer son effet pharmacologique. Cette inactivation s'effectue principalement par deux mécanismes : la recapture et le catabolisme enzymatique. La recapture est le mécanisme majeur d'élimination extracellulaire de la DA, tandis que le catabolisme enzymatique possède une importance mineure. Dans le milieu extracellulaire, le catabolisme enzymatique ne s'effectue que par la COMT puisque la MAO possède une localisation intraneuronale dans les mitochondries (Kopin, 1985). Les premières études immunohistochimiques à propos de la COMT démontraient que cette enzyme était exprimée seulement sur les cellules non neuronales telles les cellules gliales (Kaplan et al., 1979). Par contre, les études pharmacologiques laissaient sous-entendre que les neurones pouvaient aussi exprimer cette enzyme (Rivett et al., 1983), ce qui fut confirmé avec des anticorps plus spécifiques quelques années plus tard (Karhunen et al., 1994; Karhunen et al., 1995).

La recapture par les terminaisons constitue le principal mécanisme d'élimination extracellulaire de la DA et cette fonction est effectuée par le DAT. Une fois recapturée, la DA est rempaquetée dans les vésicules par le VMAT pour une utilisation ultérieure. Les études immunohistochimiques démontrent que le DAT est principalement exprimé à distance des sites de libération (Nirenberg et al., 1996; Hersch et al., 1997). La figure 6 constitue donc une représentation inexacte de la réalité, puisqu'elle montre le DAT dans l'espace synaptique alors que ce transporteur devrait être schématisé à l'extérieur de ce compartiment. Une localisation pérисynaptique ou extrasynaptique suggère que la

transmission de la DA pourrait agir via une diffusion dans le milieu ; le terme transmission volumétrique est souvent utilisé et nous en reparlerons dans la prochaine section (Fuxe et Agnati, 1991). Quoi qu'il en soit, le DAT pérисynaptique peut tout de même être localisé à proximité des sites de libération de la DA (Garris et al., 1994).

Plusieurs médicaments ou drogues d'abus peuvent inhiber le DAT, ce qui explique l'effet pharmacologique de ces substances ; prenons comme exemple les amphétamines comme le méthylphénidate (Ritalin ®) ou la cocaïne (voir figure 6). Des données expérimentales en voltamétrie cyclique et en microdialyse confirment que ces substances augmentent les niveaux de DA dans le noyau accumbens (Cragg et al., 1997; Bradberry et al., 2000; Schmitz et al., 2001; Schmitz et al., 2003). À l'aide de la tomographie par émission de positrons, il est possible de montrer qu'une dose thérapeutique de Ritalin ® bloque 50 % des DAT chez l'humain, ce qui augmente les concentrations de DA dans le cerveau (Volkow et al., 2002).

2.4 Neurotransmission de la dopamine

Afin d'introduire cette discussion qui peut s'avérer très complexe à prime abord, prenons l'exemple théorique d'un seul neurone dopaminergique libérant une quantité précise de DA une seule fois dans un milieu défini. Les molécules de DA libérées par ce neurone sont présentes dans un certain volume, ce qui en détermine la concentration. Ces molécules de DA doivent diffuser afin d'effectuer leur effet physiologique au site des récepteurs spécifiques. La concentration de DA ([DA]) dans cet espace est dépendante de plusieurs facteurs. On peut regrouper ces facteurs en deux groupes principaux, soit la relâche et l'élimination (Justice et al., 1988). La relâche de DA est dépendante de la quantité de ce neurotransmetteur qui est libérée par un stimulus donné. Ceci est déterminée par la synthèse et le stockage vésiculaire de la DA ainsi que par la nature du stimulus qui a induit cette relâche. Afin de terminer son action pharmacologique, la [DA] au site des récepteurs doit éventuellement diminuer. L'élimination de la DA au site des récepteurs spécifiques est déterminée par la diffusion, la dégradation enzymatique et la recapture par le DAT. La diffusion est déterminée par les caractéristiques physicochimiques de l'environnement dans lequel se retrouve la DA. Le coefficient de diffusion libre¹ de la DA dans le cerveau à 34°C est évalué à $6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Gerhardt et Adams, 1982; Nicholson, 1995; Tao et Nicholson, 1996).

¹ Si on tient compte de la recapture par le DAT, le coefficient de diffusion de la DA est de $2.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

2.4.1 Concept de transmission volumétrique

L'interaction entre la relâche et l'élimination de la DA détermine la nature de la neurotransmission dopaminergique et il est possible que ces facteurs soient différents d'une région à l'autre du cerveau (Garris et Wightman, 1994). Les techniques électrochimiques permettent de doser rapidement les niveaux de DA en temps réel. Ces techniques sont particulièrement intéressantes lorsqu'on étudie des phénomènes de cinétique. En effet, des études *in vivo* dans le striatum ont permis d'évaluer la demi-vie extracellulaire de la DA à moins de 50 ms (Wightman et Zimmerman, 1990). Dans ces conditions, l'élimination de la DA est très importante. Ce type de libération, que Garris et Wightman proposent d'appeler «*uptake dominated*» s'applique pour le noyau accumbens et le striatum (Garris et Wightman, 1994). La capacité de recapture de la DA par le DAT est toutefois plus élevée dans le striatum que dans le noyau accumbens (May et Wightman, 1989; Marshall et al., 1990).

Ces observations portent à croire que dans ces deux structures, la DA peut agir comme un neurotransmetteur classique avec tous les éléments d'une synapse fonctionnelle. Les terminaisons dopaminergiques sont d'ailleurs capables de former de telles structures dans le striatum (Descarries et al., 1980; Groves, 1980). Par contre, seulement 30 à 40 % des terminaisons dopaminergiques forment une synapse conventionnelle (Descarries et al., 1996). Garris et ses collaborateurs ont élégamment démontré que dans ce contexte synaptique, la DA pouvait diffuser hors de cette structure et agir sur des récepteurs extrasynaptiques. La [DA] extrasynaptique était mesurée à l'aide de la voltamétrie cyclique

in vivo dans le noyau accumbens de rats. Cette concentration était suffisamment élevée pour avoir une activité pharmacologique au niveau des récepteurs puisqu'elle s'approchait des valeurs de K_d des récepteurs dopaminergiques (Garris et al., 1994). D'autres observations ont aussi confirmé cette possibilité et on évalue que la DA peut diffuser jusqu'à 12 μm hors d'une synapse¹ pour agir sur ses récepteurs (Gonon, 1997). Il est possible de conclure que même dans les structures synaptiques classiques où la libération est dominée par la recapture², la DA peut diffuser hors du territoire synaptique afin d'agir sur des récepteurs distants de la synapse d'origine ; Garris et ses collaborateurs parlent de transmission synaptique avec fuite. Dans cette situation particulière, le rôle du DAT est d'éliminer rapidement la DA à l'intérieur de la fente synaptique (Cragg et Rice, 2004). La libération synaptique de fuite de la DA contraste avec la libération d'autres neurotransmetteurs plus «classiques». En effet, dans la libération synaptique de glutamate ou d'acétylcholine, la distance de fuite est beaucoup moins grande (Bergles et al., 1999; Rusakov et al., 1999).

Les études électrochimiques *in vivo* effectuées dans d'autres régions comme le cortex préfrontal et les amygdales, ont présenté des résultats très intéressants. Le cortex préfrontal présente une situation où la relâche de DA est environ 10 fois supérieure à celle du striatum, mais avec une recapture comparable. L'inverse est vrai pour les amygdales ; la relâche est semblable à celle du striatum, mais la recapture est environ 10 fois moindre

¹ En comparaison, la distance entre les membranes pré et postsynaptiques est d'environ 15 nm et le diamètre d'une synapse approche les 300 nm.

² On sait aujourd'hui que le principal facteur qui influence la [DA] est la diffusion et non pas la recapture par le DAT, puisque l'expression de ce transporteur dans les tissus est assez faible. Le terme «dominée par la recapture» apparaît ainsi mal choisi et on devrait plutôt parler de transmission dominée par la diffusion.

(Garris et Wightman, 1994). Ces deux portraits, quoique différents à première vue, donnent le même genre de cinétique et poussent ainsi Garris et Wightman à qualifier la transmission de DA dans ces régions de «*release dominated*», ou transmission dominée par la relâche. Ce genre de cinétique porte à croire que la neurotransmission dopaminergique dans ces régions s'apparente à un type de transmission autre que celui discuté plus haut : la transmission volumétrique ou non synaptique (Fuxe et Agnati, 1991; Vizi et Labos, 1991). Cette transmission dépasse largement la distance de 12 μm décrite ci-dessus dans le cadre d'une transmission synaptique avec fuite (Gonon, 1997). En accord avec cette hypothèse, les études d'imagerie démontrent que plusieurs terminaisons catécholinergiques sont libres de partenaire postsynaptique dans le striatum (Tennyson et al., 1974; Descarries et al., 1975) et dans le cortex (Seguela et al., 1988, 1989; Seguela et al., 1990). De plus, il existe souvent une différence entre la localisation d'un neurotransmetteur et ses récepteurs (Herkenham, 1987). Des études immunohistochimiques rapportent que la majorité des récepteurs dopaminergiques sont localisés à des endroits où la TH est faiblement ou non exprimée, laissant croire qu'il s'agit de sites extrasynaptiques (Sesack et al., 1994; Hersch et al., 1995; Yung et al., 1995).

Les résultats se rapportant à l'étude du DAT viennent aussi appuyer le concept de transmission volumétrique. Comme mentionné précédemment, le DAT est exprimé dans l'espace pérисynaptique ou extrasynaptique et non pas dans l'espace synaptique, ce qui laisse le temps à la DA de diffuser dans le milieu (Ciliax et al., 1995; Nirenberg et al., 1996; Hersch et al., 1997). De plus, la densité d'expression et l'activité constitutive du DAT sont faibles lorsqu'on les compare à d'autres systèmes. On évalue la densité du DAT

à 175-350 molécules/ μm^3 et son activité à 2-5 molécules de DA recapturées par seconde par molécule de transporteur (Garris et al., 1994; Hersch et al., 1997; Povlock et Schenk, 1997; Cragg et Rice, 2004). En comparaison, le système de recapture glutamatergique comporte une densité de l'ordre des 15 000 à 23 000 molécules/ μm^3 et possède une activité intrinsèque de plus de 35 molécules de glutamate recapturées par seconde par molécule de transporteur (Wadiche et al., 1995; Lehre et Danbolt, 1998; Cragg et Rice, 2004).

Toutes les observations précédentes concernent l'étude de la relâche terminale de DA. Nous avons déjà discuté de l'existence d'un mécanisme de libération somatodendritique de DA. Le concept de transmission volumétrique est aussi applicable à la libération somatodendritique de DA puisque la majorité de cette libération s'effectue sans la participation de synapses, qui sont, par ailleurs, plutôt rares (Wilson et al., 1977; Jaffe et al., 1998). À l'aide de modèles mathématiques semblables à ceux décrits auparavant, Cragg et ses collègues ont pu déterminer que la libération somatodendritique de DA était aussi du type «*release dominated*» et que le principal facteur qui influence l'élimination de la DA dans ces conditions est la diffusion et non pas la recapture par le DAT (Cragg et al., 2001). Même si la quantité de DA libérée est beaucoup plus petite dans les régions contenant les corps cellulaires dopaminergiques, la demi-vie extracellulaire de ce neurotransmetteur est environ 12 fois plus élevée dans la SNc que dans le striatum (Chen et Rice, 2001).

2.4.2 Implications de la transmission volumétrique

La différence entre une transmission synaptique normale et une transmission non synaptique ou volumétrique introduit plusieurs interrogations face aux neurones dopaminergiques et le contrôle de leurs fonctions. Le concept de transmission volumétrique porte à croire que les régions contenant de la DA seraient baignées par une concentration constante de DA (Descarries et Mechawar, 2000). Dans ces conditions, l'effet du DAT est quantitativement moins important et ce transporteur pourrait agir afin de moduler, plutôt que d'éliminer les quantités de DA ambiante (Cragg et Rice, 2004). Une autre implication de la transmission volumétrique concerne l'échange d'informations entre les synapses¹. Comparativement à l'acétylcholine contenue dans les jonctions neuromusculaires, les molécules de DA libérées par une terminaison peuvent diffuser jusqu'à plusieurs autres terminaisons et en moduler leur fonctionnement. Une simple vésicule contenant tout au plus quelques milliers de molécules de DA pourrait ainsi théoriquement atteindre jusqu'à 100 autres terminaisons (Cragg et Rice, 2004). Ce mécanisme de diffusion est d'ailleurs utilisé par les cellules amacrines de la rétine. Dans cette structure, la DA doit diffuser dans le milieu extracellulaire afin de rejoindre les récepteurs spécifiques et débiter son effet pharmacologique (Witkovsky et al., 1993).

La dopamine est essentielle dans la régulation de l'activité motrice, de la cognition, des émotions, des renforcements positifs, de la motivation, de la faim et de la douleur (Missale et al., 1998; Cragg et Rice, 2004; Hagelberg et al., 2004). Via une action sur ses

¹ Le terme «*crossstalk*» est utilisé en anglais.

récepteurs spécifiques, la DA joue le rôle de neuromodulateur. Prenons l'exemple d'une application de DA qui ne peut en elle-même changer l'activité spontanée des neurones striataux, mais qui peut potentialiser l'effet du glutamate sur ces derniers (Hu et Wang, 1988). Les récepteurs dopaminergiques sont tous des récepteurs métabotropes couplés aux protéines G. Ce type de récepteur se prête d'ailleurs à des fonctions régulatrices. D'une perspective strictement évolutive et dans le contexte d'un nombre limité de neurones dopaminergiques, il apparaît beaucoup plus économique de développer un système de transmission volumétrique que de contacter une à une les cibles à moduler à l'aide d'un système synaptique classique.

2.5 Récepteurs de la dopamine

Un peu d'histoire m'apparaît important afin de saisir la complexité de la classification des récepteurs de la DA. Au début des années 1970, des études biochimiques réussirent à montrer que la DA était capable d'augmenter la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) via une induction de l'adénylate cyclase (Kebabian et Greengard, 1971; Brown et Makman, 1972). Un peu plus tard, on proposa de séparer les récepteurs de la DA selon leur effet sur l'adénylate cyclase. On découvrit que le récepteur D₁ est couplé positivement à l'adénylate cyclase et que le récepteur D₂ est couplé négativement à cet effecteur (Spano et al., 1978; Kebabian et Calne, 1979). Au début des années 1990, on réussit à cloner trois autres récepteurs de la dopamine qu'on nomma D₃, D₄ et D₅ (Sokoloff et al., 1990; Sunahara et al., 1991; Tiberi et al., 1991; Van Tol et al., 1991). Des études pharmacologiques permirent de montrer que ces nouveaux récepteurs ont aussi une action sur l'AMPC. En effet, les récepteurs D₃ et D₄ sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (Chio et al., 1994b; Chio et al., 1994a; McAllister et al., 1995), tandis que le récepteur D₅ est couplé positivement à cet effecteur (Dearry et al., 1990; Sunahara et al., 1991).

Jusqu'à ce jour, nous savons qu'il existe cinq récepteurs différents de la DA chez les mammifères : on les désigne par les abréviations D₁ à D₅. Par contre, à l'aide de critères fonctionnels, pharmacologiques et homologues, on les sépare en deux familles distinctes, soit les récepteurs de type D1 qui comportent les récepteurs D₁ et D₅ (ou D_{1A} et D_{1B} selon certains ouvrages anciens) et les récepteurs de type D2 qui comprennent les récepteurs D₂,

D₃ et D₄. Cette terminologie est maintenant universellement acceptée dans la littérature (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Hiroi et al., 2002; Trantham-Davidson et al., 2004) et dans les ouvrages de référence utilisés couramment dans le domaine des neurosciences (Feldman et al., 1997; Siegel, 1999; Kandel et al., 2000; Purves et Williams, 2001). Mentionnons que chez d'autres espèces, on a trouvé deux récepteurs additionnels : les récepteurs D_{1C} et D_{1D}. Le nombre total de récepteurs de la DA est ainsi porté à sept. Les récepteurs D_{1C} et D_{1D} font partie de la famille D₁ et ont été trouvés respectivement chez la grenouille et l'oiseau (Sugamori et al., 1994; Demchyshyn et al., 1995; Le Crom et al., 2004). Comme les récepteurs D_{1C} et D_{1D} n'ont pas été retrouvés chez les mammifères, nous continuerons la discussion en considérant seulement les récepteurs dopaminergiques D₁ à D₅.

		<i>Famille D1</i>		<i>Famille D2</i>		
		D₁	D₅	D₂	D₃	D₄
A N T A G O N I S T E S	Butaclamol	+++	++	+++	ND	++
	Chlorpromazine	+	+	+++	++	++
	Clozapine	+	+	+	+	++
	Éticlopride	-	-	++++	ND	+++
	Halopéridol	+	+	++++	++	+++
	Nafadotride	ND	ND	+++	++++	+/-
	Nemonapride	ND	ND	++++	++++	++++
	Raclopride	-	ND	+++	+++	+/-
	SCH-23390	++++	++++	+/-	+/-	+/-
	Sulpiride	-	-	++	++	++
	Spipérone	+	+/-	++++	+++	++++
A G O N I S T E S	Apomorphine	+/-	+	+++	++	+++
	Bromocriptine	+	+	+++	+++	+
	Dopamine	+/-	+	+	++	++
	Fénoldopam	+++	+++	++	ND	+
	7-OH-DPAT	+/-	ND	++	+++	+/-
	Quinpirole	-	ND	+/-	++	++
	SKF-38393	+++	++++	+	+/-	+/-

Tableau I : Outils pharmacologiques utilisés dans l'étude du système dopaminergique (Adapté de Missale et al., 1998). Différents antagonistes et agonistes dopaminergiques sont ici fournis à titre d'exemples, afin de comprendre qu'il est souvent difficile d'effectuer une séparation pharmacologique nette entre les différents récepteurs. Les symboles + et - déterminent l'affinité relative d'une substance pour un récepteur donné. Le symbole ND signifie que les données ne sont pas disponibles pour une substance.

Les récepteurs de la DA (D_1 à D_5) font tous partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et contiennent sept passages transmembranaires (Probst et al., 1992). Les protéines G (pour *guanine nucleotide binding proteins* en anglais) sont des hétérotrimères liés à la membrane plasmique et constitués de sous-unités différentes, que l'on nomme $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Ces sous-unités ont comme fonction la transduction et l'intégration du signal à l'intérieur de la cellule. Lorsqu'un RCPG est activé par son ligand, les sous-unités des protéines G activent ou inhibent certains effecteurs enzymatiques comme la protéine kinase A ou C (PKA et PKC respectivement) et la phospholipase C (PLC). Les RCPG impliquent aussi la synthèse/production de seconds messagers comme l'AMPc, l'inositol triphosphates (IP_3) et le diacylglycérol (DAG) (Hildebrandt, 1997). Chez les mammifères, il existe 20 sortes de $G\alpha$ (comportant les familles α_s , α_{12} , $\alpha_{i/o}$ et α_q), 5 sortes de $G\beta$ (β_1 à β_5) et 12 sortes de $G\gamma$. Cette diversité permet l'expression de différentes combinaisons de protéines G à l'intérieur des cellules créant ainsi une spécificité d'action via les différents effecteurs et seconds messagers disponibles (Sato et al., 2006).

Le schéma classique veut que lorsque le RCPG est activé, il y a une séparation des sous-unités des protéines G : la sous-unité $G\alpha$ se sépare de la sous-unité $G\beta\gamma$. La sous-unité $G\alpha$ échange son GDP pour un GTP et procède à son activité de signalisation vers un effecteur spécifique, comme l'adénylate cyclase (Ross et al., 1978). Il est maintenant aussi reconnu que la sous-unité $G\beta\gamma$ est capable d'induire une signalisation, comme par exemple activer des conductances potassiques ou inhiber des conductances calciques (Logothetis et al., 1987; Hille, 2001). En résumé, les récepteurs couplés aux protéines G sont des

récepteurs métabotropes à activité relativement lente comparativement aux récepteurs ionotropes. Ils servent à moduler d'autres systèmes ainsi que certains canaux ioniques (Lachowicz et Sibley, 1997; Missale et al., 1998; Seamans et Yang, 2004). Les récepteurs de la classe D1 sont couplés aux sous-unités $G_{\alpha s}$ (Kimura et al., 1995a; Sidhu et Kimura, 1997), $G_{\alpha q}$ (Jin et al., 2001) et $G_{\alpha i}$, un type de $G_{\alpha s}$ (Zhuang et al., 2000). Les récepteurs de la classe D2 sont couplés aux sous-unités $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha o}$ (Lachowicz et Sibley, 1997; Seamans et Yang, 2004).

2.5.1 Les récepteurs de la famille D1

Les récepteurs de la classe D1 (D_1 et D_5) sont couplés positivement à l'adénylate cyclase. Lorsqu'il fut découvert initialement, le récepteur D_5 était aussi appelé D_{1B} puisqu'il ressemblait énormément au récepteur D_1 (qu'on proposait de nommer D_{1A}) (Tiberi et al., 1991). Aujourd'hui, cette nomenclature est abandonnée. Le récepteur D_1 contient 446 acides aminés, autant chez le rat que chez l'humain et est encodé par le chromosome 5. Le récepteur D_5 possède 475 acides aminés chez le rat et 477 chez l'humain et est encodé par le chromosome 4 (Dearry et al., 1990; Tiberi et al., 1991). D'un point de vue strictement pharmacologique, les récepteurs D_1 et D_5 sont très semblables (voir tableau I). Une des différences les plus marquantes entre ces deux récepteurs concerne la DA qui possède une affinité dix fois plus élevée pour le récepteur D_5 que pour le récepteur D_1 (Sunahara et al., 1991; Tiberi et al., 1991).

2.5.2 Les récepteurs de la famille D2

Les récepteurs de la classe D2 (D₂, D₃ et D₄) sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. Il existe deux isoformes du récepteur D₂ : l'isoforme long ou D_{2L} (L pour *long* en anglais) et l'isoforme court ou D_{2S} (S pour *short* en anglais). Les deux isoformes sont produites par épissage alternatif à partir du même gène localisé sur le chromosome 11 (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989). Le D_{2S} contient 415 acides aminés chez le rat et 414 chez l'humain. Le D_{2L} possède 29 acides aminés de plus dans la troisième boucle cytoplasmique ; il contient donc 444 acides aminés chez le rat et 443 chez l'humain. Il existe peu de différences entre ces deux isoformes. Sauf où il en sera fait mention, nous allons considérer à partir de maintenant le récepteur D₂ comme une entité unique. Seulement 17 acides aminés diffèrent entre le récepteur D₂ humain et celui du rat, ce qui donne une forte homologie (96 %) entre ces deux espèces (Dal Toso et al., 1989).

Le récepteur D₃ possède aussi différents isoformes. Chez le rat, il existe trois isoformes du récepteur D₃. Les deux premières sont non fonctionnelles, l'une possédant seulement 100 acides aminés et l'autre ne se liant pas à la DA (Giros et al., 1991). La troisième isoforme, qui est fonctionnelle, est responsable de l'activité pharmacologique du récepteur D₃. Les choses sont quelque peu différentes chez la souris car il existe deux isoformes fonctionnelles. Le récepteur D₃ «long» possède 21 acides aminés de plus dans la troisième boucle cytoplasmique¹ que le récepteur D₃ «court» (Fishburn et al., 1993). À ma connaissance, il n'existe aucune évidence démontrant l'existence de plusieurs isoformes

¹ On peut faire un corollaire entre les isoformes du récepteur D₂ et celles du récepteur D₃. Dans les deux cas, une insertion d'acides aminés dans la troisième boucle cytoplasmique est responsable de cette diversité.

fonctionnelles du récepteur D₃ chez les autres espèces. Le récepteur D₃ est encodé par le chromosome 3 et est constitué de 446 acides aminés chez le rat (l'isoforme fonctionnelle) et de 400 acides aminés chez l'humain (Sokoloff et al., 1990).

Chez l'humain, il existe un polymorphisme génétique intéressant dans le gène du récepteur D₄. Ce polymorphisme est causé par de multiples répétitions d'une séquence de 16 acides aminés dans la troisième boucle intracellulaire¹, ce qui confère aux variantes du récepteur D₄ humain des longueurs différentes (de 387 à 515 acides aminés) et des affinités différentes pour certains médicaments telle la clozapine (Van Tol et al., 1992). Notons que chez le rat, le récepteur D₄ possède seulement 385 acides aminés puisque ce polymorphisme n'a pas lieu.

¹ Il s'agit ici encore de la même boucle cytoplasmique qui différencie le récepteur D_{2L} du récepteur D_{2S} et le récepteur D_{3L} du récepteur D_{3S}.

2.5.3 Localisation des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau

Les méthodes d'imagerie histologique par hybridation *in situ*, par autoradiographie et par immunohistochimie ont permis de définir les territoires d'expression des différents récepteurs dopaminergiques. Les récepteurs de la famille D1 sont majoritairement localisés sur les membranes postsynaptiques¹ et sont peu ou pas localisés sur les neurones dopaminergiques eux-mêmes (Civelli et al., 1991; Huang et al., 1992; Vallone et al., 2000). Le récepteur D₁ est retrouvé en grande quantité dans le striatum, le noyau accumbens et les tubercules olfactifs, soit les cibles des terminaisons dopaminergiques des voies présentées à la figure 1 (Boyson et al., 1986; Dearry et al., 1990; Freneau et al., 1991; Weiner et al., 1991; Wamsley et al., 1992). Parmi les cinq récepteurs dopaminergiques, le récepteur D₁ est celui qui est le plus fortement exprimé dans le système nerveux. Pour sa part, le récepteur D₅ est peu exprimé dans le cerveau et est confiné à des régions précises telles que l'hippocampe et le thalamus (Tiberi et al., 1991; Meador-Woodruff et al., 1992). Les études immunohistochimiques montrent que dans le striatum, les neurones GABAergiques possèdent des récepteur D₁ et D₅ et que les interneurones cholinergiques possèdent seulement des récepteurs D₅ (Huang et al., 1992; Bergson et al., 1995).

Le récepteur D₂ est majoritairement localisé aux endroits recevant une innervation dopaminergique comme le striatum, le noyau accumbens et les tubercules olfactifs, mais aussi dans la SN et l'ATV, deux régions qui contiennent les corps cellulaires des neurones

¹ Dans le cadre d'une transmission volumétrique, les terminaisons sont majoritairement non synaptiques et on devrait plutôt parler de récepteurs extrasynaptiques. Le terme «postsynaptique» reste toutefois largement utilisé dans la littérature afin de définir les récepteurs qui ne sont pas sur les neurones dopaminergiques.

dopaminergiques (Le Moine et al., 1990; Bouthenet et al., 1991; Levey et al., 1993; Hersch et al., 1995; Le Moine et Bloch, 1995). Le récepteur D₂ est exprimé dans d'autres régions contenant des terminaisons dopaminergiques comme les cortex préfrontal, cingulaire, temporal et entorhinal ainsi que dans l'amygdale, l'hippocampe et l'hypothalamus (Bouthenet et al., 1991). Le récepteur D₃ est localisé dans les tubercules olfactifs, les îlots de Calleja, le noyau accumbens et le striatum (Sokoloff et al., 1990; Bouthenet et al., 1991; Ariano et Sibley, 1994). Le récepteur D₃ est aussi exprimé dans l'ATV et la SN, mais à des niveaux beaucoup moindres que le récepteur D₂ (Diaz et al., 1995). Enfin, le récepteur D₄ est localisé dans le cortex frontal, l'hypothalamus, le thalamus, le mésencéphale, les amygdales et la rétine, mais très peu dans le striatum (Van Tol et al., 1991; O'Malley et al., 1992).

L'étude des bases générales du système dopaminergique se termine sur cette note. Nous avons discuté, dans une première partie, des voies dopaminergiques importantes comme la voie nigrostriée et de leurs implications dans plusieurs pathologies humaines dont la maladie de Parkinson. Nous avons aussi décrit les bases biochimiques du métabolisme de la DA pour ensuite replacer ces concepts dans le contexte d'une terminaison dopaminergique fonctionnelle et de la transmission volumétrique. Nous avons par la suite discuté de l'effet pharmacologique de la DA via ses cinq récepteurs spécifiques. Comme l'étude du récepteur D₂ et sa fonction d'autorécepteur est le sujet du présent travail, nous allons maintenant discuter de ce point.

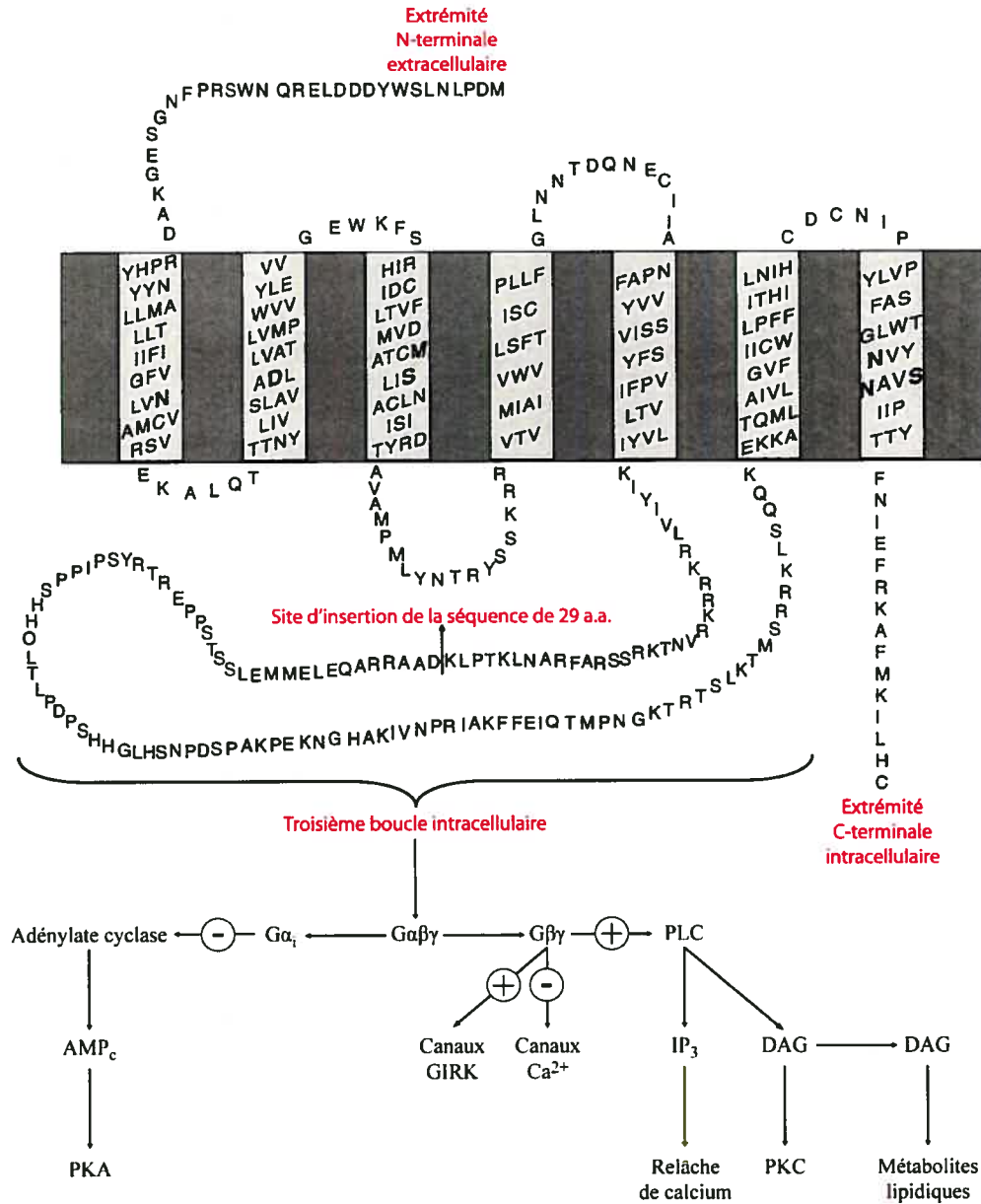


Figure 7 : Schématisation du récepteur D_{2S} humain (Adapté de : Hille, 2001; Neve et al., 2001). La séquence en acides aminés est présentée à l'aide du code à une lettre. Une séquence de 29 acides aminés (a.a.) s'insère entre la lysine (K) en position 241 et l'aspartate (D) en position 242, ce qui différencie l'isoforme D_{2L} de l'isoforme D_{2S}. Le récepteur D₂ contient sept passages transmembranaires. La troisième boucle cytoplasmique représente le site probable d'interaction avec les protéines G. Le récepteur D₂ interagit avec les protéines G_{i/o}. Les voies de signalisation possibles engendrées par ces protéines G sont schématisées.

3. L'autorécepteur D₂

3.1 Rôles de l'autorécepteur D₂

La relâche d'un neurotransmetteur dans le cerveau est normalement finement contrôlée par différentes stratégies. En effet, il n'est pas rare de voir plusieurs récepteurs ionotropes ou métabotropes influencer le fonctionnement d'un même neurone. Les hétérorécepteurs modulent positivement ou négativement le fonctionnement d'un neurone. Par exemple, le fonctionnement d'un neurone dopaminergique peut être modulé positivement par les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine ou négativement par les récepteurs muscariniques de type M₂ qu'il exprime à la surface de sa membrane (Langer, 1997). Le concept d'autorécepteurs diffère quelque peu puisque ces derniers sont uniquement localisés sur les membranes présynaptiques. Les autorécepteurs sont considérés comme un système de rétrocontrôle physiologique et modulent négativement le fonctionnement des neurones. Les récepteurs de la DA qui sont exprimés sur un neurone dopaminergique sont des autorécepteurs (Langer, 1997).

On sait depuis longtemps que les neurones dopaminergiques sont modulés par des autorécepteurs de type D₂ (Farnebo et Hamberger, 1971). La localisation du récepteur D₂ dans l'ATV et la SN suggère que ce dernier peut agir en tant qu'autorécepteur dans le compartiment somatodendritique (Meador-Woodruff et al., 1989; Weiner et al., 1991). Des études de colocalisation entre le récepteur D₂ et la TH, une enzyme importante dans la synthèse de la DA, prouvent que le récepteur D₂ est localisé sur les neurones

dopaminergiques tant au niveau terminal (ex. le striatum) que somatodendritique (ex. SN) (Aghajanian et Bunney, 1977; Sesack et al., 1994; Delle Donne et al., 1996). Toutes les observations convergent vers le fait que le récepteur D₂ peut agir en tant qu'autorécepteur.

Le récepteur D₂ est aussi localisé sur les membranes postsynaptiques. Par exemple, les neurones GABAergiques enképhalinergiques¹ du striatum expriment des récepteurs de la famille D₂, ce qui explique le rôle inhibiteur que la DA entretient vis-à-vis ce type de neurones (DeLong, 1990; Parent et Hazrati, 1995; Perez et al., 2006). Ainsi, il ne faut pas conclure que la seule fonction du récepteur D₂ est celle d'un autorécepteur. (Le Moine et al., 1990; Le Moine et Bloch, 1995; Delle Donne et al., 1997; Geldwert et al., 2006).

Le récepteur D₂ est un récepteur couplé aux protéines G et compte, par définition, sept passages transmembranaires (figure 7). Le récepteur D₂ fait partie de la famille des récepteurs D₂ et on connaît deux isoformes différentes de ce récepteur, soit l'isoforme D_{2L} et l'isoforme D_{2S} (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989). L'isoforme D_{2L} semble être plus abondante dans les tissus que l'isoforme D_{2S} (Dal Toso et al., 1989; Monsma et al., 1989). Par contre, dans les régions qui contiennent les corps cellulaires dopaminergiques du mésencéphale, l'isoforme D_{2S} est la plus abondante (Montmayeur et al., 1991; Khan et al., 1998). Les modèles de souris déficientes en D_{2L} nous proposent des conclusions très intéressantes. Dans ces modèles, les caractéristiques pharmacologiques d'autorécepteurs telles que l'inhibition de DA sont conservées. Par contre, la catalepsie induite par l'halopéridol, qu'on croit causée par les récepteurs D₂ postsynaptiques, est diminuée

¹ Les neurones GABAergiques contenant la substance P expriment pour leur part les récepteurs de la famille D₁, ce qui explique le rôle activateur de la DA sur ces neurones.

(Uziel et al., 2000; Wang et al., 2000). De plus, des études immunohistochimiques démontrent que le récepteur D_{2S} est exprimé majoritairement par les corps cellulaires, dendrites et axones des neurones dopaminergiques, tandis que le récepteur D_{2L} est majoritairement situé sur les neurones GABAergiques et cholinergiques du striatum (Khan et al., 1998). Ces données suggèrent que l'isoforme D_{2S} aurait la fonction d'autorécepteur, tandis que l'isoforme D_{2L} serait plutôt importante comme récepteur postsynaptique.

L'autorécepteur D₂ possède différentes fonctions physiologiques selon sa localisation anatomique. Les autorécepteurs D₂ situés sur les terminaisons¹ diminuent la quantité de DA libérée en inhibant la synthèse (Strait et Kuczenski, 1986; Onali et Olanas, 1989) et en réduisant la probabilité de relâche (L'Hirondel et al., 1998). D'ailleurs, l'application d'agonistes D₂ réduit les niveaux de DA dans le striatum, tandis que l'application d'antagonistes D₂ produit l'effet inverse (Stamford et al., 1991; Kennedy et al., 1992). Les autorécepteurs D₂ localisés dans le compartiment somatodendritique des neurones dopaminergiques² peuvent inhiber la fréquence de décharge de ces neurones (Aghajanian et Bunney, 1977; White et Wang, 1984; Grace et Bunney, 1985) et diminuer la relâche somatodendritique de DA (Kalivas et Duffy, 1991; Cragg et Greenfield, 1997). Des études *in vivo* démontrent que des injections d'agonistes ou d'antagonistes D₂ dans la SN peuvent respectivement diminuer ou augmenter les niveaux de DA dans le striatum (Santiago et Westerink, 1991). Il en résulte que l'activation des autorécepteurs D₂ somatodendritiques peut aussi avoir un impact sur la libération terminale de DA.

¹ Les termes «autorécepteurs D₂ terminaux» seront dorénavant employés pour décrire ces récepteurs.

² Les termes «autorécepteurs D₂ somatodendritiques» seront dorénavant employés pour décrire ces récepteurs.

3.2 Voies de signalisation intracellulaire

Le récepteur D₂ est couplé aux protéines G α i et G α o (Lachowicz et Sibley, 1997; Seamans et Yang, 2004). Les sous-unités G α i/o sont capables d'inhiber la production d'AMPc pour ensuite diminuer l'activité de la PKA. Les sous-unités G β γ peuvent moduler plusieurs autres effecteurs comme la PLC, la PKC et certains canaux ioniques (Neve et al., 2004). L'interaction entre les RCPG et les protéines G s'effectue généralement via la troisième boucle cytoplasmique (Strader et al., 1987). Des études de mutagenèse dirigée sur le récepteur D₂ démontrent aussi une importance mineure de la deuxième boucle intracellulaire (Kozell et al., 1994). Puisque la différence entre les récepteurs D_{2L} et D_{2S} s'effectue au niveau de cette troisième boucle cytoplasmique, on peut faire l'hypothèse que ces deux isoformes activent des voies différentes. Cette hypothèse pourrait d'ailleurs expliquer les différentes fonctions physiologiques remplies par le récepteur D₂. Par exemple, elle pourrait expliquer le rôle prépondérant de l'isoforme D_{2S} comme autorécepteur ainsi que celui de l'isoforme D_{2L} comme récepteur sur les membranes postsynaptiques.

Les études pharmacologiques sur des lignées cellulaires fournissent beaucoup d'informations quant aux voies de signalisation empruntées par les récepteurs. L'approche classique consiste à transfecter le récepteur d'intérêt dans une lignée cellulaire donnée et à étudier les voies de signalisation intracellulaire activées par différents agonistes. Ces modèles fournissent plusieurs résultats contradictoires pour le récepteur D₂, ce qui suggère

que les voies intracellulaires empruntées par ce récepteur sont dépendantes du type cellulaire.

On sait depuis longtemps que les récepteurs de la famille D₂ sont capables d'inhiber l'adénylate cyclase via les protéines G pour réduire les concentrations intracellulaires d'AMPc (Onali et al., 1985; Neve et al., 1989; Albert et al., 1990). L'isoforme D_{2S} possède un effet inhibiteur supérieur sur les niveaux d'AMPc que l'isoforme D_{2L} (Dal Toso et al., 1989; Hayes et al., 1992). Cette différence pourrait toutefois être causée par une expression plus importante de cette isoforme dans les systèmes cellulaires utilisés. Le récepteur D₂ est aussi capable d'agir sur les niveaux d'IP₃, un second messenger qui induit la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires. L'activation du récepteur D₂ peut entraîner une diminution des niveaux d'IP₃ dans les lignées cellulaires hypophysaires (Canonica et al., 1983; Simmonds et Strange, 1985; Enjalbert et al., 1986), mais peut à l'inverse augmenter les niveaux d'IP₃ dans les lignées cellulaires de fibroblastes (Vallar et al., 1990; Tang et al., 1994) ou tout simplement n'avoir aucun effet sur ce médiateur lorsqu'il s'agit de neurones dopaminergiques (Tang et al., 1994; Jomphe et al., 2006). Finalement, l'activation du récepteur D₂ peut induire une augmentation des niveaux d'acide arachidonique dans des cultures de neurones (Schinelli et al., 1994).

3.3 Mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂

L'objectif principal de nos travaux était l'élucidation du mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂. On sait qu'il existe au minimum trois classes de mécanismes distincts par lesquels les autorécepteurs peuvent moduler la relâche d'un neurotransmetteur : la modulation des canaux calciques, des canaux potassiques et de la machinerie vésiculaire d'exocytose (Langer, 1997; Miller, 1998). Ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent même s'additionner pour permettre un contrôle plus efficace. Il m'apparaît utile de revoir les notions de base concernant les canaux ioniques et la machinerie d'exocytose vésiculaire. Il sera ainsi plus facile de comprendre l'interaction entre l'autorécepteur D₂ et ces entités moléculaires.

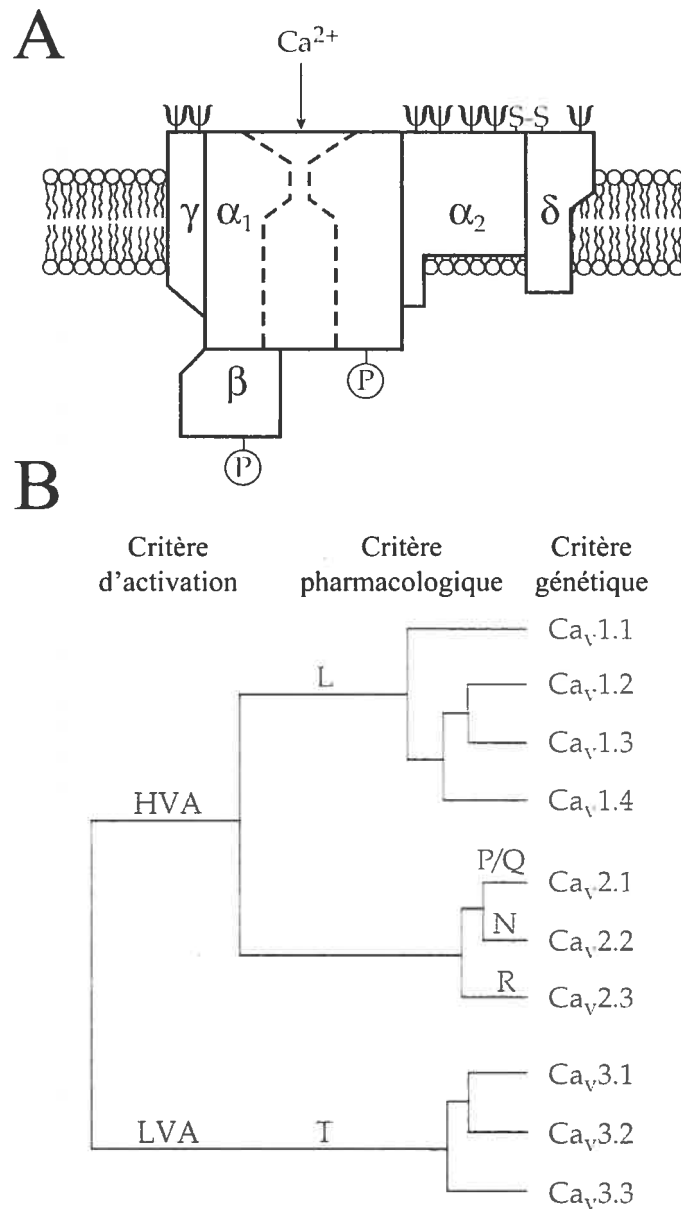


Figure 8 : Diversité moléculaire des canaux calciques (Adapté de Hille, 2001). **(A)** Schéma d'un canal calcique montrant les cinq sous-unités impliquées dans sa structure ($\alpha_1\alpha_2\beta\delta\gamma$). La sous-unité α_1 contient le pore sélectif au calcium. À part la sous-unité β , toutes les autres sous-unités sont transmembranaires. **(B)** La nomenclature des canaux calciques repose sur trois critères : le seuil d'activation, l'activité pharmacologique et l'analyse génétique par clonage. La nomenclature Ca_v1 à 3 détermine les dix sous-unités α_1 différentes.

3.3.1 Les canaux calciques

Les canaux calciques dépendants du voltage sont des protéines transmembranaires composées de plusieurs sous-unités qui permettent l'ouverture du pore sélectif au calcium sous l'action d'une dépolarisation membranaire (Ertel et al., 2000). La sous-unité $\alpha 1$ détermine les caractéristiques d'un canal calcique et contient le pore sélectif au calcium ainsi que les sites de régulation via les seconds messagers (figure 8). Les autres sous-unités, représentées par les lettres $\alpha 2\beta\delta\gamma$, modulent le fonctionnement de la sous-unité $\alpha 1$. Dix gènes différents encodent les dix sous-unités $\alpha 1$ différentes. Selon la nomenclature de l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR), on doit utiliser les abréviations $Ca_v1.x$ à $Ca_v3.x$ pour décrire ces différents gènes.

On peut séparer les canaux calciques par des critères pharmacologiques. Les quatre sous-unités de la classe Ca_v1 sont sensibles aux dihydropyridines (comme la nifédipine) et on les regroupe sous l'appellation commune «canaux calciques de type L». Les sous-unités $\alpha 1$ encodées par les gènes $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ et $Ca_v2.3$ sont insensibles aux dihydropyridines, mais sensibles à des toxines peptidiques isolées à partir d'araignées et de serpents. On dénomme respectivement ces sous-unités par les appellations «canaux calciques de type P/Q, N et R». Les trois sous-unités de la famille Ca_v3 sont insensibles aux toxines peptidiques et aux dihydropyridines et sont toutes appelées «canaux calciques de type T». On peut aussi séparer les canaux calciques par leur seuil d'activation. Les canaux LVA (pour *low voltage activated* en anglais) s'ouvrent après une petite dépolarisation, tandis qu'une grande dépolarisation est nécessaire pour ouvrir les canaux HVA (pour *high voltage*

activated en anglais). Les canaux calciques de type T sont activés par une petite dépolarisation alors que les canaux calciques de type L, P/Q, N et R sont activés par une grande dépolarisation.

Les RCPG peuvent moduler le fonctionnement des sous-unités Ca_v2 via les protéines $G\beta\gamma$ (Walker et De Waard, 1998; De Waard et al., 2005). Il est possible que les autorécepteurs D_2 terminaux puissent effectuer une partie de leur action en inhibant les canaux calciques de type P/Q, N ou R. Cette inhibition aurait comme conséquence une diminution de l'influx calcique nécessaire au déclenchement de l'exocytose vésiculaire. Les sous-unités Ca_v2 contrôlent d'ailleurs l'exocytose terminale de DA (Herdon et al., 1985; Woodward et al., 1988; Herdon et Nahorski, 1989; Kato et al., 1992; Yamada et al., 1993; Kimura et al., 1995b; Harvey et al., 1996; Prince et al., 1996; Dobrev et Andreas, 1997; Bergquist et al., 1998; Hirota et al., 2000; Phillips et Stamford, 2000; El Ayadi et al., 2001; Dobrev et Ravens, 2003). En accord avec cette affirmation, le récepteur D_2 est capable d'inhiber des conductances calciques dans des cellules lactotrophes, hypophysaires et des cellules hybrides neuroblastome-gliomes (Margaroli et al., 1987; Drouva et al., 1988; Vallar et al., 1990; Lledo et al., 1992; Seabrook et al., 1994b; Seabrook et al., 1994a). Le récepteur D_2 est aussi capable de réduire des courants calciques de type P/Q et N dans les neurones dopaminergiques (Cardozo et Bean, 1995).

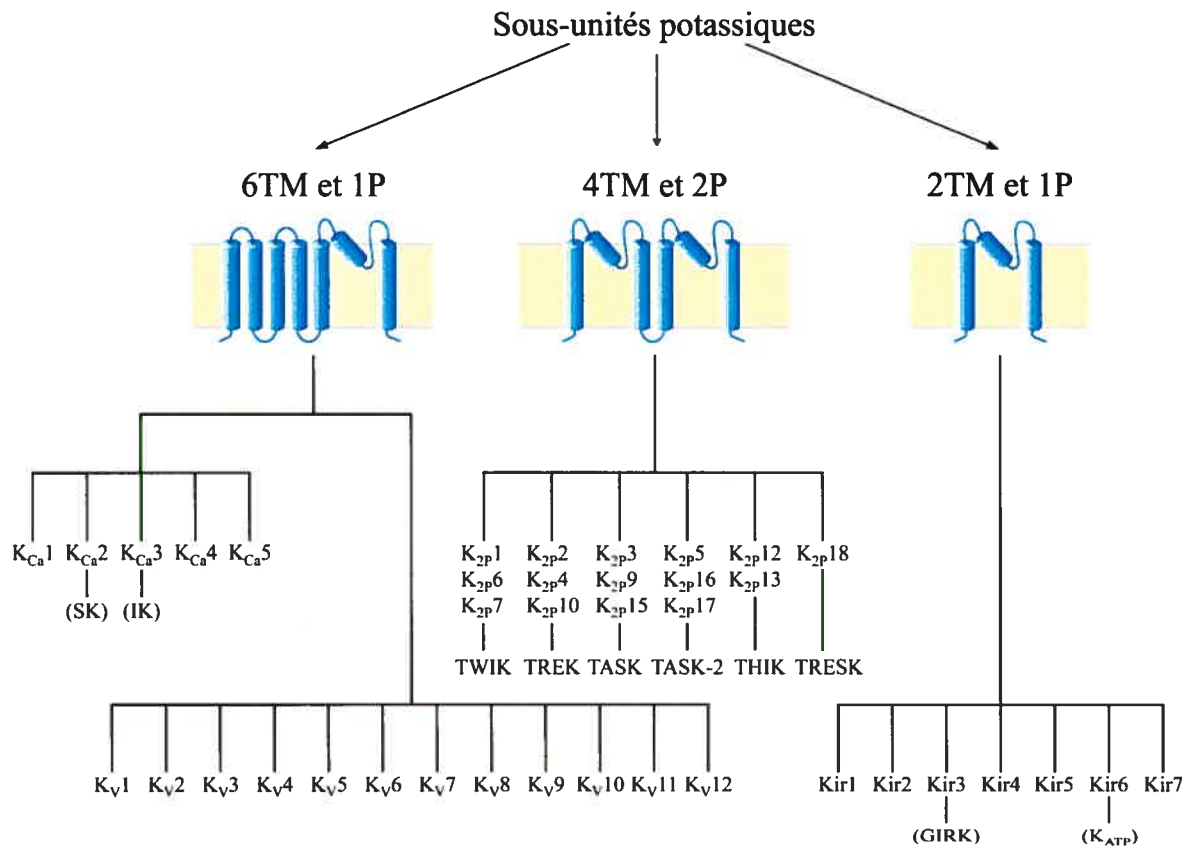


Figure 9: Diversité moléculaire des canaux potassiques (Adapté de Buckingham et al., 2005). Les canaux potassiques sont formés par l'assemblage de plusieurs sous-unités. La classification des sous-unités potassiques est basée sur le nombre de passages transmembranaires (TM) et le nombre de domaines formant le pore sélectif au potassium (P). Les canaux potassiques dépendants du voltage (K_v) ou sensibles au calcium (K_{Ca}) sont formés à partir de sous-unités comportant 6 TM et 1 P. Les sous-unités des canaux potassiques de fuite (K_{2p}) contiennent 4 TM et 2 P, tandis que celles des canaux potassiques à rectification entrante (Kir) possèdent 2 TM et 1 P. Un canal potassique fonctionnel doit comporter 4 P, peu importe le nombre de TM.

3.3.2 Les canaux potassiques

Les canaux potassiques arborent une très grande diversité comparativement aux autres canaux ioniques (Coetzee et al., 1999; Nerbonne, 2000; Hille, 2001; Dodson et Forsythe, 2004). Cette diversité leur confère plusieurs fonctions cellulaires. Les expériences classiques de Hodgkin et Huxley dans les années 1950 démontrèrent que les canaux potassiques sont importants dans la phase de repolarisation du potentiel d'action (Hodgkin et Huxley, 1952). Les canaux potassiques sont aussi importants afin de maintenir le potentiel de repos d'une membrane excitable et d'en déterminer l'excitabilité (Meir et al., 1999). Comme la relâche de DA est dépendante de l'activité électrique, il est possible que l'autorécepteur D₂ puisse activer certains canaux potassiques afin de moduler négativement l'activité électrique des neurones dopaminergiques (Miller, 1998). D'ailleurs, le récepteur D₂ peut augmenter des conductances potassiques dans les neurones de la SN, dans les cellules lactotrophes et dans les neurones striataux (Lacey et al., 1987, 1988; Vallar et Meldolesi, 1989). Une modulation positive des canaux potassiques engendrerait une réduction de la fréquence des potentiels d'action et par conséquent une diminution de l'influx calcique dans les terminaisons.

Les canaux potassiques sont constitués de plusieurs sous-unités (figure 9). Les sous-unités α sont les plus importantes et elles déterminent la fonction d'un canal potassique donné. Les sous-unités α doivent se combiner en multimères afin de former un canal potassique fonctionnel. Les neurones expriment plusieurs sous-unités α et il est presque impossible de répertorier la totalité des canaux potassiques. Il existe plus de 70 sous-unités

α différentes et ces dernières peuvent être constituées de deux, quatre ou six passages transmembranaires (Dodson et Forsythe, 2004). Nous introduirons ci-dessous les différentes classes de canaux potassiques, soit les canaux potassiques dépendants du voltage (K_V), activés par le calcium (K_{Ca}), de fuite (K_{2P}) et à rectification entrante (K_{ir}). La nomenclature de l'IUPHAR sera employée afin d'éviter toute confusion.

Familles	Nomenclature de l'IUPHAR	Remarques sur la structure
K _V 1	K _V 1.1 à K _V 1.8	Homotétramère et hétérotétramère
K _V 2	K _V 2.1 et K _V 2.2	Homotétramère et hétérotétramère
K _V 3	K _V 3.1 à K _V 3.4	Homotétramère
K _V 4	K _V 4.1 à K _V 4.3	Homotétramère
K _V 5	K _V 5.1	Hétérotétramère avec famille K _V 2 seulement
K _V 6	K _V 6.1 à K _V 6.4	Hétérotétramère avec famille K _V 2 seulement
K _V 7	K _V 7.1 à K _V 7.5	Homotétramère et hétérotétramère
K _V 8	K _V 8.1 et K _V 8.2	Hétérotétramère avec famille K _V 2 seulement
K _V 9	K _V 9.1 à K _V 9.3	Hétérotétramère avec famille K _V 2 seulement
K _V 10	K _V 10.1 et K _V 10.2	Homotétramère et hétérotétramère
K _V 11	K _V 11.1 à K _V 11.3	Homotétramère
K _V 12	K _V 12.1 à K _V 12.3	Homotétramère

Tableau II : Sous-unités des canaux potassiques dépendants du voltage. Il existe 12 familles de sous-unités K_V. Certaines sous-unités s'assemblent seulement à l'intérieur d'une même famille comme les K_V3, d'autres peuvent former des hétérotétramères avec d'autres familles comme les K_V5, 6, 8 et 9.

Les canaux K_V sont les canaux potassiques qui arborent la plus grande diversité. Ils sont tous constitués de sous-unités comportant six passages transmembranaires (Dodson et Forsythe, 2004). À ce jour, on connaît 40 gènes qui encodent chacun une sous-unité K_V différente. On regroupe ces gènes en 12 familles, nommées K_V1 à K_V12 (Gutman et al., 2005) (voir figure 9 et tableau II). Le tableau II montre l'organisation des différentes sous-unités à l'intérieur de chaque famille. Un canal potassique K_V fonctionnel est un tétramère. Certaines familles de K_V forment des homotétramères seulement à l'intérieur de leur propre famille¹, tandis que d'autres peuvent former des hétérotétramères à l'intérieur de leur famille². Les familles K_V5 , 6, 8 et 9 ne sont pas fonctionnelles lorsqu'elles forment des homotétramères. Elles peuvent toutefois former des hétérotétramères avec la famille K_V2 et ainsi modifier les caractéristiques du canal résultant. En suivant ces règles, les différentes possibilités de canaux potassiques K_V fonctionnels sont immenses (Gutman et al., 2005).

Les canaux K_V sont modulés par des sous-unités $K_V\beta$ associées, par le calcium (via la calmoduline), par la phosphorylation et par plusieurs autres mécanismes. Fonctionnellement, les canaux K_V sont responsables de trois types de courants dans les membranes excitables : les courants potassiques activés par une petite dépolarisation, ceux activés par une grande dépolarisation et finalement, les courants transitoires sortants, aussi appelés courants A (Nerbonne, 2000). Ces différents courants sont responsables de phases différentes du potentiel d'action et par conséquent, modulent l'excitabilité des membranes neuronales (Dodson et Forsythe, 2004). Ces fonctions névralgiques que les canaux K_V

¹ Prenons l'exemple des K_V3 : un canal potassique formé par quatre sous-unités $K_V3.1$ est possible, mais un canal formé par l'association de sous-unités $K_V3.1$ et $K_V3.2$ est impossible.

² Prenons l'exemple des K_V1 : un canal potassique formé par quatre sous-unités $K_V1.1$ est possible et un canal formé par l'association de sous-unités $K_V1.1$ et $K_V1.2$ est aussi possible.

possèdent les désignent comme des candidats idéaux pour une régulation éventuelle de la libération de DA via l'autorécepteur D₂.

Les canaux potassiques sensibles au calcium (K_{Ca}) font partie de la même famille que les canaux K_V et sont aussi formés de sous-unités comportant six domaines transmembranaires. Les canaux K_{Ca} sont séparés en deux groupes (Wei et al., 2005). Le premier groupe de canaux K_{Ca} est formé par les sous-unités $K_{Ca}1.1$, 4.2, 4.2 et 5.1. La sous-unité $K_{Ca}1.1$ est activée par des niveaux élevés de calcium intracellulaire (n'implique pas la calmoduline) et possède une dépendance au voltage. Les sous-unités $K_{Ca}4.1$ et 4.2 sont activées par le sodium et le chlore, mais ne le sont pas par le calcium. Finalement, la sous-unité $K_{Ca}5.1$ est activée à des pH alcalins.

Le second groupe est formé par les sous-unités $K_{Ca}2.1$, 2.2, 2.3 et 3.1 (figure 9). Les sous-unités $K_{Ca}2.1$, 2.2 et 2.3 donnent naissance à de petites conductances (SK pour *small-conductance* en anglais). La sous-unité $K_{Ca}3.1$ est responsable d'une conductance intermédiaire (IK pour *intermediate-conductance* en anglais). Les sous-unités K_{Ca} de ce premier groupe détectent les niveaux intracellulaires de calcium à l'aide de la calmoduline qui leur est associée. Ces sous-unités sont activées lorsque les concentrations intracellulaires de calcium augmentent. Les conductances SK sont présentes dans le système nerveux central et sont responsables de la phase d'hyperpolarisation suivant un potentiel d'action (AHP). À ce niveau, ces sous-unités ont un rôle à jouer dans l'excitabilité des membranes, ce qui, encore une fois, ouvre la porte à une possible interaction entre l'autorécepteur D_2 et ces canaux (Stocker, 2004; Stocker et al., 2004).

Familles	Nomenclature de l'IUPHAR
TWIK	K _{2P} 1.1, K _{2P} 6.1, K _{2P} 7.1
TREK	K _{2P} 2.1, K _{2P} 4.1, K _{2P} 10.1
TASK	K _{2P} 3.1, K _{2P} 9.1, K _{2P} 15.1
TASK-2	K _{2P} 5.1, K _{2P} 16.1, K _{2P} 17.1
THIK	K _{2P} 12.1, K _{2P} 13.1
TRESK	K _{2P} 18.1

Tableau III : Sous-unités des canaux potassiques de fuite.

Les canaux potassiques de fuite sont constitués de sous-unités K_{2P} comportant deux domaines formant le pore sélectif au potassium ainsi que de quatre passages transmembranaires (figure 9). Pour être fonctionnelles, ces sous-unités doivent se dimériser, ce qui crée un canal potassique possédant au total huit passages transmembranaires (Lesage et al., 1997). Chez les mammifères, il existe quinze gènes encodant chacun une sous-unité K_{2P}. Ces gènes sont regroupés en six familles (Goldstein et al., 2005) (voir tableau III). Les canaux K_{2P} sont constitutivement ouverts dans les membranes excitables au repos (Lesage et Lazdunski, 2000). Ils amènent le potentiel membranaire vers le potentiel d'équilibre du potassium, soit vers -75 mV¹. Hodgkin et Huxley avaient prédit l'existence de tels canaux dans leurs célèbres études (Hodgkin et Huxley, 1952). Les canaux K_{2P} sont exprimés dans le cerveau et sont impliqués dans le maintien du potentiel membranaire. Les canaux K_{2P} peuvent être modulés par plusieurs

¹ $58\text{mV} \times \log \left(\frac{[\text{K}^+]_{\text{extracellulaire}}}{[\text{K}^+]_{\text{intracellulaire}}} \right)$, soit l'équation de Nernst.

facteurs, dont le pH, l'oxygène, les anesthésiques et l'acide arachidonique (Fink et al., 1998; Buckingham et al., 2005). Étant donné leur fonction dans la régulation de l'excitabilité neuronale et leur régulation par des seconds messagers que le récepteur D₂ peut contrôler, il n'est pas impossible que les canaux potassiques de fuite soient impliqués dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂. Quelques membres de cette classe peuvent d'ailleurs être contrôlés par des RCPG, soit à la baisse via les G_{aq} et G_{as}, soit à la hausse via les G_{ai} (Lesage et al., 2000; Chen et al., 2006b).

Familles	Nomenclature de l'IUPHAR
Kir1	Kir1.1
Kir2	Kir2.1 à Kir2.4
Kir3	Kir3.1 à Kir3.4
Kir4	Kir4.1 et Kir4.2
Kir5	Kir5.1
Kir6	Kir6.1 et Kir6.2
Kir7	Kir7.1

Tableau IV : Sous-unités des canaux potassiques à rectification entrante. Les sous-unités Kir2 à Kir4 donnent naissance à une rectification entrante forte, tandis que les sous-unités Kir1, Kir6 et Kir7 produisent une rectification entrante faible.

Les canaux potassiques à rectification entrante (Kir) forment la troisième et dernière classe de canaux potassiques (figure 9). Les Kir sont constitués de sous-unités possédant deux passages transmembranaires. Il existe quinze sous-unités différentes réparties en sept familles (Kir1 à Kir7) (Kubo et al., 2005). Un canal Kir fonctionnel possède quatre sous-unités Kir. Le tableau IV explique la nomenclature des canaux Kir. Au niveau fonctionnel, les canaux Kir donnent naissance à un courant potassique entrant plutôt que sortant. Lorsque la membrane est dépolarisée, l'efflux de potassium à travers les Kir est bloqué par des ions tels que le magnésium. Le courant entrant a lieu lorsque le potentiel membranaire est plus négatif que le potentiel d'équilibre du potassium (par exemple entre deux potentiels

d'action). Les canaux Kir ont un rôle à jouer dans le potentiel membranaire de repos et l'excitabilité cellulaire (Lu, 2004). Il existe des canaux à rectification entrante forte (Kir2-3-4) et à rectification entrante faible (Kir1 et Kir6-7), ce qui permet aux cellules de générer des réponses différentes aux multiples stimuli (Bichet et al., 2003).

Puisque les Kir modulent l'excitabilité membranaire, il est possible que les autorécepteurs D₂ puissent agir via ces derniers pour diminuer la relâche de DA. D'ailleurs, deux familles de sous-unités Kir forment des canaux potassiques dont la régulation est différente : les Kir3 et les Kir6. Les Kir3, qu'on appelle canaux GIRK (pour *G protein-gated inwardly rectifying potassium channels* en anglais), forment des canaux à rectification entrante qui sont activés par les protéines G $\beta\gamma$. Les Kir6 aussi appelés K_{ATP}, forment des canaux à rectification entrante qui sont activés par des niveaux faibles d'ATP intracellulaire (Bichet et al., 2003). Ce phénotype est rendu possible grâce aux sous-unités auxiliaires SUR1 et SUR2 qui s'associent aux K_{ATP} (Coetzee et al., 1999). Les K_{ATP} sont importants dans la régulation de la sécrétion de l'insuline et ce mécanisme est particulièrement intéressant. Une concentration élevée de glucose à l'intérieur des cellules pancréatiques (par exemple après un repas copieux) cause une élévation de l'ATP intracellulaire, ce qui entraîne la fermeture des K_{ATP} et une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation active des canaux calciques dépendants du voltage et l'entrée de calcium subséquente provoque l'exocytose des vésicules d'insuline (Greenspan et Gardner, 2004).

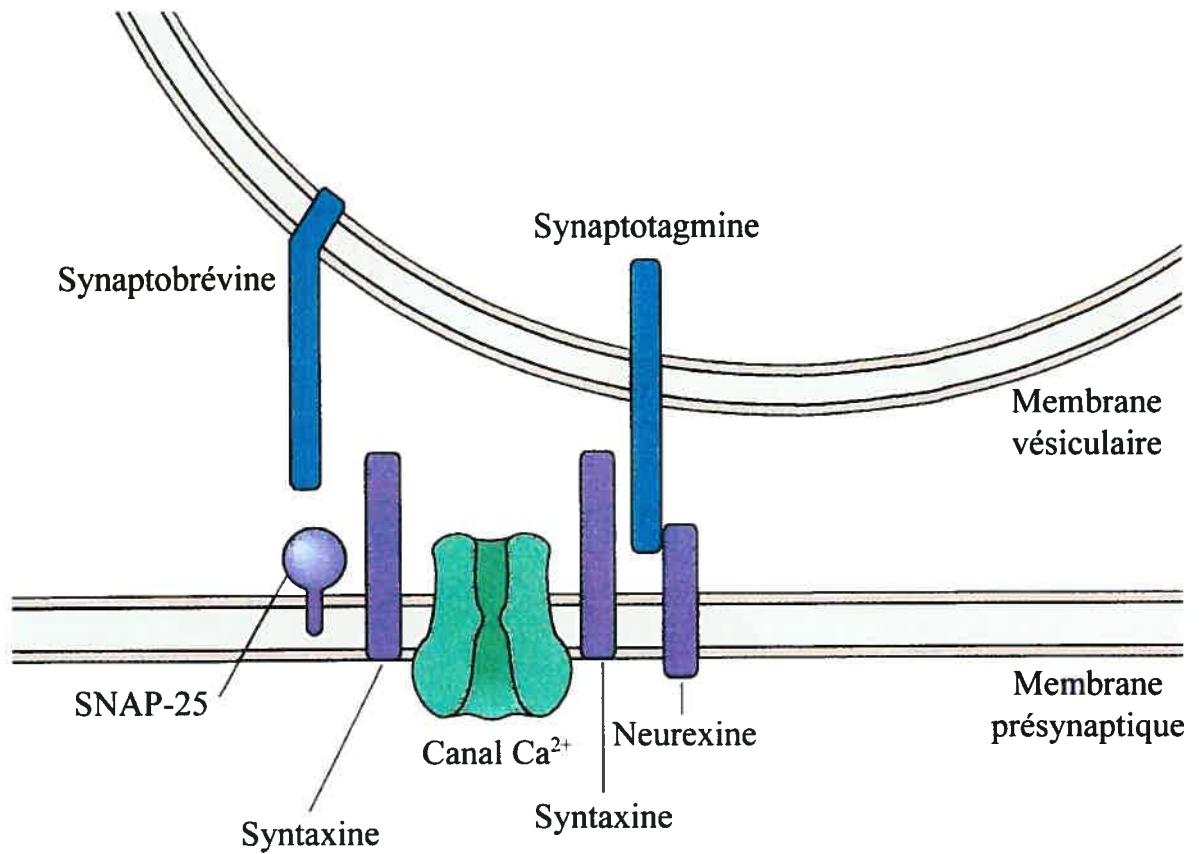


Figure 10 : Protéines impliquées dans l'exocytose vésiculaire (Adapté de Kandel et al., 2000). Les protéines de la famille des SNARE (syntaxine, SNAP-25 et synaptobrévine) sont impliquées dans l'amarrage des vésicules à la zone active. La protéine synaptotagmine, située directement sur la membrane des vésicules, possède un rôle dans la détection des niveaux de calcium. Les canaux calciques (Ca²⁺) sont des partenaires de liaison des protéines SNARE.

3.3.3 La machinerie d'exocytose vésiculaire

Dans une terminaison neuronale, les vésicules synaptiques sont localisées à la zone active à proximité de la membrane présynaptique et peuvent se fusionner rapidement lorsque les concentrations de calcium s'élèvent (Zucker, 1996). La machinerie d'exocytose qui est impliquée dans ce processus comporte plusieurs protéines. Les protéines de la famille des SNARE (syntaxine, SNAP-25 et synaptobrevine) sont impliquées dans l'amarrage des vésicules à la zone active et ont aussi un rôle à jouer dans la fusion de ces dernières (Sollner et al., 1993; Rizo et Sudhof, 2002; Brunger, 2005). La protéine synaptotagmine est située directement sur la membrane des vésicules. Cette protéine est sensible aux niveaux de calcium et c'est grâce à cette protéine que le complexe de fusion vésiculaire répond aux élévations de calcium (Sudhof, 2002). Plusieurs autres protéines sont importantes dans le mécanisme d'exocytose. Mentionnons, à titre indicatif, les protéines synaptophysine, munc18, munc13 et NSF (Brunger, 2005).

Le lien entre les différentes protéines d'exocytose et les canaux ioniques est probablement plus serré qu'on le croyait auparavant. Les protéines SNARE sont des partenaires de liaison des canaux calciques (Catterall, 1999). Cette association pourrait permettre une élévation localisée de la concentration de calcium, ce qui est nécessaire au processus d'exocytose. Cette interaction permet aux protéines SNARE d'affecter la fonction des canaux calciques (Atlas et al., 2001). Certains canaux K_v ont aussi comme partenaires de liaison des protéines de la machinerie d'exocytose telles que SNAP-25 et syntaxine (Ji et al., 2002; Leung et al., 2003). Cette association privilégiée entre les

composantes de l'exocytose et les canaux ioniques pourrait permettre aux autorécepteurs D₂ d'avoir une action globale sur ces complexes. Il est aussi possible que les autorécepteurs D₂ puissent agir directement sur les protéines de l'exocytose afin de diminuer la probabilité de fusion des vésicules (Dobrunz et Stevens, 1997; Miller, 1998).

4. Données récentes et objectifs de l'étude

Le récepteur D₂ est capable d'agir en tant qu'autorécepteur dans deux compartiments bien distincts. Dans le compartiment somatodendritique, il diminue la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques, mais aussi la libération somatodendritique de dopamine. Dans le compartiment terminal, il diminue la relâche de dopamine par les terminaisons axonales. Nous avons décrit, dans les sections précédentes, la grande diversité des canaux ioniques localisés dans les terminaisons axonales et avons tenté de démontrer comment l'autorécepteur D₂ pourrait agir via les canaux potassiques et/ou calciques afin de réduire la libération de DA. De plus, nous avons admis qu'il est possible que cet autorécepteur agisse directement sur le processus d'exocytose. Les études publiées à ce jour accordent généralement beaucoup d'importance aux canaux calciques et à la machinerie d'exocytose, le rôle des canaux potassiques étant souvent laissé-pour-compte (Dittman et Regehr, 1996; Wu et Saggau, 1997; Miller, 1998).

La littérature sur l'autorécepteur D₂ somatodendritique propose que ses effets passent par l'activation de canaux potassiques de type GIRK (Lacey et al., 1987; Inanobe et al., 1999; Uchida et al., 2000). Par ailleurs, une étude récente de notre laboratoire effectuée à l'aide d'un modèle de neurones dopaminergiques en culture, a montré que l'efficacité du récepteur D₂ à inhiber la libération terminale de neurotransmetteurs est fortement diminuée en présence de 4-aminopyridine (4-AP) et de barium, deux bloqueurs potassiques à large spectre (Congar et al., 2002). À l'aide d'un ionophore calcique, cette étude suggère aussi

que l'autorécepteur D₂ inhibe la libération terminale en agissant directement sur la machinerie d'exocytose. Globalement, les travaux de Congar suggèrent que l'action de l'autorécepteur D₂ porte sur les canaux potassiques et la machinerie d'exocytose, tandis qu'aucun rôle pour les canaux calciques des terminaisons n'a pu être mis en évidence.

Le mécanisme moléculaire complet de l'autorécepteur D₂ terminal *in situ* reste encore inconnu et l'objectif du présent travail est de comprendre la régulation de la sécrétion de DA par ces autorécepteurs terminaux. Pour ce faire, nous avons utilisé des coupes de striatum, une structure cérébrale recevant une forte innervation dopaminergique provenant de la SNc. Nous avons évoqué la décharge de DA par des stimulations de nature électrique et avons dosé ce neurotransmetteur en temps réel avec la méthode de voltamétrie cyclique. Ce modèle est particulièrement intéressant afin d'étudier l'autorécepteur D₂ terminal puisque l'autorécepteur D₂ somatodendritique y est absent ; les corps cellulaires sont séparés et éliminés lors de la préparation des coupes de cerveau.

Basés sur les expériences réalisées récemment dans notre laboratoire et que nous avons décrites ci-dessus, l'hypothèse principale est qu'une activation des autorécepteurs D₂ terminaux entraînera l'ouverture de canaux potassiques, ce qui résultera en une diminution de la libération terminale de DA (Congar et al., 2002). Par contre, nous avançons également l'hypothèse d'une implication des canaux calciques dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂ terminal. Certains auteurs ont démontré que le récepteur D₂ est capable d'inhiber des courants calciques au niveau somatodendritique dans les neurones dopaminergiques (Cardozo et Bean, 1995). L'inhibition d'un second type de canal ionique

au niveau terminal, en l'occurrence les canaux calciques, pourrait être particulièrement efficace afin d'inhiber rapidement la relâche de DA. De plus, plusieurs autres récepteurs présynaptiques sont capables d'utiliser cette stratégie afin de contrôler la libération terminale d'un neurotransmetteur (Miller, 1998). Nous proposons donc l'hypothèse d'un double mécanisme d'action ; soit une activation des canaux potassiques et une inhibition simultanée des canaux calciques.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé la technique de voltamétrie cyclique sur des coupes de striatum afin de doser la DA en temps réel. Le quinpirole, un agoniste D_2 , a été utilisé pour produire une activation des autorécepteurs D_2 qui sont exprimés sur les terminaisons dopaminergiques. Nous avons comparé l'effet quantitatif du quinpirole en absence et en présence d'antagonistes potassiques ou calciques afin de comprendre le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 . Nous avons opté pour l'utilisation de plusieurs toxines spécifiques à certaines sous-unités potassiques de type K_v , soit la rMargatoxin, l' α -Dendrotoxine et la rHétéropodatoxine-2, ainsi que pour des toxines spécifiques à certains canaux calciques, comme l' ω -Conotoxine GVIA et l' ω -Agatoxine IVA. Cette approche a permis d'évaluer le rôle respectif des canaux potassiques et des canaux calciques dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 .

MÉTHODOLOGIE

5. Les techniques électrochimiques

Puisqu'une partie non négligeable de ce travail consistait à développer et mettre au point la technique employée dans l'acquisition des données de l'article, il m'apparaît indispensable d'y consacrer une portion de ce mémoire. Les instruments et les méthodes nécessaires à l'élaboration du modèle expérimental sont énumérés dans l'article. Dans cette section, nous aborderons les principes théoriques sous-tendant les techniques électrochimiques afin de permettre une bonne compréhension et une interprétation juste des résultats qui sont présentés dans la prochaine section. Les avantages des techniques électrochimiques sont nombreux. En résumé, la voltamétrie cyclique permet d'identifier la substance mesurée, tandis que l'ampérométrie possède une meilleure résolution temporelle. Ces deux techniques ne sont pas invasives au niveau cellulaire. Il est ainsi possible d'étudier des mécanismes moléculaires sans en modifier le fonctionnement, ce que nous avons fait pour l'étude du mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂.

5.1 Utilité des techniques électrochimiques

En guise d'introduction, mentionnons que la voltamétrie cyclique et l'ampérométrie sont des techniques électrochimiques qui utilisent des électrodes à fibre de carbone afin de doser différents composés oxydables. Les monoamines, soit l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine, la sérotonine et l'histamine, sont des composés oxydables. Au début des années 1990, les techniques électrochimiques ont été employées afin de caractériser le processus d'exocytose des neurotransmetteurs. Elles ont permis d'observer en temps réel la sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline à partir de cellules chromaffines surrenaliennes et ainsi mettre un poids de plus dans l'hypothèse vésiculaire de l'exocytose (Leszczyszyn et al., 1990; Wightman et al., 1991; Ciolkowski et al., 1992). La détection de ces deux catécholamines est aussi possible dans le cerveau (Tso et al., 2004; Yavich et al., 2005).

Les techniques électrochimiques sont utilisées depuis de nombreuses années afin de mesurer la libération *in vivo* et *in vitro* de DA dans le tissu cérébral (Stamford et al., 1984; Millar et al., 1985; Kuhr et Wightman, 1986; Schmitz et al., 2001; Robinson et al., 2003; Robinson et al., 2004). Les techniques électrochimiques ont aussi été utilisées afin de mesurer et de quantifier l'histamine libérée par des mastocytes (Pihel et al., 1995; Pihel et al., 1996; Pihel et al., 1998; Sarada et al., 2000) et pour doser la sérotonine dans plusieurs situations (Rice et al., 1994; Pihel et al., 1995; Pihel et al., 1996; Rice et al., 1997; Pihel et al., 1998; Sarada et al., 2000). Mentionnons rapidement qu'il est possible de doser plusieurs autres substances. On peut par exemple quantifier le contenu en tryptophane et en

tyrosine d'une protéine, puisque ce sont deux acides aminés oxydables (Kizek et al., 2005). On peut aussi doser l'insuline (Cheng et al., 2001), le zinc (Maghasi et al., 2003) et le monoxyde d'azote dans diverses préparations (Burlet et Cespuglio, 1997; Rivot et al., 1999; Crespi et al., 2001). Finalement, les concentrations de glutamate et d'acétylcholine (deux neurotransmetteurs *non* oxydables) peuvent être mesurées à l'aide des techniques électrochimiques (Alfonta et al., 2000; Karyakin et al., 2000). Pour ce faire, il faut coupler une enzyme à l'électrode d'enregistrement et la détection se fait alors de manière indirecte (Willner et al., 2002). Par exemple, la concentration basale de glutamate mesurée avec les techniques électrochimiques dans le striatum avoisine les $2,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$, ce qui est compatible avec les résultats obtenus en microdialyse (Rahman et al., 2005).

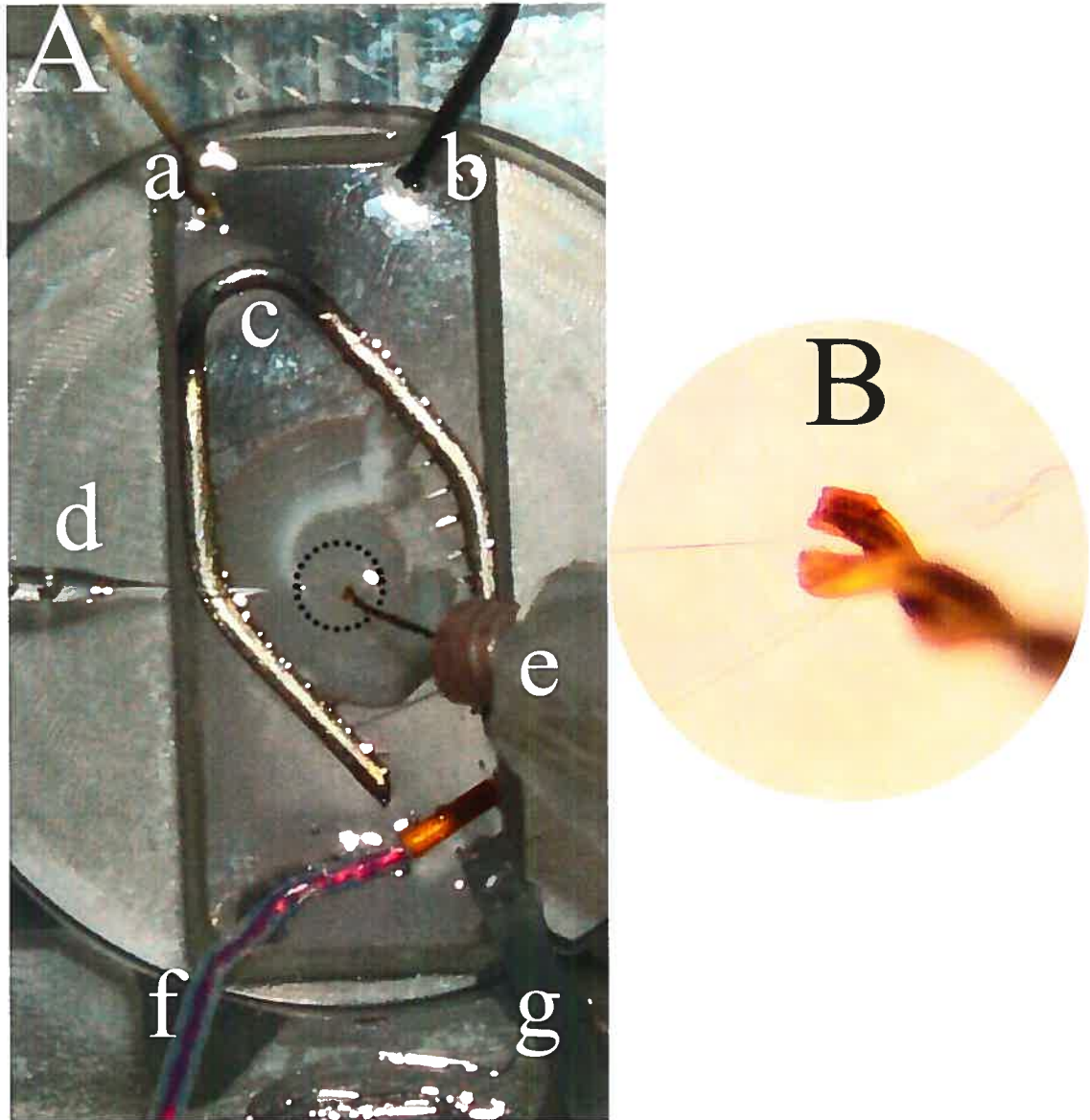


Figure 11 : Voltamétrie cyclique sur coupe de striatum de rat. **(A)** Disposition du poste d'électrochimie : a, mise à terre ; b, aspiration ; c, coupe de striatum retenue par un filet ; d, électrode à fibre de carbone contenant l'électrode de référence (non montré) ; e, électrode bipolaire de stimulation ; f, sonde du thermomètre ; g, perfusion. **(B)** Vue au microscope (~50 X) montrant la surface d'une coupe de striatum (cercle pointillé en A). Une fibre de carbone (gauche) permet de doser la dopamine stimulée électriquement à l'aide d'une électrode bipolaire (droite).

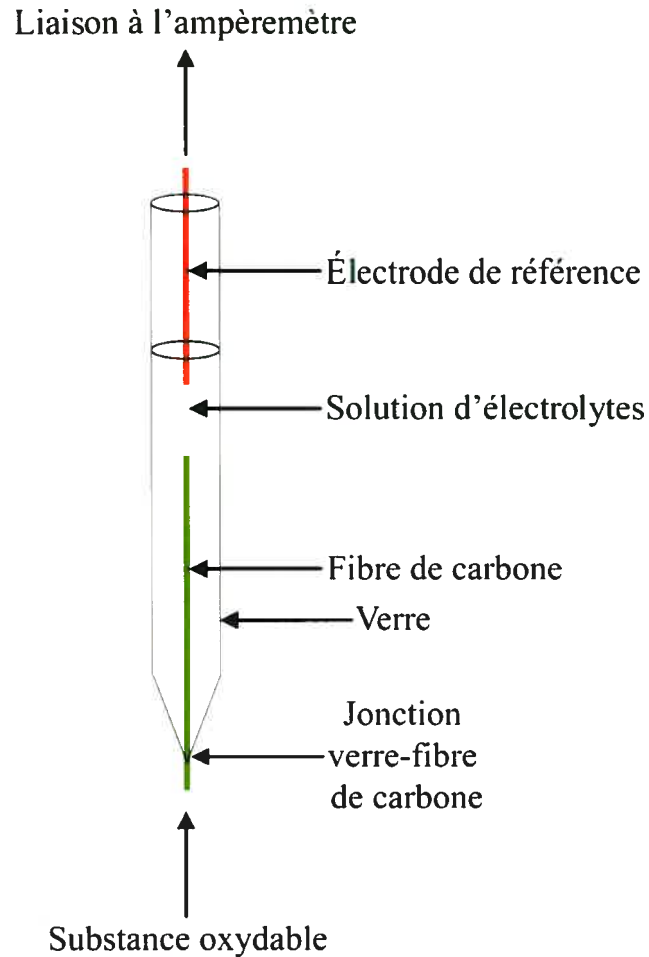


Figure 12 : Schématisation d'une électrode d'enregistrement. Il existe deux types d'électrodes électrochimiques : les électrodes en disque (non montrées) et les électrodes cylindriques (représentées dans le schéma). Une fibre de carbone (vert) est insérée à l'intérieur d'un capillaire de verre et permet de doser une substance oxydable présente à l'extérieur du verre. Le transfert d'électrons entre la fibre de carbone et l'électrode de référence (orange) a lieu grâce à une solution d'électrolytes qui fait le lien entre ces deux composantes. Un ampèremètre est ensuite utilisé afin de mesurer les courants associés au transfert d'électrons.

5.2 Principes théoriques

Les instruments essentiels à la mise au point d'un poste d'électrochimie sont les suivants : une électrode d'enregistrement, une source de voltage et un ampèremètre. La figure 11 montre la disposition de ces instruments lors d'une expérience effectuée sur une coupe de striatum de rat. Une électrode électrochimique d'enregistrement (figure 12), consiste en une fibre de carbone emprisonnée à l'intérieur d'un tube de verre et d'une électrode de référence. Le carbone est utilisé puisqu'il est stable en milieu biologique (Hochstetler et Wightman, 1998). Il existe deux types d'électrodes électrochimiques. Les électrodes en cylindre permettent à la fibre de carbone de sortir à l'extérieur du verre. Ce type d'électrodes est utilisé pour doser la DA chez des animaux vivants ou sur des coupes de cerveau. Les électrodes en disque constituent le deuxième type d'électrodes électrochimiques et sont construites en coupant directement la jonction verre-fibre de carbone à l'aide d'un appareillage très précis. Ainsi, la fibre de carbone ne s'étend pas à l'extérieur du verre et on obtient une petite surface d'échange fournissant une résolution spatiale très élevée, ce qui est utile dans le cas d'enregistrements effectués sur une seule cellule.

L'électrode de référence couramment utilisée est une tige d'argent recouverte par une gaine de chlore et on la nomme «électrode Ag/AgCl» (figure 12). Dans cette configuration, l'électrode Ag/AgCl est capable de maintenir un potentiel constant, même si un faible courant passe à travers celle-ci. Par convention, l'électrode Ag/AgCl possède un potentiel de +0,197 V par rapport à l'électrode NHE (pour *normal hydrogen electrode* en

anglais) qui possède un potentiel de 0 V (Hochstetler et Wightman, 1998). Comme tous les potentiels sont généralement exprimés par rapport à l'électrode Ag/AgCl, le potentiel de cette électrode peut être défini comme étant 0 V. Si nous disons : «- 400 mV vs Ag/AgCl», c'est que le potentiel de -400 mV est comparé au 0 V de l'électrode Ag/AgCl.

A. Oxydation d'une substance

Substance réduite \rightarrow Substance oxydée + électrons

B. Réduction d'une substance

Substance oxydée + électrons \rightarrow Substance réduite

C. Oxydo-réduction de la dopamine

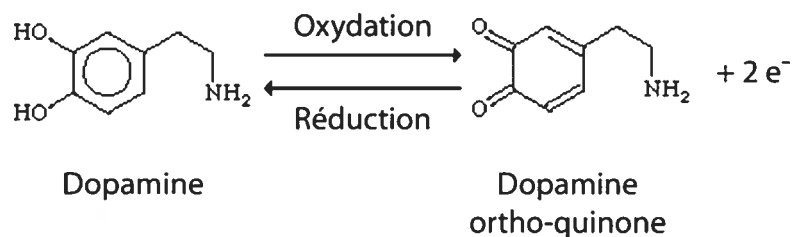


Figure 13 : L'oxydo-réduction de la dopamine (A) Durant l'oxydation, une molécule perd des électrons. (B) Durant la réduction, une molécule gagne des électrons. (C) Lors de son oxydation, la dopamine perd deux électrons et il en résulte la formation de dopamine ortho-quinone, soit la forme oxydée de la dopamine.

Monoamines	Pic(s) d'oxydation (mV vs Ag/AgCl)	Pic(s) de réduction (mV vs Ag/AgCl)
Dopamine	+ 500	- 400
Adrénaline	+ 500	- 100 et - 400
Noradrénaline	+ 500	- 100
Sérotonine	+ 500	- 100 et - 800
Histamine	+ 800 et + 1300	ND

Tableau V : Profils d'oxydo-réduction des monoamines. Les caractéristiques physico-chimiques d'un neurotransmetteur oxydable font en sorte que les processus d'oxydation et de réduction sont maximaux à certains potentiels (pics d'oxydation ou de réduction). Les données ont été obtenues à partir de plusieurs articles de voltamétrie cyclique. La position des pics d'oxydation et de réduction déterminent le profil d'oxydo-réduction d'une substance. Les différences entre les profils d'oxydo-réduction peuvent aider à identifier un neurotransmetteur. Un pic d'oxydation (ou de réduction) représente le potentiel auquel le courant obtenu est maximal pour l'oxydation (ou la réduction) d'une substance donnée. Certaines monoamines peuvent posséder plus d'un pic d'oxydation et/ou de réduction.

Références

(Leszczyszyn et al., 1990; Ciolkowski et al., 1992; Rice et al., 1994; Pihel et al., 1995; Rice et al., 1997; Pihel et al., 1998; Sarada et al., 2000; Noga et al., 2004; John et al., 2006)

Le principe des techniques électrochimiques consiste à contrôler le potentiel de surface de la fibre de carbone à l'aide d'une source de voltage et à mesurer le courant qui y circule à l'aide d'un ampèremètre. De cette façon, il est possible de mesurer le transfert de charge qui s'effectue entre une certaine solution et la fibre de carbone. Le transfert de charge mesuré par les techniques électrochimiques est le mouvement d'électrons causé par l'oxydation et la réduction des différentes molécules (Hochstetler et Wightman, 1998). Il est important de mentionner que le transfert de charge n'a lieu que lorsque la substance entre en contact physique direct (quelques angströms) avec la fibre de carbone. Les caractéristiques physico-chimiques d'une molécule oxydable font en sorte que les processus d'oxydo-réduction sont maximaux à un certain potentiel (voir tableau V). L'oxydation (figure 13) se produit lorsqu'une substance réduite donne un ou plusieurs électrons à la fibre de carbone et devient une substance oxydée. Il en résulte un courant positif qu'il est possible de mesurer à l'aide de l'ampèremètre connecté à cette électrode.

L'inverse peut aussi se produire : la réduction s'effectue lorsque la fibre de carbone donne un électron à une substance oxydée, qui devient ainsi une substance réduite. Il en résulte un courant négatif que l'on peut mesurer de la même façon. Les courants résultants de l'oxydo-réduction traversent la fibre de carbone et sont transférés à l'électrode Ag/AgCl par la solution d'électrolytes contenue dans l'électrode d'enregistrement (voir figure 12). Par la suite, ces courants sont amplifiés, filtrés par un ampèremètre et digitalisés, ce qui permet l'analyse finale des données. La libération de DA (et des autres catécholamines) peut être induite par une stimulation électrique, par une application d'agonistes, par une dépolarisation en patch-clamp et par une augmentation de la concentration extracellulaire

de potassium (Herdon et al., 1985; Woodward et al., 1988; Herdon et Nahorski, 1989; Kato et al., 1992; Yamada et al., 1993; Kimura et al., 1995b; Harvey et al., 1996; Prince et al., 1996; Dobrev et Andreas, 1997; Bergquist et al., 1998; Hirota et al., 2000; Phillips et Stamford, 2000; El Ayadi et al., 2001; Dobrev et Ravens, 2003).

Dans un environnement biologique comme celui du cerveau, il existe plusieurs autres substances oxydables que les monoamines qui se côtoient au même endroit et au même moment. Le courant associé à l'oxydation de ces substances est d'ailleurs de 100 à 200 fois supérieur au courant généré par l'oxydation de la DA. Afin d'isoler le tracé d'oxydo-réduction de la DA, il faut soustraire mathématiquement le tracé d'oxydo-réduction précédant le stimulus évocateur (par exemple une stimulation électrique) à tous les tracés d'oxydo-réduction obtenus à la suite de ce stimulus.

5.3 L'ampérométrie

La technique d'ampérométrie utilise un potentiel constant dans l'électrode à fibre de carbone. Lorsque le potentiel de l'électrode est fixé au potentiel d'oxydation de la molécule d'intérêt, il devient possible de mesurer le courant d'oxydation causé par le transfert d'électron. Ce courant est ensuite converti en unité de concentration, ce qui permet de doser cette molécule. L'ampérométrie possède une résolution temporelle de moins d'une milliseconde (Hochstetler et Wightman, 1998). Cet avantage permet de mesurer la cinétique de certains événements minuscules comme la quantité de neurotransmetteurs libérés par une seule vésicule ; une seule vésicule de sérotonine expulse environ 4700 molécules et ce neurotransmetteur possède une demi-vie extracellulaire de seulement 0,6 ms¹ (Bruns et Jahn, 1995). De plus, le bruit expérimental associé à l'ampérométrie est inférieur au bruit associé à la voltamétrie cyclique. La technique d'ampérométrie possède toutefois certains inconvénients. Le maintien d'un voltage constant perturbe énormément l'homéostasie de l'environnement biologique et rend difficile l'identification d'une substance donnée puisque le courant obtenu au potentiel choisi peut provenir de plusieurs substances qui s'oxydent à ce même potentiel.

¹ La résolution temporelle de la voltamétrie cyclique est d'environ 100 ms, ce qui rend impossible la détection d'événements semblables à l'aide de cette technique.

5.4 La voltamétrie cyclique

La différence majeure entre la voltamétrie cyclique et l'ampérométrie consiste en l'utilisation d'un potentiel changeant. Par exemple, une rampe de voltage triangulaire¹ est appliquée à des intervalles réguliers sur la fibre de carbone (ex. 10Hz). Dans la portion montante de la rampe de voltage, les substances en solution sont oxydées et la fibre de carbone reçoit des électrons, ce qui donne un courant positif. Dans la portion descendante de la rampe de voltage, le phénomène inverse a lieu : les substances en solution sont réduites et la fibre de carbone perd des électrons, ce qui donne un courant négatif.

Le principal inconvénient de la voltamétrie cyclique est la résolution temporelle qui est limitée par la fréquence de répétition de la rampe de voltage, soit 10 Hz ou une rampe toutes les 100 ms dans notre cas. Les cinétiques de libération/recapture d'un neurotransmetteur comme la DA sont reconstituées avec les courants obtenus au pic d'oxydation (500 mV pour la DA). Cette limitation temporelle se fait au profit d'un ajout d'informations qualitatives sur la nature des substances oxydables. Le potentiel changeant de la voltamétrie cyclique permet d'obtenir des tracés d'oxydo-réduction complets et de distinguer les substances présentant des profils d'oxydo-réduction différents, ce qui n'est pas possible avec l'ampérométrie². Rappelons que le tracé d'oxydo-réduction d'une substance donnée comporte un ou plusieurs pic(s), ce qui confère à cette substance un profil caractéristique (tableau V). La résolution temporelle restreinte de la voltamétrie

¹ Dans l'article, nous utilisons la rampe suivante : -400mV à 1000mV à -400mV (voir figure 1 de l'article pour une représentation schématique).

² Le potentiel fixe de l'ampérométrie est ajusté afin d'obtenir l'oxydation maximale de la molécule d'intérêt.

cyclique est tout de même amplement suffisante afin de mesurer l'exocytose *in vivo* et *in vitro* des neurotransmetteurs qui proviennent de plusieurs terminaisons axonales (Schmitz et al., 2001; Schmitz et al., 2002; Bamford et al., 2004b) ou des corps cellulaires des neurones dopaminergiques lorsqu'il s'agit de libération somatodendritique (Rice et al., 1994; Cragg et Greenfield, 1997).

ARTICLE

**THE D2 AUTORECEPTOR INHIBITS DOPAMINE RELEASE BY
ACTING THROUGH KV1-LIKE POTASSIUM CHANNELS
AND N-TYPE CALCIUM CHANNELS**

Philippe Martel, Maxime Bérard and Louis-Eric Trudeau

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Groupe de Recherche sur le Système
Nerveux Central, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abbreviated title: The D2 autoreceptor inhibits dopamine release

Corresponding author: *Louis-Eric Trudeau, Ph.D.
Department of pharmacology, Faculty of Medicine
Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7
Tel: 514-343-5692
Fax : 514-343-2291*

Email : [REDACTED]

Number of text pages: 33

Number of figures and tables: 7, 0

Keywords: Kv potassium channels, dopamine, D2, presynaptic, cyclic voltammetry, striatum

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health research (CIHR) to L.-E. Trudeau. L.-E. Trudeau is supported by a senior scholar award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Philippe Martel was supported in part by a COPSE fellowship of the Université de Montréal. Maxime Bérard was supported by a fellowship from the FRSQ. We wish to thank Dr. Stephanie Fulton and Marie-Josée Bourques for their comments on an earlier version of this manuscript.

CONTRIBUTION DES COAUTEURS

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué l'ensemble des travaux nécessaires à la publication de ce travail. Au niveau méthodologique, j'ai travaillé sur la mise au point de la technique principale de l'article, soit la voltamétrie cyclique. À ce sujet, je tiens à remercier le Dr Charbel Simon Fawaz qui a travaillé sur la mise au point des premières électrodes voltamétriques. Quant aux résultats, j'ai contribué à la majorité des expériences présentées. Maxime Bérard a effectué une portion non négligeable du travail d'acquisition des données brutes. Mon rôle a été, par la suite, d'analyser l'entièreté des résultats obtenus et de les présenter sous forme d'un article scientifique, que j'ai rédigé avec le Dr Louis-Éric Trudeau. Par ailleurs, ce dernier a supervisé mes travaux en tout temps et a contribué majoritairement à la mise au point du protocole expérimental.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Philippe Martel

Maîtrise en pharmacologie

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine

2. Description de l'article

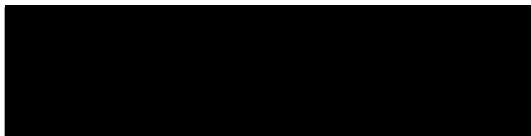
Martel, P., Bérard M., Trudeau L.-E.

The D₂ autoreceptor inhibits dopamine release by acting through Kv1-like potassium channels and N-type calcium channels.

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 Philippe Martel inclue cet article dans son mémoire de maîtrise, qui a pour titre Étude du mécanisme d'inhibition de la libération de dopamine par les autorécepteurs D2.



Maxime Bérard

8 mai 2006
Date



Dr. Louis-Éric Trudeau

9 mai 2006
Date

ABSTRACT

Dopamine (DA) release is tightly regulated through activation of presynaptic D2 autoreceptors located on axon terminals. The mechanism responsible for this fast regulation of DA exocytosis in the brain is currently unknown but previous work has implicated a possible role of potassium channels. Here we used fast-scan cyclic voltammetry to study electrically-evoked DA release in rat dorsal striatal brain slices. We find that although G-protein-gated inward rectifying (GIRK) and ATP-gated (K_{ATP}) potassium channels are not involved, 4-aminopyridine (4-AP), a broad-spectrum blocker of I_A -type rapidly-inactivating Kv potassium channels strongly reduces the ability of quinpirole, a D2 receptor agonist, to inhibit evoked DA overflow. Kv subtype-selective blockers including r-margatoxin, alpha-dendrotoxin and r-heteropodatoxin-2 confirmed the implication of Kv1.3 together with Kv1.1 and/or 1.2, 1.6, but not Kv4.2. In addition to potassium channel regulation, voltage-gated Ca^{2+} channel inhibition could also contribute to D2 autoreceptor action. In accordance with this, we find that the ability of quinpirole to inhibit electrically-evoked DA overflow is increased after partial blockade of N-type, but not P/Q-type Ca^{2+} channels. In summary, our work shows that D2 autoreceptors activate two complementary mechanisms to inhibit Ca^{2+} -dependent exocytosis of DA from axon terminals. Such a dual mechanism is ideally suited to rapidly shut down DA release, while slower mechanisms such as activation of DA reuptake and inhibition of DA synthesis are better suited to regulate DA secretion over medium- and long-term time-frames, respectively.

INTRODUCTION

Dopamine (DA) has long been known to regulate its own release through the activation of autoreceptors (Farnebo and Hamberger, 1971). Some of these receptors are located on the soma and dendrites of DA neurons and their activation inhibits cell firing (Aghajanian and Bunney, 1977; White and Wang, 1984; Grace and Bunney, 1985). These somatodendritic autoreceptors also decrease somatodendritic DA release (Kalivas and Duffy, 1991; Cragg and Greenfield, 1997; Michaelievski et al., 2003). The inhibitory effect of somatodendritic D2 autoreceptors has been proposed to occur principally through activation of G-protein-gated inward rectifying K⁺ channels (GIRKs) (Lacey et al., 1987; Inanobe et al., 1999; Uchida et al., 2000). Autoreceptors are also present on the axon terminals of DA neurons (Delle et al., 1996; Congar et al., 2002). Electrically-evoked DA release in the striatum can be inhibited by D2-type receptor agonists and enhanced by D2-type receptor antagonists (Stamford et al., 1991; Kennedy et al., 1992). A specific implication of the D2-short splice variant of the D2 receptor in this process has been confirmed by the almost complete absence of autoreceptor function in D2 knockout mice (L'hirondel et al., 1998; Benoit-Marand et al., 2001; Schmitz et al., 2002; Rouge-Pont et al., 2002), and its persistence in D2-long knockout mice (Rouge-Pont et al., 2002) and in D3 knockout mice (Joseph et al., 2002). Release-inhibiting D2-type heteroreceptors are also present on axon terminals in a number of other brain areas (Chen et al., 1999; Koga and Momiyama, 2000; Shen and Johnson, 2000; Michaelievski et al., 2002; Davila et al., 2003a; Schulte et al., 2006).

The molecular mechanism underlying the inhibition of DA release through terminal D2 autoreceptors is currently unknown. One possibility is that D2 autoreceptors inhibit the function of voltage-gated Ca^{2+} channels in axon terminals, thus directly inhibiting Ca^{2+} -dependent exocytosis of DA. Compatible with this hypothesis, DA reduces the somatic N-type Ca^{2+} current in dissociated midbrain DA neurons (Cardozo and Bean, 1995). D2 receptors also inhibit voltage-gated Ca^{2+} channels in other types of neurons (Williams et al., 1991; Yan et al., 1997; Davila et al., 2003a; Schulte et al., 2006). An alternate and not necessarily exclusive hypothesis is that D2 autoreceptors activate potassium channels in axon terminal, thus indirectly inhibiting Ca^{2+} influx and exocytosis. Voltage-gated Kv-type K^{+} channels could be involved. Using a striatal slice preparation, Cass et al. showed that the wide-spectrum K^{+} channel blockers 4-aminopyridine (4-AP) and tetraethylammonium reduce the ability of quinpirole to inhibit electrically-evoked [^3H]DA release (Cass and Zahniser, 1991). Similar results have been recently obtained in a single DA neuron culture model (Congar et al., 2002). These results suggest a role for Kv-type channels in the action of terminal D2 autoreceptors. The Kv channel subtype that is targeted by 4-AP in the terminals of DA neurons is currently unknown. In the present work, we used fast-scan cyclic voltammetry and a striatal brain slice preparation to examine the respective role of Ca^{2+} channels and Kv potassium channel subtypes in terminal autoreceptor function. We found an important role of Kv1-type potassium channels and of N-type voltage-gated Ca^{2+} channels.

MATERIALS AND METHODS

Brain slice preparation and solutions

Four to six weeks old Sprague-Dawley rats were anesthetized with halothane and quickly decapitated. Coronal striatal brain slices of 300 μm (Bregma 1.70 to 0.48 mm) (Paxinos and Watson, 1998) were prepared with a VT1000S vibratome (Leica Microsystems Inc., Nussloch, Germany) in ice-cold (0 to 4°C) artificial CSF (ACSF) containing (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 0.3 KH₂PO₄ and 10 D-Glucose ; adjusted to 300 mOsm/kg and saturated with 95% O₂-5% CO₂. Slices were then kept in ACSF at room temperature and allowed to recover at least 1 hour. When ready, slices were bisected and put in a custom made recording chamber superfused with ACSF (1 ml/min) maintained at 32°C with a TC-324B single channel heater controller (Warner Instrument Inc., Hamden, CT, USA).

Microelectrodes and electrochemical recordings

Electrically evoked DA release was measured using fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) with 5 μm diameter carbon-fiber electrodes placed into the dorsal striatum ~100 μm below the surface. Carbon-fiber electrodes were constructed according to Kawagoe et al. (Kawagoe et al., 1993). Briefly, 5 μm diameter carbon fibers (Cytec Industries Inc., NJ, USA) were inserted in ethanol-cleaned glass capillaries (1.2 mm x 0.68 mm, 4 inches long; A-M Systems, WA, USA) with an aspiration device. The glass capillaries were then pulled

using a P-2000 micropipette puller (Sutter Instruments, Novato, USA), dipped into 90°C epoxy for 30 s (Epo-Tek 301, Epoxy Technology, MASS, USA), allowed to cure for 10 min at room temperature and finally cleaned in hot acetone for 3 seconds. The electrodes were heated at 100°C for 12 hours and 150°C for 5 days. Prior to use, electrodes were cleaned with agitated isopropyl alcohol for 15 min to allow better sensitivity (Bath et al., 2000). Carbon fibers were cut using a n°11 scalpel blade under direct visualization to obtain maximal basal currents of 100 to 180 nA. Electrodes were finally selected for their DA sensitivity using *in vitro* calibration with 1 μ M DA in ACSF. Scan rate for FSCV was 300 V/S with a triangular voltage wave (-400 to 1000 mV vs Ag/AgCl) applied to the electrodes at sampling interval of 100 ms with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA) (Fig. 1B). Data acquisition was conducted using a DigiData 1200B analog to digital board converter (Axon Instruments) connected to a Compaq Pentium III personal computer using Clampex 9.2 (Axon Instruments).

Electrical stimulation and experimental design

Single pulse stimulations (400 μ A; 1 ms) were generated by a S-900 stimulator (Dagan Corporation, Minneapolis, MN) every 2 min to electrically evoke DA release in striatal slices. The tips of the tungsten bipolar electrodes (Plastics One, Roanoke, VA) were separated by approximately 100 to 150 μ m and were gently placed on the surface of the slice using a micromanipulator (Newport, Fountain Valley, CA). Under these conditions, DA release was tetrodotoxin-sensitive and Ca^{2+} dependent (data not shown).

Drugs and chemical

All drugs and chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). Glibenclamide was purchased from Tocris (Ellisville, MO). ω -Agatoxin IVA was obtained from Sigma-Aldrich Canada. Other toxins were obtained from Alomone labs (Jerusalem, Israel). Drugs and toxins were unfrozen from aliquots before use.

Statistical analysis

Each individual result was normalized against its own control period, which represented the first 10 min of stable recording before drug application. Results are shown as means \pm SEM. The sample size is shown as $n=(x;y)$, where x refers to the number of slices and y the number of animals. Antagonists and agonists (apart from quinpirole) were generally applied for 30 min. Drugs effects were evaluated from the mean of the last 10 min of drug application (after a stable effect was reached). Quinpirole's effect was evaluated at its peak. Unpaired t-tests were used when comparing two groups, while one-way ANOVAs with *post hoc* comparisons (Tukey test) were used when comparing multiple groups of data. Significance levels used in figures are shown as: *single asterisk* (*) = $p < 0.05$, *double asterisks* (**) = $p < 0.01$ and *triple asterisks* (***) = $p < 0.001$.

RESULTS

Evoked DA release in the dorsolateral striatum is stable over time and regulated by the D2 autoreceptor.

DA release was electrically-evoked with single pulses every 2 min in striatal brain slices from 4 to 6 weeks old Sprague-Dawley rats and measured using FSCV at 300 V/S (Fig. 1A and 1B). Evoked DA overflow in control conditions reached a mean of $1.14 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ($n=60;33$) (Fig. 1C). The detection limit due to experimental noise was approximately $0.06 \mu\text{M}$ ($n=19;7$). Recovery of extracellular DA levels, reflecting mostly reuptake, was rapid, requiring no more than 1 s (Fig. 1C). Evoked DA overflow was stable over time with a mean rundown of $6.6 \pm 2.2 \%$ ($n=8;6$) over a period of 40 min of control recording (Fig. 1D). As expected, the D2 agonist quinpirole decreased electrically-evoked DA release in a dose-dependent manner (Fig. 1D and 1E). A 4 min application of $0.1 \mu\text{M}$, $0.5 \mu\text{M}$ or $1 \mu\text{M}$ quinpirole decreased DA levels by $30.0 \pm 3.1 \%$ ($n=5;4$, $p < 0.001$), $46.7 \pm 3.8 \%$ ($n=7;4$, $p < 0.001$) and $85.8 \pm 3.9 \%$ ($n=8;7$, $p < 0.001$), respectively (Fig. 1D and 1E). Sulpiride ($5 \mu\text{M}$), a specific D2 antagonist, had no effect on DA overflow evoked by single pulses: it caused a $6.0 \pm 4.3 \%$ mean decrease after 20 min, which was not statistically different from the basal rundown (data not shown; $n=3;2$, $p > 0.05$). However, a 20 min pre-application of sulpiride ($5 \mu\text{M}$) blocked entirely the effect of quinpirole ($1 \mu\text{M}$) on DA release: after D2 blockade, quinpirole caused a decrease of only $6.6 \pm 5.1 \%$ which was different from the effect of quinpirole alone (data not shown, $n=3;2$, $p < 0.001$). Overall, these results indicate that electrically-evoked DA overflow under our conditions is

stable over time. Furthermore, as expected, terminal DA release is inhibited by a D2 receptor-mediated mechanism in a dose-dependent manner under conditions where there is no detectable basal activation of these receptors following single pulse stimulation.

Kv channels blockers increase electrically-evoked DA

We first examined the effect of several Kv potassium channel blockers on DA overflow. We measured DA release at intervals of 2 min. After a stable 10 min control period, blockers were applied for 30 min. Statistical analyses were conducted on the mean of the last 10 min in the presence of the blockers compared to the mean rundown observed during the last 10 min of control recordings. 4-AP (100 μ M), a broad spectrum Kv blocker (Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 1.6, 3.1, 3.2 and 4.2), increased DA overflow by 59.2 ± 7.3 % (n=6;2, $p < 0.001$) (Fig. 2A, 2B and 2C). r-Margatoxin (100 nM), a specific Kv1.3 subtype blocker, increased DA levels by 25.8 ± 4.9 % (n=5;3, $p < 0.01$) (Fig 2A, 2B and 2C). α -Dendrotoxin (100 nM), a specific Kv1.1, 1.2 and 1.6 subtype blocker, increased DA levels by 19.6 ± 4.7 % (n=5;3, $p < 0.05$) (Fig. 2C). r-Heteropodatoin-2 (100 nM), a specific Kv4.2 subtype blocker caused no significant change in DA levels compared to rundown (13.4 ± 2.2 % decrease, which was not different from basal rundown) (n=6;2, $p > 0.05$) (Fig. 2C). Finally, a 30 min application of both r-margatoxin (100 nM) and α -dendrotoxin (100 nM) increased DA levels by 71.4 ± 15.7 % (n=4;2, $p < 0.001$) (Fig. 2C). Post-hoc comparisons showed that there was no statistical difference between the effect of 4-AP (100 μ M) and the combined effect of both r-margatoxin (100 nM) and α -dendrotoxin (100 nM) on DA levels ($p = 0.78$). Overall, these results argue for the presence of a number of Kv-family subunits

(Kv1.1 and/or 1.2, 1.6 and 1.3, but not 4.2) in dopaminergic terminals of the striatum, where they act to regulate DA release.

Implication of Kv channels in D2-mediated inhibition of DA release

To test the potential role of Kv channels in D2-mediated inhibition of DA release, we pre-applied (30 min) Kv blockers before evaluating the effect of quinpirole (1 μ M; measured at its peak effect) on evoked DA overflow. In the presence of 4-AP (100 μ M), quinpirole (1 μ M) decreased DA release by 41.1 ± 1.5 % (n=6;2, $p < 0.001$) (Fig. 3), which was about half of the effect induced by quinpirole (1 μ M) alone (85.8 ± 3.9 %) (n=8;7, $p < 0.001$). In the presence of r-margatoxin (100 nM), quinpirole (1 μ M) decreased DA release by 64.1 ± 1.8 %, which was again statistically different from the effect of quinpirole alone (n=5;3, $p < 0.001$) (Fig. 3). After pre-treatment with α -dendrotoxin (100 nM), quinpirole (1 μ M) decreased DA release by 57.2 ± 4.4 %, an effect that was statistically different from the effect of quinpirole alone (n=4;3, $p < 0.001$) (Fig. 3c). As expected, pre-application of r-heteropodatoxin-2 (100 nM) did not cause any significant change in quinpirole-induced inhibition of DA release (94.2 ± 0.8 % decrease) (n=6;2, $p > 0.05$). Finally, with a 30 min pre-application of a combination of r-margatoxin (100 nM) and α -dendrotoxin (100 nM), quinpirole (1 μ M) decreased DA release by 42.2 ± 2.8 %, an effect that was statistically different from the effect of quinpirole alone (n=4;2 ; $p < 0.001$) (Fig. 3C). Post-hoc tests showed that the effect of quinpirole determined in the presence of the combination of r-margatoxin (100 nM) and α -dendrotoxin (100 nM) was not different from the effect of quinpirole measured in the presence of 4-AP (100 μ M) ($p = 1.00$). Overall, these results

suggest that Kv potassium channel subtypes including Kv1.1 and/or 1.2, 1.6 and 1.3, but not 4.2 play an important role in D2-mediated inhibition of DA release.

Implication of GIRK and K_{ATP} channels in D2 mediated inhibition of DA release

Although our results confirm an implication of Kv-family channels in the autoreceptor function of the D2 receptor in axon terminals, a possible implication of other potassium channels should not be discounted considering the activation of GIRK-like and K_{ATP} potassium channels through D2 receptors in the somatodendritic compartment of DA neurons (Lacey et al., 1988; Kuzhikandathil et al., 1998; Avshalumov and Rice, 2003). We therefore evaluated the effect on DA release of barium, a blocker of GIRK channels and of glibenclamide, a blocker of K_{ATP} channels. Applied alone, barium (1 mM) decreased evoked DA overflow by 9.4 ± 1.8 %, which was not statistically different from spontaneous rundown (n=5;2 ; p>0.05) (Fig. 4A). Glibenclamide (3 μ M) gave similar results; a rundown of 12.9 ± 3.8 % was noted, which, again, was not statistically different from spontaneous rundown (n=5;3 ; p>0.05) (Fig. 4A).

We next evaluated the effect of the D2 agonist quinpirole in the presence of these two antagonists. After a 30 min pre-application of barium (1 mM), quinpirole (1 μ M) decreased DA release by 83.6 ± 4.2 %, which was not statistically different from the effect of quinpirole alone (n=5;2 ; p > 0.05) (Fig. 4B, 4C). Similarly, in the presence of glibenclamide (3 μ M), quinpirole (1 μ M) decreased DA release by 75.5 ± 4.8 %, which was again not statistically different from the effect of quinpirole alone (n=4;2 ; p > 0.05)

(Fig. 4B, 4C). Overall, these results indicate that terminal D2 receptors do not inhibit DA release by acting through GIRK and K_{ATP} channels.

Calcium-dependency of striatal DA release

Considering that even broad-spectrum potassium channel blockers such as 4-AP only blocked approximately 50 % of the effect of quinpirole on evoked DA overflow, it is likely that other presynaptic mechanisms also contribute. One possibility is that D2 receptors inhibit DA release in part by inhibiting the function of voltage-gated Ca^{2+} channels in axon terminals. To address this, we first examined the effect of several Ca^{2+} channel blockers on evoked DA overflow. A 30 min application of nifedipine (20 μ M), a L-type Ca^{2+} channel blocker, resulted in a decrease of evoked DA overflow of 12.1 ± 1.7 %, which was not statistically different from spontaneous rundown ($n=4;2$; $p>0.05$) (Fig. 5). Similarly, a 30 min application of ω -agatoxin IVA (200 nM), a blocker which is specific for P/Q-type Ca^{2+} channels at this concentration, resulted in a decrease of 14.3 ± 3.0 %, which again was not statistically different from spontaneous rundown ($n=6;2$; $p>0.05$) (Fig. 5). In preliminary experiments, we observed that application of the irreversible N-type Ca^{2+} channels blocker ω -conotoxin GVIA (1 μ M) for 6 min resulted in a near-complete block of evoked DA overflow and that longer application periods produced no additional effect. All further experiments were thus performed with a 6 min drug application period. A 6 min application of ω -conotoxin GVIA (1 μ M) decreased DA levels by 91.1 ± 1.2 % after a delay of 20 min ($n=4;1$; $p<0.001$) (Fig. 5), while at 100 nM, the decrease was of 62.5 ± 5.7 % after the same delay ($n=6;2$; $p<0.001$) (Fig. 5). Overall, these results suggest

that electrically-evoked DA release in rat dorsolateral striatum is largely dependent on Ca^{2+} influx through N-type Ca^{2+} channels, and that L and P/Q-type have little if any role.

Implication of Ca^{2+} channels in D2 mediated inhibition of DA release

To evaluate the potential role Ca^{2+} channels in D2 mediated inhibition of DA release, we determined the effect of quinpirole after pre-application of the Ca^{2+} channel blockers. After a 30 min pre-application of nifedipine (20 μM), quinpirole (1 μM) decreased DA release by $91.8 \pm 2.7\%$, a value that was not statistically different from the effect of quinpirole alone ($n=4;2$; $p > 0.05$) (Fig. 6A and 6B). Similarly, in the presence of ω -agatoxin IVA (200 nM), quinpirole decreased DA release by $86.7 \pm 3.6\%$, which was again not statistically different from the effect of quinpirole alone ($n=6;2$; $p > 0.05$) (Fig. 6A and 6B). Considering that ω -conotoxin GVIA produced an essentially complete block of DA overflow when used at 1 μM , it was not possible to evaluate the effect of quinpirole under such conditions. However, it was possible to test the effect of quinpirole after sub-maximal block of N-type Ca^{2+} channels with 100 nM of the toxin, conditions under which there was approximately 40 % of evoked DA overflow remaining. We reasoned that if D2 receptors inhibit DA release in part by inhibiting the function of N-type Ca^{2+} channels, then prior inhibition of a subset of N-type channels with ω -conotoxin GVIA should facilitate or enhance the effect of quinpirole. To test this hypothesis, we used quinpirole at a sub-maximal dose of 100 nM, thus allowing us to detect any increase in its effects on DA overflow. While in control experiments 100 nM quinpirole reduced evoked DA overflow by $30.0 \pm 3.1\%$ ($n=5;4$; $p < 0.001$) (Fig. 6C and 6D), after partial block of N-type Ca^{2+}

channels with ω -conotoxin GVIA (100nM), the effect of quinpirole (100 nM) was more than doubled, as it decreased DA overflow by $73.5 \pm 5.0 \%$ ($n=4;2$; $p < 0.001$) (Fig. 6C and 6D). The effect of quinpirole in the presence of ω -conotoxin GVIA was statistically greater than the effect of quinpirole alone ($p < 0.001$) (Fig 6D). Overall, these results suggest that contrary to L-type or P/Q-type channels, N-type Ca^{2+} channels play an important role in D2-mediated inhibition of DA release.

DISCUSSION

D2 autoreceptors exert powerful control over DA release in the brain. However, little is currently known regarding the mechanism whereby these receptors regulate the exocytosis of DA from axon terminals. Here we provide new data showing that potassium channels of the Kv1 family play a major role. In addition, we find that negative regulation of N-type voltage-gated Ca²⁺ channels also contributes to this presynaptic mechanism.

Role of Kv potassium channels

Coupling of D2 receptors to potassium channels has been previously demonstrated. For example, D2 receptors can activate potassium conductances in the somatodendritic compartment of DA neurons that are compatible with the properties of GIRK channels (Lacey et al., 1987; Uchida et al., 2000). In cell lines and in brain slices, D2 receptors have been confirmed to couple to the GIRK2 subtype of potassium channels, the only subtype expressed by DA neurons (Kuzhikandathil et al., 1998; Davila et al., 2003b; Gay et al., 2004; Guatteo et al., 2004; Webb et al., 2005). It has been generally assumed that terminal D2 receptors inhibit DA release through the opening of GIRKs on axon terminals. Although this possibility has in fact not been directly examined, it is unlikely that this is the major mechanism because in the mesencephalon as well as in many brain regions, GIRKs are mainly expressed somatodendritically and are not involved in terminal regulation (Luscher et al., 1997; Wetherington and Lambert, 2002; Blanchet and Luscher, 2002; Marker et al., 2005). Compatible with this hypothesis, we found that blocking GIRK

channels with barium failed to enhance electrically-evoked DA overflow and to reduce the ability of the D2 agonist quinpirole to inhibit DA overflow in the striatum. Within this context, it is however puzzling that tertiapin-Q, a selective antagonist of GIRK1/3 channels enhances electrically-evoked DA release in the guinea pig striatal slice preparation (Avshalumov and Rice, 2003). This could perhaps reflect an indirect effect or a species difference in GIRK channel subtype expression. We have evaluated the effect of this antagonist in rat striatal slices and found that it failed to alter electrically-evoked DA release (Martel and Trudeau, unpublished observations).

Our results obtained using selective toxins suggest that potassium channels of the Kv family are involved in D2-mediated presynaptic inhibition of DA release. In particular, the direct enhancement of evoked DA release and the partial blockade of the effect of quinpirole by r-margatoxin suggest the involvement of Kv1.3 channels (Garcia-Calvo et al., 1993; Greffrath et al., 1998). Likewise, the ability of α -dendrotoxin to have a similar and additive effect above that of r-margatoxin suggest a possible implication of Kv1.1 and/or 1.2 and/or 1.6 channels (Harvey, 1997; Nashmi et al., 2000; Southan and Robertson, 2000; Monaghan et al., 2001; Shen et al., 2004). Our results are compatible with previous work showing that D2 receptor activation regulates a rapidly-inactivating I_A -type potassium current in dopamine neurons (Liu et al., 1994) as well as in other cell types (Lledo et al., 1990; Kloppenburg et al., 1999), although these measurements were made at the cell body level. They are also in line with a previous demonstration that 4-AP, a broad-spectrum I_A -type potassium current blocker can inhibit the ability of DA agonists to reduce DA release (Cass and Zahniser, 1991). Further work will however be required to identify which among

the candidate Kv1 channel subtypes are most abundant in the axon terminals of DA neurons and play the major role in D2 autoreceptor function. Although Kv1 channels have been demonstrated to be expressed in varicose-like structures in the ventral striatum and various basal ganglia nuclei (Chung et al., 2000), their specific expression in DA neurons has not yet been confirmed.

Role of calcium channel regulation

Although Kv1 potassium channels play a key role in terminal D2 autoreceptor function, we found that even the broad-spectrum Kv potassium channel blocker 4-AP only blocked approximately 50 % of the presynaptic inhibition mediated by quinpirole. This suggests that a sizable proportion of the effect of D2 activation on DA release is mediated through another effector. Although this could perhaps be 4-AP-insensitive potassium channels, an alternate hypothesis is that D2 receptor activation simultaneously leads to voltage-dependent Ca^{2+} channel inhibition in axon terminals, thus directly inhibiting Ca^{2+} -dependent exocytosis. This hypothesis is reasonable considering that other G-protein-coupled receptors have been suggested to produce presynaptic inhibition through such a mechanism (Dittman and Regehr, 1996). In addition, D2 agonists have been shown to inhibit voltage-dependent Ca^{2+} currents, and in particular N-type calcium channels, in isolated DA neurons (Cardozo and Bean, 1995) as well as in other neurons (Momiya and Koga, 2001; Stefani et al., 2002). Compatible with this possibility, we found that ω -conotoxin GVIA used at sub-maximal doses to inhibit DA release facilitated the effect of quinpirole. Although we have not directly measured N-type currents in DA axon terminals,

this result can be explained if D2 receptor activation, like ω -conotoxin GVIA, leads to N-type Ca^{2+} channel inhibition. We thus conclude that D2 autoreceptors inhibit electrically-evoked DA release through a dual and complementary mechanism targeting both potassium and Ca^{2+} channels on axon terminals.

Our finding of a major contribution of N-type Ca^{2+} channels to evoked DA release in the striatum is compatible with previous findings also showing a major block of DA release by ω -conotoxin GVIA (Woodward et al., 1988; Bowyer and Weiner, 1990; Kato et al., 1992; Yamada et al., 1993; Bergquist et al., 1998; Phillips and Stamford, 2000; Chen et al., 2006). However, our finding of a lack of effect of ω -agatoxin IVA is in apparent contradiction with some previous reports (Harvey et al., 1996; Bergquist et al., 1998; Hirota et al., 2000; Dobrev and Ravens, 2003; Chen et al., 2006), although other have also found that N-type channels play the major role and P/Q-type channels play a negligible or more minor role (Phillips and Stamford, 2000; El Ayadi et al., 2001). Such variable results could be due in part to the fact that different modes of stimulation were used (potassium depolarization or nicotine vs. electrical stimulation) and/or be related to species differences (rats, guinea pigs). Our failure to see an effect of ω -agatoxin IVA on DA release is unlikely to be due to an ineffective compound since we used two different lots.

In summary, our work shows that D2 autoreceptors localized on the axon terminals of DA neurons in the dorsolateral striatum inhibit electrically-evoked DA release by activating potassium channels of the Kv1 family. The mechanism whereby D2 receptors activate such channels is currently unidentified. Our work also suggests that inhibition of

N-type voltage-dependent Ca^{2+} channels is additionally involved. Thus, two complementary mechanisms would act synergistically to inhibit Ca^{2+} -dependent exocytosis of DA from axon terminals. Such a dual mechanism is ideally suited to rapidly inhibit DA release, while slower mechanisms such as activation of DA reuptake (Dickinson et al., 1999; Mayfield and Zahniser, 2001) and inhibition of DA synthesis (Kehr et al., 1972; Booth et al., 1990; O'Hara et al., 1996; Pothos et al., 1998) could also contribute on a medium- and long-term time-frame, respectively.

REFERENCES

1. Aghajanian GK, Bunney BS (1977) Dopamine "autoreceptors": pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 297:1-7.
2. Avshalumov MV, Rice ME (2003) Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11729-34.
3. Bath BD, Michael DJ, Trafton BJ, Joseph JD, Runnels PL, Wightman RM (2000) Subsecond adsorption and desorption of dopamine at carbon-fiber microelectrodes. *Anal Chem* 72:5994-6002.
4. Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F (2001) Inhibition of dopamine release via presynaptic D₂ receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci* 21:9134-41.
5. 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* 70:1532-1540.
6. Blanchet C, Luscher C (2002) Desensitization of mu-opioid receptor-evoked potassium currents: initiation at the receptor, expression at the effector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4674-9.

7. Booth RG, Baldessarini RJ, Kula NS, Gao Y, Zong R, Neumeyer JL (1990) Presynaptic inhibition of dopamine synthesis in rat striatal tissue by enantiomeric mono- and dihydroxyaporphines. *Mol Pharmacol* 38:92-101.
8. Bowyer JF, Weiner N (1990) Ca²⁺-evoked [3H]dopamine release from synaptosomes is dependent on neuronal type Ca²⁺ channels and is not mediated by acetylcholine, glutamate or aspartate release. *J Pharmacol Exp Ther* 254:664-670.
9. Cardozo DL, Bean BP (1995) Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 74:1137-1148.
10. Cass WA, Zahniser NR (1991) Potassium channel blockers inhibit D2 dopamine, but not A1 adenosine, receptor-mediated inhibition of striatal dopamine release. *J Neurochem* 57:147-152.
11. Chen BT, Moran KA, Avshalumov MV, Rice ME (2006) Limited regulation of somatodendritic dopamine release by voltage-sensitive Ca channels contrasted with strong regulation of axonal dopamine release. *J Neurochem* 96:645-55.
12. Chen X, Kombian SB, Zidichouski JA, Pittman QJ (1999) Dopamine depresses glutamatergic synaptic transmission in the rat parabrachial nucleus in vitro. *Neuroscience* 90:457-468.

13. Chung YH, Shin CM, Kim MJ, Cha CI (2000) Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kvl channel subunits in the rat basal ganglia. *Brain Res* 875:164-70.
14. 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.
15. Cragg SJ, Greenfield SA (1997) Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci* 17:5738-5746.
16. Davila NG, Blakemore LJ, Trombley PQ (2003a) Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. *J Neurophysiol* 90:395-404.
17. Davila V, Yan Z, Craciun LC, Logothetis D, Sulzer D (2003b) D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci* 23:5693-7.
18. Delle DK, Sesack SR, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of neurotensin and the dopamine D2 receptor in the rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 371:552-566.

19. 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.
20. Dittman JS, Regehr WG (1996) Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 16:1623-33.
21. Dobrev D, Ravens U (2003) Therapeutically relevant concentrations of neomycin selectively inhibit P-type Ca²⁺ channels in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 461:105-11.
22. El Ayadi A, Afailal I, Errami M (2001) Effects of voltage-sensitive calcium channel blockers on extracellular dopamine levels in rat striatum. *Metab Brain Dis* 16:121-31.
23. Farnebo LO, Hamberger B (1971) Drug-induced changes in the release of 3 H-monoamines from field stimulated rat brain slices. *Acta Physiol Scand Suppl* 371:35-44.
24. Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268:18866-74.

25. Gay EA, Urban JD, Nichols DE, Oxford GS, Mailman RB (2004) Functional selectivity of D2 receptor ligands in a Chinese hamster ovary hD2L cell line: evidence for induction of ligand-specific receptor states. *Mol Pharmacol* 66:97-105.
26. Grace AA, Bunney BS (1985) Low doses of apomorphine elicit two opposing influences on dopamine cell electrophysiology. *Brain Res* 333:285-298.
27. Greffrath W, Martin E, Reuss S, Boehmer G (1998) Components of after-hyperpolarization in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus in vitro. *J Physiol* 513 (Pt 2):493-506.
28. Guatteo E, Bengtson CP, Bernardi G, Mercuri NB (2004) Voltage-gated calcium channels mediate intracellular calcium increase in weaver dopaminergic neurons during stimulation of D2 and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 92:3368-74.
29. Harvey AL (1997) Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen Pharmacol* 28:7-12.
30. Harvey J, Wedley S, Findlay JD, Sidell MR, Pullar IA (1996) omega-Agatoxin IVA identifies a single calcium channel subtype which contributes to the potassium-induced release of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, dopamine, gamma-aminobutyric acid and glutamate from rat brain slices. *Neuropharmacology* 35:385-92.
31. Hirota K, Kudo M, Kudo T, Matsuki A, Lambert DG (2000) Inhibitory effects of intravenous anaesthetic agents on K⁺-evoked norepinephrine and dopamine release

- from rat striatal slices: possible involvement of P/Q-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Br J Anaesth* 85:874-80.
32. Inanobe A, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishige KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (1999) Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* 19:1006-1017.
 33. Joseph JD, Wang YM, Miles PR, Budygin EA, Picetti R, Gainetdinov RR, Caron MG, Wightman RM (2002) Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience* 112:39-49.
 34. Kalivas PW, Duffy P (1991) A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *J Neurochem* 56:961-7.
 35. Kato T, Otsu Y, Furune Y, Yamamoto T (1992) Different effects of L-, N- and T-type calcium channel blockers on striatal dopamine release measured by microdialysis in freely moving rats. *Neurochem Int* 21:99-107.
 36. Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM (1993) Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods* 48:225-40.
 37. Kehr W, Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Atack C (1972) Evidence for a receptor-mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity. *J Pharm Pharmacol* 24:744-7.

38. Kennedy RT, Jones SR, Wightman RM (1992) Dynamic observation of dopamine autoreceptor effects in rat striatal slices. *J Neurochem* 59:449-455.
39. Kloppenburg P, Levini RM, Harris-Warrick RM (1999) Dopamine modulates two potassium currents and inhibits the intrinsic firing properties of an identified motor neuron in a central pattern generator network. *J Neurophysiol* 81:29-38.
40. Koga E, Momiyama T (2000) Presynaptic dopamine D2-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones. *J Physiol (Lond)* 523 Pt 1:163-173.
41. Kuzhikandathil EV, Yu W, Oxford GS (1998) Human dopamine D3 and D2L receptors couple to inward rectifier potassium channels in mammalian cell lines. *Mol Cell Neurosci* 12:390-402.
42. L'hirondel M, Cheramy A, Godeheu G, Artaud F, Saiardi A, Borrelli E, Glowinski J (1998) Lack of autoreceptor-mediated inhibitory control of dopamine release in striatal synaptosomes of D2 receptor-deficient mice. *Brain Res* 792:253-262.
43. 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 (Lond)* 392:397-416.
44. Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1988) On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J Physiol (Lond)* 401:437-453.

45. Liu L, Shen RY, Kapatos G, Chiodo LA (1994) Dopamine neuron membrane physiology: characterization of the transient outward current (IA) and demonstration of a common signal transduction pathway for IA and IK. *Synapse* 17:230-240.
46. Lledo PM, Legendre P, Zhang J, Israel JM, Vincent JD (1990) Effects of dopamine on voltage-dependent potassium currents in identified rat lactotroph cells. *Neuroendocrinology* 52:545-55.
47. Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19:687-695.
48. Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K (2005) Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *J Neurosci* 25:3551-9.
49. Mayfield RD, Zahniser NR (2001) Dopamine D2 receptor regulation of the dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes is voltage-independent. *Mol Pharmacol* 59:113-21.
50. Michaelevski I, Chikvashvili D, Tsuk S, Fili O, Lohse MJ, Singer-Lahat D, Lotan I (2002) Modulation of a brain voltage-gated K⁺ channel by syntaxin 1A requires the physical interaction of Gbetagamma with the channel. *J Biol Chem* 277:34909-17.

51. Michaelevski I, Chikvashvili D, Tsuk S, Singer-Lahat D, Kang Y, Linial M, Gaisano HY, Fili O, Lotan I (2003) Direct interaction of target SNAREs with the Kv2.1 channel. Modal regulation of channel activation and inactivation gating. *J Biol Chem* 278:34320-30.
52. Momiyama T, Koga E (2001) Dopamine D(2)-like receptors selectively block N-type Ca(2+) channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 533:479-92.
53. Monaghan MM, Trimmer JS, Rhodes KJ (2001) Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K⁺ channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *J Neurosci* 21:5973-83.
54. Nashmi R, Jones OT, Fehlings MG (2000) Abnormal axonal physiology is associated with altered expression and distribution of Kv1.1 and Kv1.2 K⁺ channels after chronic spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 12:491-506.
55. O'Hara CM, Uhland-Smith A, O'Malley KL, Todd RD (1996) Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 277:186-92.
56. Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.

57. Phillips PE, Stamford JA (2000) Differential recruitment of N-, P- and Q-type voltage-operated calcium channels in striatal dopamine release evoked by 'regular' and 'burst' firing. *Brain Res* 884:139-46.
58. Pothos EN, Davila V, Sulzer D (1998) Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size. *J Neurosci* 18:4106-4118.
59. Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci* 22:3293-301.
60. Schmitz Y, Schmauss C, Sulzer D (2002) Altered dopamine release and uptake kinetics in mice lacking D2 receptors. *J Neurosci* 22:8002-9.
61. Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, Dehn D, Deller T, Eble S, Abbass K, Wangler T, Knaus HG, Fakler B (2006) The epilepsy-linked *Igi1* protein assembles into presynaptic *kv1* channels and inhibits inactivation by *kvbeta1*. *Neuron* 49:697-706.
62. Shen KZ, Johnson SW (2000) Presynaptic dopamine D2 and muscarine M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *J Physiol* 525 Pt 2:331-341.
63. Shen W, Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Held JE, Surmeier DJ (2004) *Kv1.2*-containing K^+ channels regulate subthreshold excitability of striatal medium spiny neurons. *J Neurophysiol* 91:1337-49.

64. Southan AP, Robertson B (2000) Electrophysiological characterization of voltage-gated K(+) currents in cerebellar basket and purkinje cells: Kv1 and Kv3 channel subfamilies are present in basket cell nerve terminals. *J Neurosci* 20:114-122.
65. Stamford JA, Kruk ZL, Millar J (1991) Differential effects of dopamine agonists upon stimulated limbic and striatal dopamine release: in vivo voltammetric data. *Br J Pharmacol* 102:45-50.
66. Stefani A, Spadoni F, Martorana A, Lavaroni F, Martella G, Sancesario G, Bernardi G (2002) D2-mediated modulation of N-type calcium currents in rat globus pallidus neurons following dopamine denervation. *Eur J Neurosci* 15:815-25.
67. Uchida S, Akaike N, Nabekura J (2000) Dopamine activates inward rectifier K+ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology* 39:191-201.
68. Webb CK, McCudden CR, Willard FS, Kimple RJ, Siderovski DP, Oxford GS (2005) D2 dopamine receptor activation of potassium channels is selectively decoupled by Galpha-specific GoLoco motif peptides. *J Neurochem* 92:1408-18.
69. Wetherington JP, Lambert NA (2002) Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors. *J Neurosci* 22:1248-55.
70. White FJ, Wang RY (1984) A10 dopamine neurons: role of autoreceptors in determining firing rate and sensitivity to dopamine agonists. *Life Sci* 34:1161-1170.

71. Williams PJ, Pittman QJ, MacVicar BA (1991) Ca²⁺- and voltage-dependent inactivation of Ca²⁺ currents in rat intermediate pituitary. *Brain Res* 564:12-18.
72. Woodward JJ, Rezazadeh SM, Leslie SW (1988) Differential sensitivity of synaptosomal calcium entry and endogenous dopamine release to omega-conotoxin. *Brain Res* 475:141-145.
73. Yamada K, Teraoka T, Morita S, Hasegawa T, Nabeshima T (1993) Neuropharmacological characterization of voltage-sensitive calcium channels: possible existence of neomycin-sensitive, omega-conotoxin GVIA- and dihydropyridines-resistant calcium channels in the rat brain. *Jpn J Pharmacol* 63:423-32.
74. Yan Z, Song WJ, Surmeier J (1997) D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77:1003-1015.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Dose-dependent inhibition of dopamine overflow by quinpirole

(A) DA was electrically-evoked with a bipolar stimulating electrode and recorded with FSCV using a 5 μm carbon-fiber recording electrode placed in the dorsolateral striatum. (B) Background-subtracted traces showing oxydo-reduction of DA recorded with a triangular voltage ramp (bottom trace). *In vitro* calibration with 1 μM DA (top recording) was used to convert the signal to DA concentrations. DA overflow was electrically-evoked with a 400 μA / 1 ms single stimulation (middle trace). Quinpirole (1 μM) reduced DA overflow more than 75 % (C) Example of DA overflow kinetics. Each dot represents the peak amplitude of each oxidation traces obtained at intervals of 100 ms after a 400 μA / 1 ms single stimulation (D) DA was electrically-evoked at intervals of 2 min. The peak amplitude of DA overflow is normalized to the average amplitude of the first 6 recordings (10 min) of the control period and graphically plotted against time (means \pm SEM). The control trace (n=8;6) shows that evoked DA overflow was stable over time. Quinpirole was applied for 4 min (represented by the gray bar) at 3 different doses. Drug effects were measured at their peak (rectangle at 16 min). The amplitude of the baseline noise in all voltammetry recordings is indicated by the black bar at the bottom. (E) Histogram showing the peak effect of quinpirole on DA overflow. A one-way ANOVA was used to compare groups. The effect of quinpirole at 0.1 μM (n=5;4), 0.5 μM (n=7;4) and 1 μM (n=8;7) was significant. *** $p < 0.001$ *Abbreviations:* aca, anterior commissure anterior part; CPu, Caudate putamen; Quinp, Quinpirole.

Figure 2. Effect of Kv channel blockers on evoked DA overflow.

(A) Summary traces showing the average electrically-evoked DA overflow in response to single electrical pulses after 30 min perfusion with the potassium channel blocker 4-AP (100 μ M) (n=6;2) and r-margatoxin (100 nM) (n=5;3), in comparison to control (n=8;6). Data were normalized to the first 6 recordings (10 min) of their respective control period (means \pm SEM). The effect of other Kv channels blockers is omitted for clarity. (B) Summary graph showing the time-course of the effect of 4-AP (100 μ M) (n=6;2) and r-margatoxin (100 nM) (n=5;3) in comparison to control (n=8;6). DA was electrically evoked at intervals of 2 min. Each group is normalized to the first 6 recordings (10 min) of its respective control period and graphically plotted against time (means \pm SEM). After 10 min of stable recordings, drugs were superfused for 30 min. Apparent equilibrium was reached for all Kv channel blockers after 20 min of application. The effect of others Kv channel blockers is omitted for clarity. (C) Histogram showing the mean increase in DA release during the last 10 min of application of several Kv potassium channel blockers: control (n=8;6), 100 μ M 4-AP (n=6;2), 100 nM r-margatoxin (n=5;3), 100 nM α -dendrotoxin (n=5;3) and r-margatoxin and α -dendrotoxin applied together at 100 nM each (n=4;2). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. *Abbreviations:* 4-AP, 4-aminopyridine; r-Marga, r-margatoxin; α -Dendro, α -dendrotoxin; r-Hetero, r-heteropodatoxin-2.

Figure 3. Implication of Kv1 channels in D2-mediated inhibition of DA release.

(A) Applied alone for 4 min, quinpirole (1 μ M) (n=8;7) induced a large inhibition of evoked DA overflow compared to control (n=8;6). Pre-application (30 min) of 4-AP (100 μ M) (n=6;2) or r-margatoxin (100 nM) (n=5;3) reduced the effect of quinpirole. Data were normalized to the first 6 recordings (10 min) of their respective control period (means \pm SEM). The effect of others Kv channel blockers is omitted for clarity. (B) Time-course of the experiment shown in A. DA was electrically-evoked at intervals of 2 min. Each group was normalized to the first 6 recordings (10 min) of its respective control period (means \pm SEM). The maximal effect of quinpirole was detected after 6 min (represented by the rectangle). (C) Histogram showing the ability of Kv channel blockers to reduce the effect of quinpirole (1 μ M) on evoked DA overflow: no antagonist (quinpirole alone) (n=8;7), 4-AP (100 μ M) (n=6;2), r-margatoxin (100 nM) (n=5;3), α -dendrotoxin (100 nM) (n=5;3), r-margatoxin and α -dendrotoxin applied together (100 nM each) (n=4;2), r-heteropodatoxin-2 (100 nM) (n=6;2, p>0.05). *** p<0.001. *Abbreviations:* 4-AP, 4-aminopyridine; r-Marga, r-margatoxin; α -Dendro, α -dendrotoxin; r-Hetero, r-heteropodatoxin-2.

Figure 4. Lack of implication of GIRK and K_{ATP} channels in D2-mediated inhibition of DA release.

(A) Effect of 30 min perfusion of the GIRK blocker barium (1 mM) (n=5;2) or the K_{ATP} blocker glibenclamide (3 μM) (n=5;3) on DA overflow kinetics compared to control (n=8;6). Data were normalized to the first 6 recordings (10 min) of their respective control period (means ± SEM). No significant effect was noted. (B) Applied alone for 4 min, quinpirole (1 μM) (n=8;7) induced a strong inhibition of evoked DA overflow compared to control (n=8;6). Pre-application (30 min) of barium (1 mM) (n=5;2) or glibenclamide (3 μM) (n=4;2) failed to change the effect of quinpirole. Data were normalized to the first 6 recordings (10 min) of their respective control period (means ± SEM). (C) Time-course of the experiment shown in B. DA was electrically evoked at intervals of 2 min. Each group was normalized to the first 6 recordings (10 min) of its respective control period (means ± SEM). After 30 min of blocker pre-application, quinpirole was superfused for 4 min. The maximal effect of quinpirole was seen after 6 min (rectangle). *Abbreviations:* Glib, glibenclamide,

Figure 5. Electrically-evoked DA overflow requires N-type calcium channels

(A) Maximal effect of different Ca^{2+} channels blockers on evoked DA overflow. The L-type and P/Q-type blockers nifedipine (20 μM) (n=4;2) and ω -agatoxin IVA (200 nM) (n=6;2), applied for 30 min, had no effect (n=8;6). The N-type blocker of ω -conotoxin GVIA, applied for 6 min, decreased DA overflow in a dose-dependent manner: at 100 nM it caused a ~60 % decrease (n=6;2), while at 1 μM (n=4;1) it caused a ~90 % decrease. Data were normalized to the first 6 recordings (10 min) of their respective control period (means \pm SEM). (B) Time-course of the effect of Ca^{2+} channel blockers. DA was electrically-evoked at intervals of 2 min. Each group was normalized to the first 6 recordings (10 min) of its respective control period (means \pm SEM). After 10 min of stable recordings, nifedipine and ω -agatoxin IVA were superfused for 30 min while ω -conotoxin GVIA was applied for 6 min. (C) Histogram showing the mean decrease in DA release during the last 10 min of the application of Ca^{2+} channel blockers. *** $p < 0.001$.
Abbreviations: Nif, nifedipine ; ω -Aga, ω -agatoxin IVA ; ω -Cono, ω -conotoxin GVIA.

Figure 6. Implication of N-type Ca^{2+} channels in D2-mediated inhibition of DA release.

(A) Time-course of the effect of quinpirole on evoked DA overflow in the presence of Ca^{2+} channel blockers. DA was electrically evoked at intervals of 2 min. Each group was normalized to the first 6 recordings (10 min) of its respective control period (means \pm SEM). After 30 min of blocker pre-application, quinpirole (1 μM) was superfused for 4 min. The maximal effect of quinpirole (rectangle) was not modified by nifedipine (20 μM) (n=4;2) nor by ω -agatoxin IVA (200 nM) (n=6;2) compared to quinpirole alone (n=8;7). (B) Histogram showing the maximal effect of 1 μM quinpirole under control conditions (no antagonist, n=8;7) or in the presence of 20 μM nifedipine (n=4;2) or 200 nM ω -agatoxin IVA (n=6;2) (C) Time-course of the effect of a sub-maximal dose of quinpirole (100 nM) on evoked DA overflow in the presence of the N-type Ca^{2+} channel blocker ω -conotoxin GVIA. DA was electrically evoked at intervals of 2 min. Each group was normalized to the first 6 recordings (10 min) of its respective control period (means \pm SEM). After 6 min perfusion with ω -conotoxin GVIA (100 nM) and 20 min of equilibrium, quinpirole (100 nM) was superfused for 4 min. The maximal effect (rectangle) of quinpirole (100 nM) was increased in the presence of ω -conotoxin GVIA (n=4;2) compared to quinpirole alone (n=5;4). (D) Histogram showing the maximal effect of 100 nM quinpirole applied alone (no antagonist, n=5;4) or after a pre-application of 100 nM ω -conotoxin GVIA (n=4;2). *** $p < 0.001$. *Abbreviations:* Nif, nifedipine ; ω -Aga, ω -agatoxin IVA ; ω -Cono, ω -conotoxin GVIA.

FIGURES

Figure 1

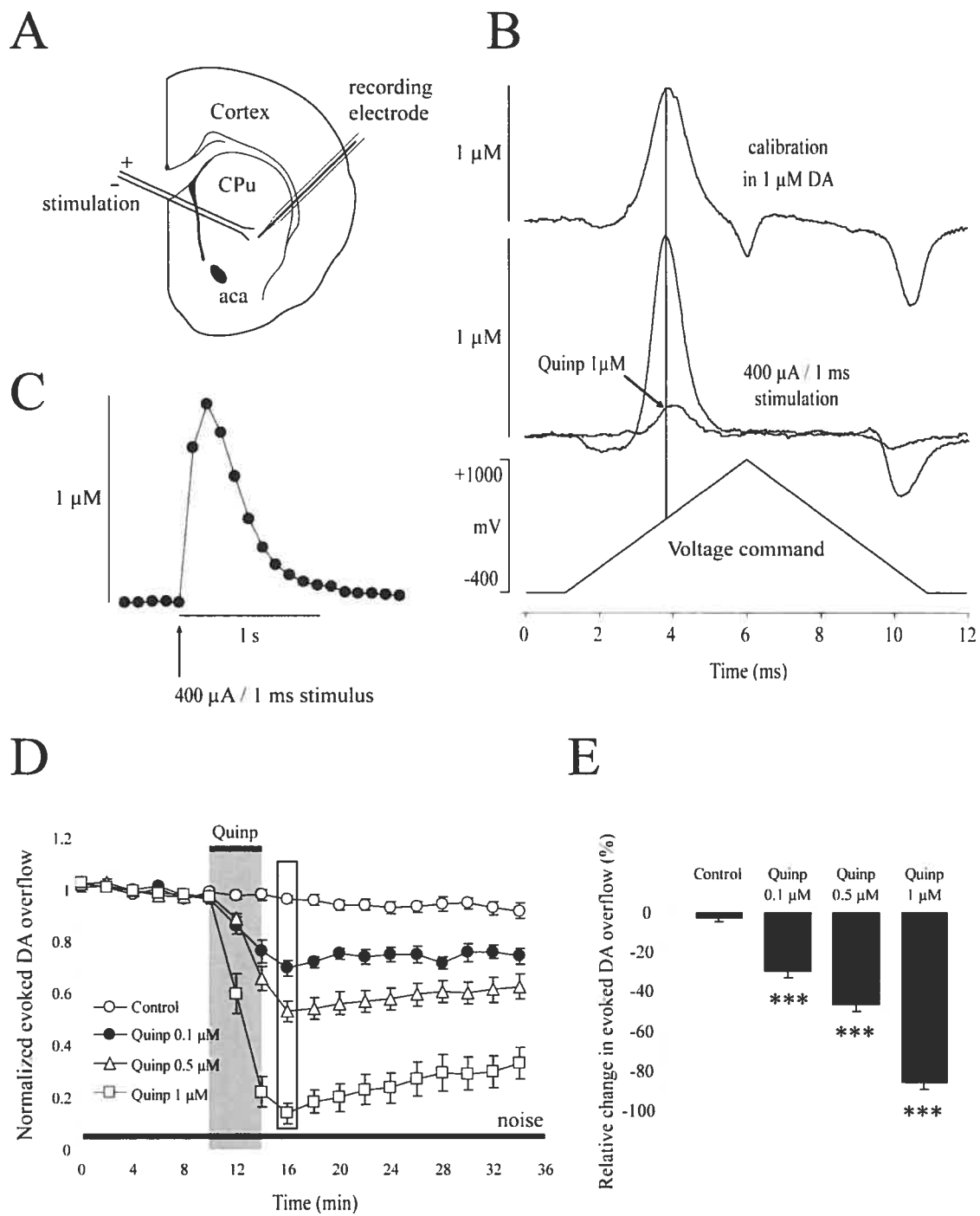


Figure 2

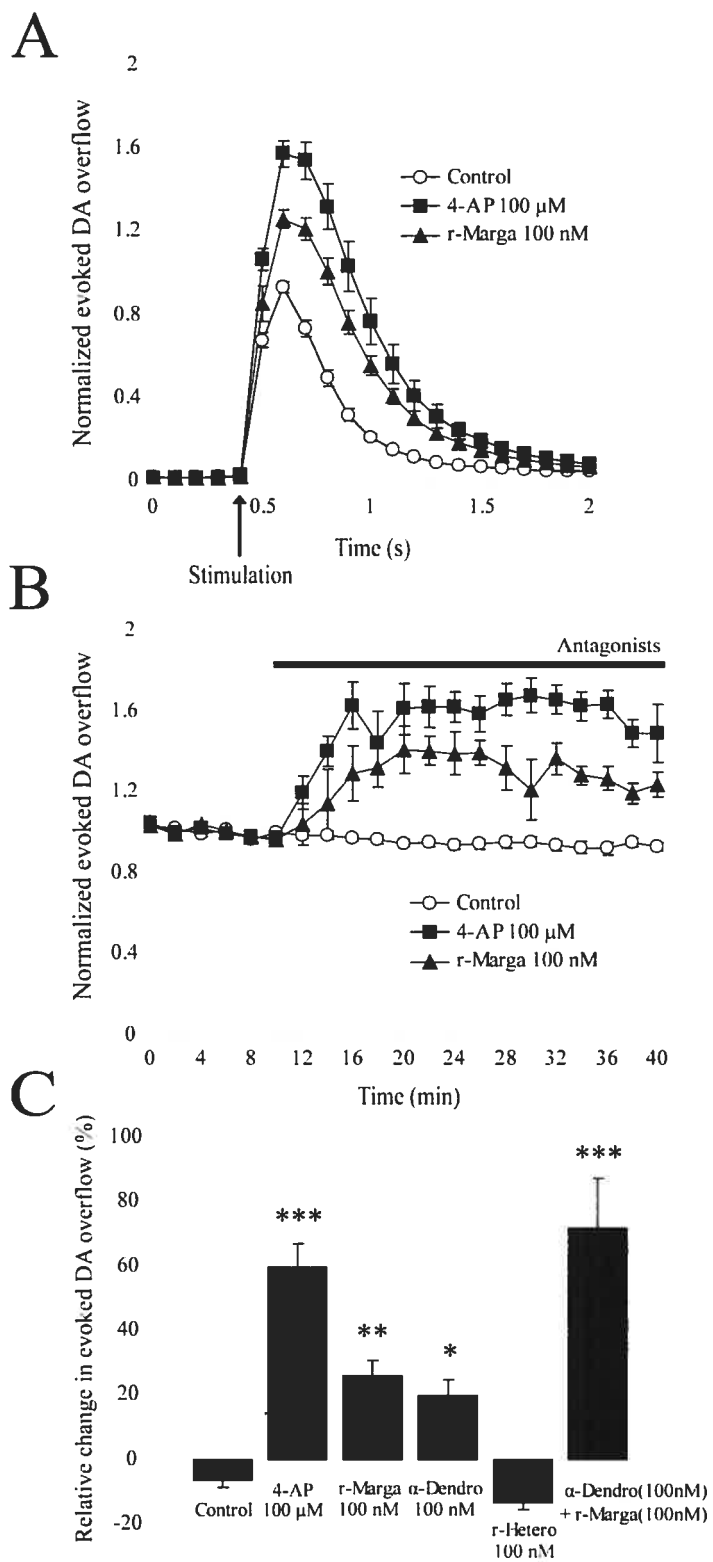


Figure 3

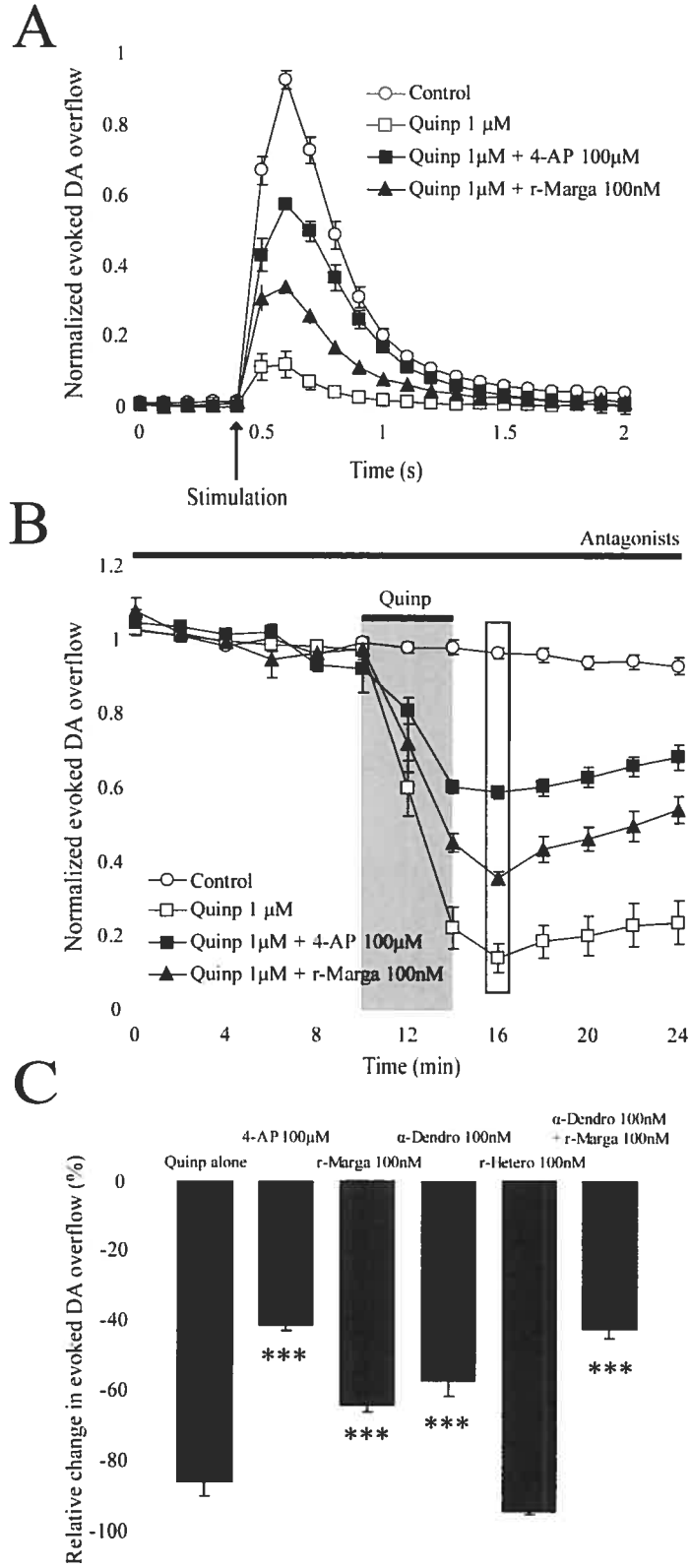


Figure 4

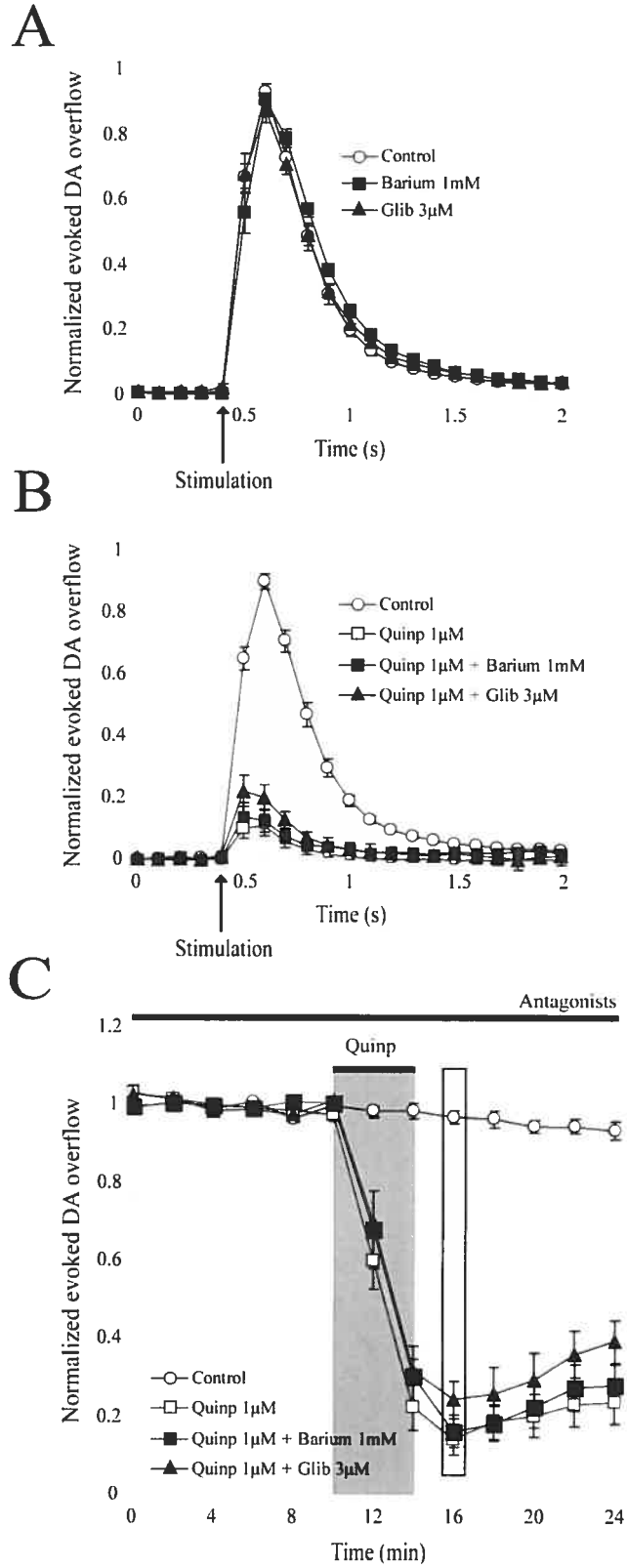


Figure 5

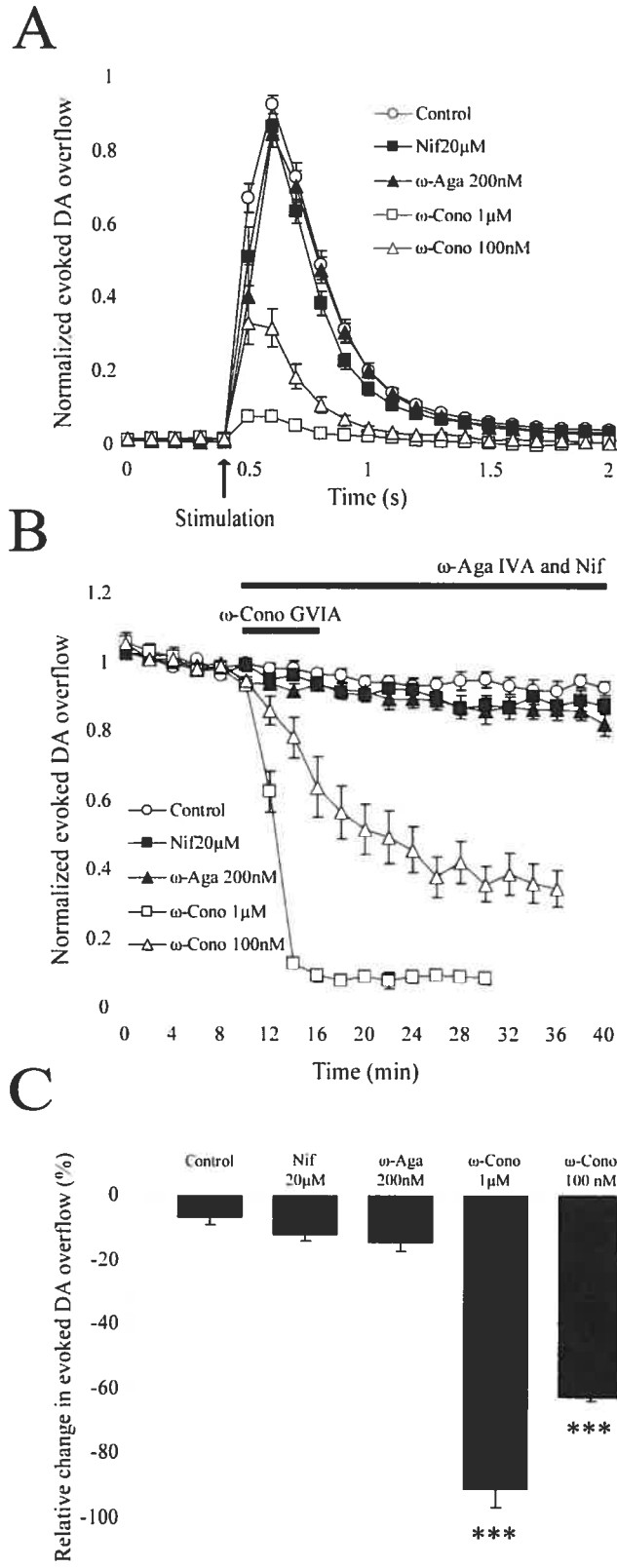
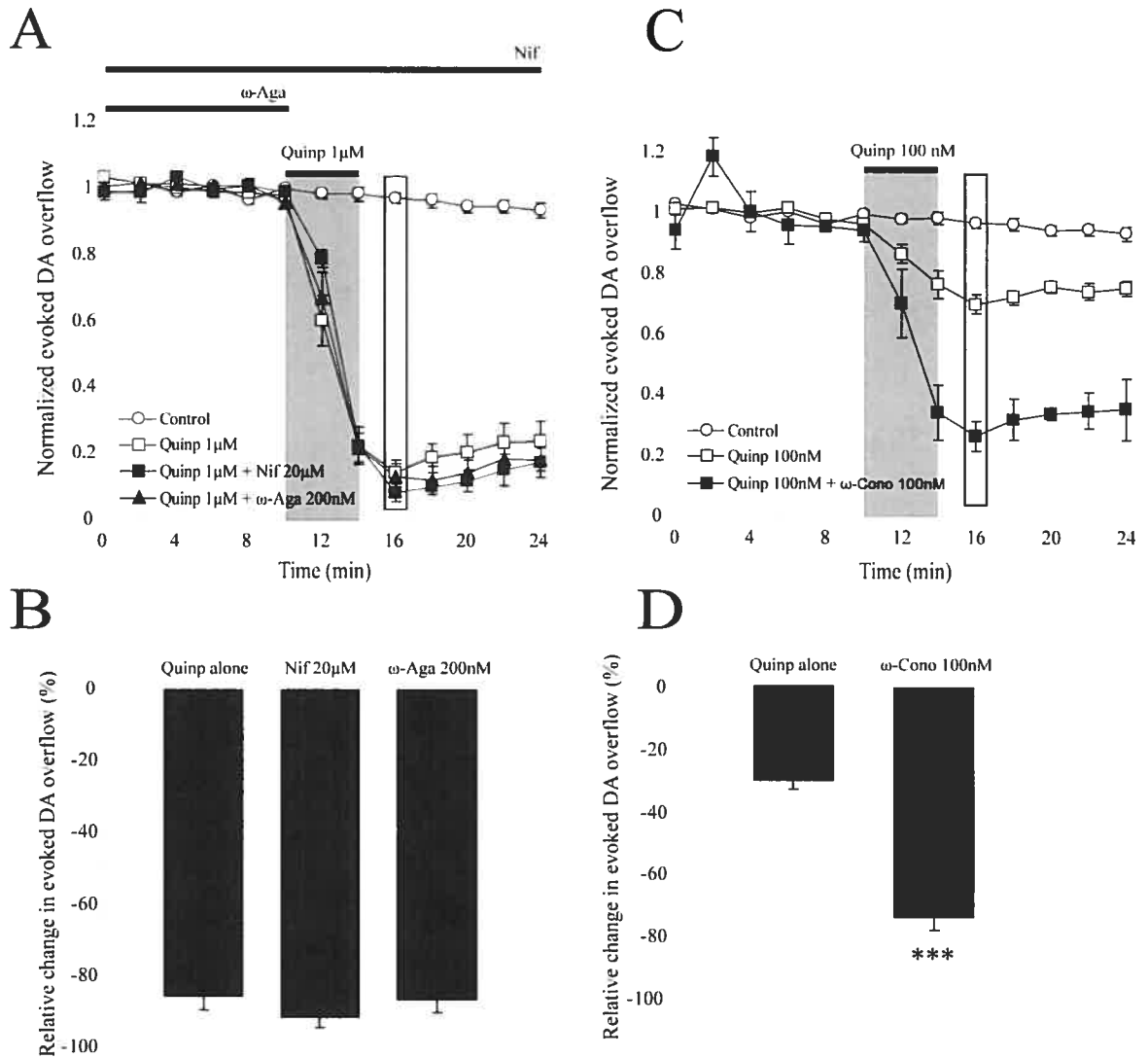


Figure 6



DISCUSSION

6. Considérations méthodologiques

Les résultats présentés dans l'article ont été obtenus avec la technique de voltamétrie cyclique sur coupes de striatum, une structure cérébrale recevant une forte innervation dopaminergique. La libération de DA était évoquée à l'aide de stimulations électriques uniques répétées à un intervalle régulier. Dans cette situation expérimentale, la libération de DA provenait seulement du compartiment terminal des neurones dopaminergiques. Comme c'est le cas pour tous les autres modèles expérimentaux, la voltamétrie cyclique possède certaines limitations qu'il est utile de connaître. Afin de mettre en perspective l'utilisation de cette technique, nous aborderons rapidement les autres techniques qui servent à doser la DA. Nous discuterons par la suite du modèle expérimental utilisé dans ce document et des considérations pharmacologiques reliées à ce modèle.

6.1 Dosage de la dopamine

6.1.1 Techniques diverses

Les neurones dopaminergiques sont capables de relâcher de la DA dans les compartiments somatodendritiques et terminaux (Geffen et al., 1976). Plusieurs modèles expérimentaux ont permis d'élucider les mécanismes fondamentaux de ces deux modes de libération ainsi que leur régulation. La technique de microdialyse est utilisée depuis les années 1970 afin de mesurer la libération terminale et/ou somatodendritique de DA (Delgado et al., 1972; Ungerstedt et Pycock, 1974; Kalivas et Duffy, 1991; Robertson et al., 1991; Heeringa et Abercrombie, 1995). Cette technique permet d'obtenir des échantillons nommés dialysats. Le principe de cette technique repose sur la diffusion qui s'effectue à travers une membrane semi-perméable qu'on implante à l'aide d'une canule positionnée dans la région d'intérêt d'un animal vivant ou dans un fluide organique. Il faut ensuite doser la DA contenue dans les dialysats à l'aide d'autres méthodes telles que la chromatographie (incluant l'HPLC¹) et la spectrométrie de masse (Zhang et Beyer, 2006).

La libération terminale de DA peut être isolée de la libération somatodendritique en implantant la canule dans des régions qui contiennent seulement les terminaisons dopaminergiques. L'inverse est aussi possible si on implante la canule dans les régions qui contiennent les corps cellulaires dopaminergiques. Les techniques de dosage permettent de

¹ Pour *High Performance Liquid Chromatography* en anglais.

suivre l'évolution *in vitro* ou *in vivo* de la concentration de DA et les changements causés par l'application de différentes substances pharmacologiques (de Lange et al., 2000; Fortin et al., 2006). Dans les modèles *in vitro* comme les cultures de neurones, les niveaux de DA reflètent une combinaison de libération terminale et somatodendritique. La libération somatodendritique de DA est moins dépendante des niveaux extracellulaires de calcium que la libération terminale (Chen et Rice, 2001; Fortin et al., 2006). L'utilisation d'une solution saline faible en calcium permet de séparer ces deux types de libérations qui sont présentes simultanément dans les modèles *in vitro* (0,5 mM de calcium vs 2,0 mM en condition normale).

Le principal avantage des techniques de dosage qu'on associe à la microdialyse est leur limite de détection ; on peut détecter des concentrations de DA qui s'approchent de 200 pM (Hows et al., 2004). Les techniques de microdialyse possèdent quelques désavantages. L'implantation d'une canule dans le cerveau d'un animal vivant cause inévitablement des dommages qui affectent l'intégrité du modèle employé. De plus, ces dommages affectent à la fois la relâche et la recapture de DA, ce qui peut interférer avec les phénomènes étudiés (de Lange et al., 2000; Chen, 2005). La résolution temporelle de la microdialyse est assez faible (de l'ordre de la minute) puisqu'elle dépend des échantillons prélevés. Cette faible résolution temporelle ne permet pas l'étude d'événements courts tels que les phénomènes de cinétique associés à la libération des neurotransmetteurs. Les résultats obtenus par cette technique reflètent plutôt les niveaux ambiants de DA qui résultent de la sommation des relâches unitaires au moment du prélèvement de l'échantillon (Zhang et Beyer, 2006).

6.1.2 Techniques électrochimiques

Les techniques électrochimiques, telles la voltamétrie cyclique et l'ampérométrie, sont particulièrement utiles afin de doser les cinétiques rapides de libération et de recapture d'un neurotransmetteur. Tout comme la microdialyse, les techniques électrochimiques permettent de mesurer séparément les libérations terminales et somatodendritiques de DA dans les modèles *in vivo* et *in vitro*. Par une stimulation électrique du MFB chez des animaux vivants, des décharges de DA sont engendrées et on peut ensuite mesurer la libération terminale de DA en implantant une électrode dans le striatum (Rouge-Pont et al., 2002; Wu et al., 2002; Robinson et al., 2003; Fillenz, 2005). La création d'une coupe de cerveau permet de séparer les compartiments somatodendritiques dopaminergiques des compartiments terminaux. Il est ainsi possible de mesurer la libération somatodendritique de DA dans des coupes d'ATV ou de SN (Cragg et Greenfield, 1997; Rice et al., 1997; John et al., 2006) et la libération terminale de DA dans des coupes de striatum ou du noyau accumbens (Hancock et Stamford, 1999; Davidson et al., 2000; Joseph et al., 2002; Cragg, 2003; Borland et Michael, 2004). Les études pharmacologiques sont généralement plus limitées dans les modèles *in vivo*. Avec les modèles *in vitro*, il est beaucoup plus facile de mettre en place un système de perfusion permettant la diffusion contrôlée de substances pharmacologiques dans la coupe de cerveau, ce qui permet de mener des expériences pharmacologiques approfondies.

Les techniques électrochimiques ne sont toutefois pas parfaites et elles causent une altération du milieu biologique qui peut interférer avec les phénomènes étudiés. L'insertion

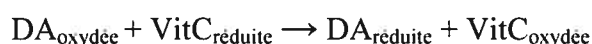
d'une fibre de carbone dans un environnement biologique entraîne inévitablement des lésions tissulaires. On définit «l'espace mort» comme étant la région qui est endommagée par l'insertion d'une fibre de carbone et qui ne peut libérer de neurotransmetteurs. On évalue le rayon de l'espace mort à 6 μm , ce qui est bien peu en comparaison des dommages provoqués par l'insertion d'une canule de microdialyse (Cheng et al., 1979; Schmitz et al., 2001). En considérant une coupe de 300 μm d'épaisseur dans laquelle on introduit une fibre de carbone à environ 100 μm de profondeur, la zone lésée représente tout au plus 1 % du volume de la zone stimulée électriquement. Cette perturbation minimale de l'environnement cérébral permet d'obtenir une libération terminale robuste qui ne s'affaiblit pas de façon substantielle avec le temps. Nos résultats démontrent que la perte de signal est minimale dans la situation témoin en l'absence de traitement pharmacologique et ce, même après soixante minutes de stimulations électriques répétées (~5 % ; résultats non présentés).

Figure 14 : Interférence de la vitamine C avec l'oxydation de la dopamine.

Équation #1 : Oxydation de la dopamine



Équation #2 : Réduction de la dopamine par la vitamine C



Certaines substances peuvent interférer avec la détection électrochimique de la DA. C'est le cas de la vitamine C. Lors de son oxydation, la DA perd deux électrons et il se produit un métabolite ortho-quinone (voir figure 13 et équation 1 de la figure 14 ci-dessus). La vitamine C peut contribuer à la réduction de la DA en interagissant avec la DA oxydée (équation 2 de la figure 14 ci-dessus). Cette nouvelle source de DA réduite (fin de l'équation 2) peut ensuite recommencer la réaction d'oxydation et ce cercle vicieux indésirable cause une surestimation des niveaux de DA. Heureusement, lorsqu'une pente rapide (supérieure à 100V/s) est utilisée dans le protocole de voltamétrie, la réduction de la DA par la vitamine C est minime et les niveaux de DA sont ainsi corrélés aux courants obtenus (Dayton et al., 1980). Malgré ces quelques défauts, la voltamétrie cyclique présente une balance idéale entre données quantitatives et qualitatives. Cette technique permet de doser la DA avec une résolution temporelle de 100 ms, ce qui s'approche d'une mesure en temps réel.

6.2 Libération terminale de dopamine dans le striatum

6.2.1 Identification de la substance oxydable

Le pouvoir discriminant de la voltamétrie cyclique est assez faible et se limite tout au plus à une quinzaine de substances (Heien et al., 2004). Le manque de spécificité est la principale difficulté rencontrée. Ainsi, comment pouvons-nous être convaincus que les résultats obtenus proviennent bel et bien de la libération de DA ? Il est possible de mesurer différents neurotransmetteurs avec les techniques électrochimiques (voir tableau V). Pour cette raison, il incombe à chaque expérimentateur de prouver la nature du signal mesuré. Trois critères permettent de remédier à cette difficulté : les critères anatomiques, les critères électrochimiques et les critères pharmacologiques (Marsden et al., 1988; Garris et Wightman, 1994).

Tout d'abord, il faut rappeler que nous avons inséré l'électrode voltamétrique dans une structure cérébrale riche en terminaisons dopaminergiques : le striatum (voir figure 1A de l'article). Une stimulation électrique localisée dans cette région diminue le nombre potentiel de candidats responsables du signal d'oxydation qui est mesuré. Les noyaux adrénergiques et noradrénergiques ne se projettent pas vers le striatum (Dahlström et Fuxe, 1964a, b; Rogawski et Barker, 1985). Il est donc physiquement impossible que la libération de noradrénaline et/ou de d'adrénaline puisse interférer avec nos résultats. Par contre, les noyaux sérotoninergiques B6 à B8 se projettent vers le striatum, quoique ces projections

soient assez mineures (Dahlström et Fuxe, 1964a, b; Bjorklund et al., 1981; Steinbusch et al., 1981; Descarries et al., 1990). Les études à ce sujet démontrent que l'innervation sérotoninergique du striatum est plus importante dans les régions rostrales que dans les régions caudales (Mrini et al., 1995). Ainsi, le noyau accumbens qui est situé en amont du striatum reçoit plus de projections sérotoninergiques que le striatum caudal (Van Bockstaele et Pickel, 1993; Pickel et Chan, 1999). Il est intéressant de noter que dans certaines conditions spéciales, les neurones dopaminergiques sont capables de cosécréter de la sérotonine (Stamford et al., 1990; Jackson et Wightman, 1995; Zhou et al., 2005). Toutefois, ce phénomène semble être absent dans la physiologie normale. Globalement, les critères anatomiques nous apprennent qu'il est peu probable que la sérotonine constitue une portion importante des courants associés à l'oxydation dans le striatum dorsolatéral.

En second lieu, les critères électrochimiques sont essentiels à la reconnaissance d'une substance. En effet, la forme, la position et l'amplitude des pics d'oxydo-réductions permettent d'obtenir une information qualitative sur la nature d'une substance. Les pics d'oxydo-réductions des monoamines peuvent toutefois se chevaucher. Pour cette raison, il n'est pas toujours facile de distinguer les neurotransmetteurs présents simultanément dans une même préparation. Rappelons que la sérotonine possède deux pics distincts de réduction, ce qui la différencie de la DA (tableau V). Tous les tracés d'oxydo-réduction que nous avons obtenus ne contenaient qu'un seul pic de réduction. Le profil d'oxydo-réduction de la substance présente dans le striatum à la suite de stimulations électriques dans le striatum ressemble en tout point au profil d'oxydo-réduction de la DA obtenu lors de calibrations *in vitro* (un seul pic d'oxydation à environ +500mV et un seul pic de réduction

à environ -400mV). Finalement, les critères pharmacologiques permettent l'ajout d'informations additionnelles quant à l'identification d'une substance donnée. Par exemple, la stimulation des autorécepteurs D2 a entraîné une puissante diminution du signal obtenu (voir figure 1D de l'article).

Toutes ces observations suggèrent fortement que la substance oxydable qui est présente dans le striatum dorsolatéral à la suite d'une stimulation électrique est de la DA contenue dans les terminaisons axonales de la voie nigrostriée. Dans notre contexte expérimental, la libération de DA s'apparentait à un processus physiologique d'exocytose. Les stimulations électriques ne provoquaient aucune libération de DA lorsque les niveaux de calcium extracellulaires étaient grandement réduits et lorsque l'activité électrique des neurones était inhibée par une toxine spécifique (résultats non présentés¹). Ces résultats sont en accord avec la littérature (Stamford et al., 1984; Bull et Sheehan, 1991; Cragg et Greenfield, 1997; Phillips et Stamford, 2000; Chen et Rice, 2001; Chen et al., 2006a).

¹ Nos données expérimentales obtenues par voltamétrie cyclique dans le noyau accumbens montrent une inhibition presque complète des niveaux de DA après l'application d'une solution saline faible en calcium (0,5 mM) et une inhibition complète des niveaux de DA après l'application de tétrodontoxine (1 μ M).

6.2.2 Considérations physiologiques et pharmacologiques

Les résultats *in vivo* montrent que la concentration basale de DA dans le striatum est de l'ordre de 100 nM (Williams et Millar, 1990). Dans notre modèle, une stimulation électrique unique provoque une libération de DA de l'ordre de 1 μ M, ce qui s'avère dix fois plus élevé. Dans un contexte expérimental, cette sécrétion évoquée électriquement demeure essentielle pour effectuer des études pharmacologiques puisque la limite de détection de notre instrumentation, approximativement de 60 nM, s'approche trop des concentrations basales de DA. La tétrodothoxine est une toxine qui inhibe sélectivement certains canaux sodiques dépendants du voltage (Catterall et al., 2005a). On sait depuis longtemps que ces derniers sont importants dans la genèse et la formation d'un potentiel d'action dans les neurones (Hodgkin et Huxley, 1952). Une application de tétrodothoxine empêche toute libération de DA dans notre système (résultats non présentés¹). Ainsi, même si une stimulation électrique du striatum entraîne des niveaux de DA très élevés en comparaison à la physiologie normale, nous pouvons affirmer que cette libération s'effectue par le biais d'un mécanisme normal, soit le potentiel d'action.

Les études électrophysiologiques *in vivo* montrent que les neurones dopaminergiques possèdent trois modes distincts d'activité électrique (Grace et Bunney, 1984a, b; Freeman et Bunney, 1987). Ces neurones peuvent être silencieux (aucun potentiel d'action), présenter un mode spontané d'activité à basse fréquence², aussi appelé «mode

¹ Une application de cinq minutes de tétrodothoxine à une concentration de 1 μ M suffisait pour réduire les niveaux de DA d'environ 90 %.

² Potentiels d'action émis à une fréquence de 3-8 Hz.

tonique», ou finalement s'activer sous un mode de salves à haute fréquence¹. Le mode tonique permet d'entretenir une quantité basale de DA dans le milieu. Par contre, lorsque les neurones dopaminergiques adoptent le mode de salves à haute fréquence, la concentration extracellulaire de DA s'élève (Chergui et al., 1994). Les récepteurs dopaminergiques (D₁ à D₅) peuvent se présenter avec des affinités différentes. Richfield et ses collaborateurs rapportent que dans le striatum, les récepteurs de la famille D1 sont majoritairement présents sous une forme à basse affinité (IC₅₀ de 1 µM), tandis que les récepteurs de la famille D2 sont présents sous une forme à haute affinité (IC₅₀ de 10 nM) (Richfield et al., 1989). On croit que le mode d'activité tonique des neurones dopaminergiques permet l'activation des récepteurs de la famille D2 à haute affinité, tandis que l'élévation de la concentration de DA causée par le mode en salves pourrait activer les récepteurs D1 à basse affinité (Fillenz, 2005).

Selon ce modèle, les récepteurs de la famille D2 devraient être continuellement stimulés dans le striatum d'animaux vivants, puisque les concentrations basales de DA dépassent l'IC₅₀ des récepteurs D2. En accord avec cette affirmation, l'application d'un antagoniste D2 provoque une augmentation des niveaux de DA dans des coupes de striatum et du noyau accumbens lorsque des stimulations électriques de haute fréquence sont utilisées, mais pas lorsque la relâche de DA est induite par des stimulations électriques uniques (Lee et al., 2001; Schmitz et al., 2001; Cragg, 2003; Fawaz et al., article en

¹ Deux à six potentiels d'action rapides qui sont séparés par des moments d'inactivité.

préparation). Les résultats que nous avons obtenus au laboratoire sont en accord avec cette affirmation (résultats non présentés¹).

L'utilisation de coupes de striatum pour étudier le mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂ est un modèle qui s'écarte quelque peu de la réalité *in vivo*. Tout d'abord, lors de la préparation d'une coupe de cerveau, les terminaisons dopaminergiques sont libérées de la régulation *in vivo* par les autres systèmes présents dans le cerveau entier. Cette séparation, quoique non physiologique, permet l'étude du mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂ dans un contexte simplifié, ce qui en facilite la compréhension. Puisque les terminaisons dopaminergiques sont séparées du corps cellulaire neuronal, elles sont aussi dépourvues d'activité électrique spontanée et les concentrations basales de DA sont très basses (Gulledge et al., 2005). Pour pallier à cette difficulté, il faut utiliser une stimulation électrique qu'on applique directement sur la coupe de striatum (voir figure 11).

On sait depuis longtemps que la fonction des neurones dopaminergiques est modulée négativement par des autorécepteurs de la famille D₂ (Farnebo et Hamberger, 1971). Une séparation pharmacologique complète des récepteurs dopaminergiques est souvent difficile (voir tableau I). D'ailleurs, le quinpirole possède une affinité 10 fois supérieure pour le récepteur D₃ que pour le récepteur D₂ (Sokoloff et al., 1990; Missale et al., 1998). La littérature initiale sur le sujet proposait que les récepteurs D₂ et D₃ pouvaient remplir le rôle d'autorécepteur, car ils sont tous deux présents sur les neurones

¹ Une application de sulpiride (5 μ M) provoquait une augmentation (~ 80 %) des niveaux de DA lorsque des stimulations électriques à 10 Hz étaient utilisées, mais pas lorsque nous utilisions des stimulations électriques uniques.

dopaminergiques (Sokoloff et al., 1990; Gainetdinov et al., 1994; Diaz et al., 2000; Zapata et al., 2001). Les résultats obtenus à l'aide des modèles de délétion d'un gène (KO pour *knock-out*) ont permis d'éclaircir davantage ce sujet. Les fonctions pharmacologiques et physiologiques attribuées aux autorécepteurs sont conservées chez les souris KO pour le récepteur D₃, mais absentes ou grandement diminuées chez les souris KO pour le récepteur D₂ (Joseph et al., 2002; Rouge-Pont et al., 2002; Schmitz et al., 2002). Le récepteur D₂ semble donc être le principal autorécepteur qui module le fonctionnement des neurones dopaminergiques ; le récepteur D₃ posséderait un rôle plutôt mineur (Mercuri et al., 1997; L'Hirondel et al., 1998). Rappelons qu'il y a beaucoup plus de récepteurs D₂ dans les neurones dopaminergiques que de récepteurs D₃ et que le récepteur D₃ est faiblement exprimé dans le striatum (Sokoloff et al., 1990; Bouthenet et al., 1991; Van Tol et al., 1991; Levesque et al., 1992).

Afin d'étudier le mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂, nous avons opté pour une activation pharmacologique à l'aide du quinpirole. Une application de cet agoniste diminuait rapidement la relâche de DA, ce qui est en accord avec le rôle d'autorécepteur qu'on accorde aux récepteurs D₂ (Onali et al., 1985; Kalivas et Duffy, 1991; Kennedy et al., 1992; L'Hirondel et al., 1998; Pothos et al., 1998; Usiello et al., 2000; Wang et al., 2000; Congar et al., 2002; Schmitz et al., 2002; Bamford et al., 2004a; Hu et al., 2005). Une application initiale de sulpiride, un antagoniste D₂, empêchait complètement l'action du quinpirole (résultats non présentés¹). L'IC₅₀ du quinpirole pour les récepteurs D₂ à haute affinité du striatum varie entre 5 nM et 25 nM selon le modèle utilisé (Pizzi et al., 1988;

¹ Une préapplication (20 minutes) de sulpiride (5 µM) empêchait complètement l'action du quinpirole (1 µM).

Delgado et al., 2000; Nguyen et Watts, 2005; Loffler et al., 2006). Une lecture inattentive de nos résultats peut amener à croire que l' IC_{50} de cet agoniste dans notre modèle est de 500 nM (voir figure 1D de l'article). Cette différence notable s'explique aisément lorsqu'on considère qu'une courte application de quatre minutes est insuffisante pour permettre une diffusion complète de l'agoniste et pour obtenir son effet maximal. En vérité, notre méthodologie cause une surestimation apparente de la valeur de l' IC_{50} du quinpirole.

Quoi qu'il en soit, la diffusion complète du quinpirole à l'intérieur des coupes de striatum ne nous importait guère. Il était beaucoup plus intéressant d'obtenir une cinétique d'activation rapide et reproductible de l'autorécepteur D_2 à l'aide d'une concentration élevée de quinpirole (1 μ M) que d'obtenir un effet maximal après une longue période de perfusion de quinpirole à faible concentration. Cette courte application de quinpirole et la cinétique de l'effet subséquent constituait le fondement de notre méthodologie pharmacologique. L'analyse de la modification de cette cinétique en réponse à un antagoniste quelconque nous a permis d'analyser le mécanisme d'action moléculaire de l'autorécepteur D_2 (voir figure 3B de l'article pour un exemple illustratif).

Tableau VI

Antagonistes (concentration utilisée)	Sous-unités potassiques ciblées		
	K _v	K _{ir}	K _{2p}
4-Aminopyridine (0,1 mM)	1.1 (0,2-1 mM) 1.2 (0,2-0,8 mM) 1.3 (0,2-1,5 mM) 1.4 (0,7-13 mM) 1.5 (0,1-0,4 mM) 1.6 (0,3-1,5 mM) 1.7 (0,2-0,3 mM) 1.8 (1,5 mM) 2.1 (0,5-18 mM) 2.2 (1,5 mM) 3.1 (0,02-0,6 mM) 3.2 (0,1-0,9 mM) 3.3 (1,2 mM) 3.4 (0,5-0,6 mM) 4.1 (9 mM) 4.2 (2-5 mM) 4.3 (5-10 mM)	7.1 (10 mM)	
rMargatoxine (100 nM)	1.3 (0,1-0,2 nM) 1.6 (3-5 nM) 1.7 (116 nM)		
α-Dendrotoxine (100 nM)	1.1 (12-150 nM) 1.2 (0,4-24 nM) 1.3 (250 nM) 1.4 (>100 nM) 1.6 (9-25 nM)		
rHétéropodatoxine-2 (100 nM)	4.2 (16-100 nM)		
Glibenclamide (3 μM)		6.1/SUR2B (0,1-3 μM) 6.2/SUR1 (2-10 nM) 6.2/SUR2A (0,2-1 μM) 6.2/SUR2B (1 μM)	
Barium (1 mM)	1.8 (5 mM) 2.1 (30 mM)	1.1 (70 μM) 2.1 (0,2-3 μM) 2.2 (0,5-6 μM) 2.3 (2-183 μM) 2.4 (72-390 μM) 3.1 (10-100 μM) 3.2 (100 μM) 3.4 (100 μM) 4.1 (3-99 μM) 7.1 (1 mM)	2.1 (1 mM) 4.1 (1 mM) 6.1 (0,1 mM) 13.1 (1 mM) 16.1 (1 mM) 17.1 (1 mM) 18.1 (3 mM)

Tableau VI (suite)

Antagonistes (concentration utilisée)	Sous-unités ciblées		
	Ca_v1	Ca_v2	Autres
Nifédipine (20 µM)	Ca _v 1.3 (2-3 µM) Ca _v 1.4 (0,3-1 µM)		K _v 1.1 (96 µM) K _v 1.2 (18 µM) K _v 1.3 (5 µM) K _v 1.5 (81 µM) K _v 3.1 (131 µM) K _v 4.3 (150 µM) K _{Ca} 3.1 (4 µM)
ω-Agatoxine IVA (200 nM)		Ca _v 2.1 1-30 nM (type P) 200 nM (type Q)	
ω-Conotoxine GVIA (100 et 1 000 nM)		Ca _v 2.2 (10-20 nM)	

Tableau VI : Spectre d'action des différents antagonistes utilisés. Les antagonistes possèdent tous un spectre d'action différent et il est utile de le connaître afin d'introduire la discussion des résultats obtenus. Les valeurs entre parenthèses représentent l'IC₅₀ des antagonistes pour chacune des sous-unités ioniques ciblées.

Références

(Woodward et al., 1988; Grupe et al., 1990; Ruppertsberg et al., 1990; Ferroni et al., 1992; Mintz et al., 1992; Werkman et al., 1992; Garcia-Calvo et al., 1993; Grissmer et al., 1994; Lesage et al., 1995; Sanguinetti et al., 1997; Kuzhikandathil et al., 1998; Coetzee et al., 1999; Meir et al., 1999; Alagem et al., 2001; Harvey, 2001; Rajan et al., 2001; Song et Ashcroft, 2001; Ji et al., 2002; Michna et al., 2003; Lim et al., 2004; McRory et al., 2004; Catterall et al., 2005b; Goldstein et al., 2005; Gutman et al., 2005; Kubo et al., 2005; Wei et al., 2005; Bett et al., 2006)

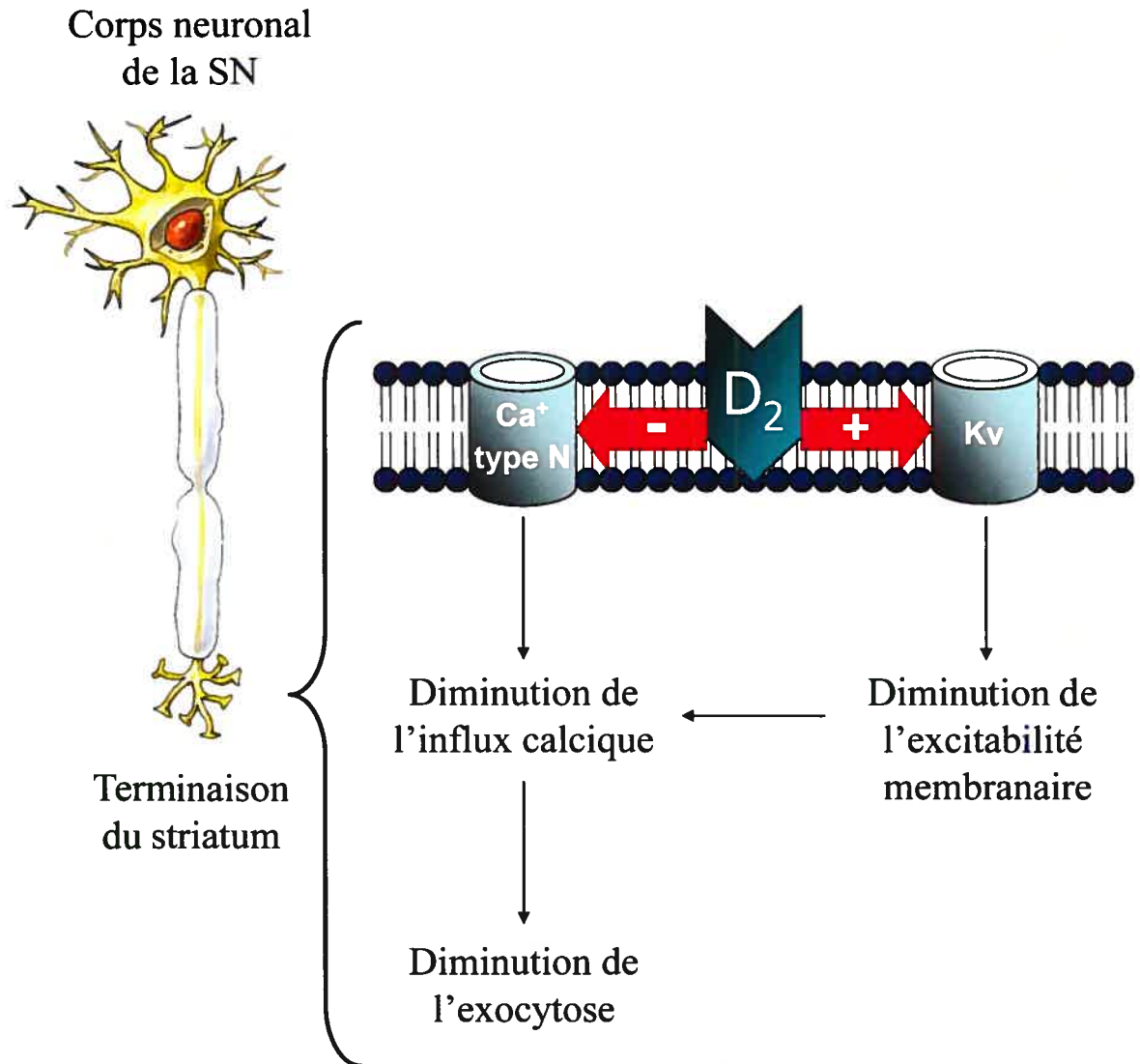


Figure 15 : Représentation schématique des résultats obtenus. Les autorécepteurs D₂ présents sur les terminaisons dopaminergiques peuvent inhiber la libération de dopamine. Cet effet important résulte d'une activation des canaux potassiques dépendants du voltage contenant les sous-unités de type K_v et d'une inhibition des canaux calciques de type N.

7. Mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂

La libération terminale de DA est contrôlée par des autorécepteurs de type D₂. Ces autorécepteurs sont exprimés dans les compartiments terminaux des neurones dopaminergiques et ont comme fonction de diminuer la quantité de DA libérée par les terminaisons (Strait et Kuczenski, 1986; Onali et Olanas, 1989; L'Hirondel et al., 1998). Notre objectif principal était de comprendre ce mécanisme. Dans ce projet, nous avons utilisé une approche de voltamétrie cyclique par fibre de carbone afin de mesurer en temps réel la libération axonale de DA dans des coupes de striatum de rats, une structure cérébrale qui reçoit une forte innervation dopaminergique. À l'aide d'antagonistes, nous avons démontré que certains canaux potassiques dépendants du voltage contenant des sous-unités de type K_v sont nécessaires à la fonction de l'autorécepteur D₂. L'activation des canaux potassiques pourrait avoir comme conséquence de diminuer l'excitabilité membranaire des terminaisons et indirectement réduire l'entrée de calcium nécessaire à l'exocytose. Comme deuxième mécanisme, nous proposons l'inhibition des canaux calciques de type N. Nous avons montré que ces canaux calciques dépendants du voltage sont essentiels à l'exocytose terminale de DA dans le striatum. Une modulation négative de ces canaux par l'autorécepteur D₂ aurait comme conséquence une diminution de l'exocytose.

7.1 Canaux potassiques dépendants du voltage

Les canaux potassiques sensibles au voltage sont responsables de trois courants distincts dans les neurones (Dodson et Forsythe, 2004). Les conductances activées par une faible dépolarisation (ex. K_{V1}) modulent la fréquence de décharge des neurones (Wu et Barish, 1992; Wang et McKinnon, 1995; Everill et al., 1998). Les conductances potassiques activées par une grande dépolarisation (ex. K_{V3}) sont importantes dans la repolarisation membranaire qui suit un potentiel d'action (Radhakrishna et al., 1996; Baranauskas et al., 1999; Rudy et McBain, 2001). Finalement, les courants transitoires sortants, aussi appelés courants A (ex. K_{V4}) modulent aussi l'excitabilité membranaire. Les sous-unités responsables de ces trois types de courants peuvent être colocalisées dans les terminaisons axonales (Dodson et Forsythe, 2004).

Nous avons utilisé initialement un bloqueur à large spectre des sous-unités K_V , soit la 4-AP. La concentration de 4-AP utilisée (100 μ M), se rapproche davantage de l' IC_{50} des K_{V1} et des K_{V3} pour cet antagoniste (voir tableau VI). Ces deux familles de sous-unités K_V sont responsables des conductances potassiques activées par une petite dépolarisation (K_{V1}) et activées par une grande dépolarisation (K_{V3}). Nos résultats avec la 4-AP suggèrent une implication des sous-unités K_{V1} et/ou K_{V3} dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 . Ces résultats sont en accord avec une étude *in vitro* récente effectuée dans notre laboratoire par Congar et ses collaborateurs (Congar et al., 2002). Nos résultats sont aussi en accord avec d'autres études qui montrent que le récepteur D_2 peut augmenter certaines conductances potassiques dans les neurones de la SN, dans les cellules

lactotrophes et dans les neurones striataux (Lacey et al., 1987, 1988; Vallar et Meldolesi, 1989).

Les données que nous avons obtenues avec les toxines peptidiques (rMargatoxine et α -Dendrotoxine) confirment l'implication des sous-unités $K_v1.1$, 1.2 , 1.3 et 1.6 dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 . Nos résultats accordent donc une importance particulière aux conductances activées par une petite dépolarisation. Cette implication est tout à fait cohérente lorsqu'on considère que les sous-unités K_v1 peuvent supprimer l'hyperexcitabilité terminale chez le rat en élevant le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action (Southan et Robertson, 1998; Dodson et al., 2003; Ishikawa et al., 2003). De plus, les études immunohistochimiques démontrent que ces sous-unités sont présentes dans les terminaisons axonales de plusieurs systèmes différents (Sheng et al., 1993; Wang et al., 1994; Veh et al., 1995). Les courants portés par les sous-unités K_v1 sont activés près du seuil de déclenchement d'un potentiel d'action et ils s'inactivent lentement, rajoutant un effet supplémentaire sur les potentiels d'actions de haute fréquence (Dodson et Forsythe, 2004).

Les études d'occlusion accordent une importance toute particulière aux sous-unités $K_v1.1$ et $K_v1.2$. Par exemple, les homotétramères $K_v1.2$ et les hétérotétramères $K_v1.1/1.2$ sont présents dans les terminaisons présynaptiques (Dodson et al., 2003). La formation d'hétérotétramères entre ces sous-unités complique les choses puisqu'il existe peu de toxines peptidiques possédant une spécificité absolue pour une seule sous-unité K_v1 . Les toxines Dendrotoxine-K et Tityustoxine- $K\alpha$, qui sont spécifiques respectivement pour les

sous-unités $K_{V1.1}$ et $K_{V1.2}$, pourraient aider à caractériser davantage l'implication des sous-unités de la famille K_V1 dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 .

Qu'en est-t-il des sous-unités K_{V3} qui portent les conductances potassiques activées par une grande dépolarisation ? On sait que ces sous-unités peuvent moduler directement la libération de certains neurotransmetteurs en diminuant la durée des potentiels d'action et en favorisant une repolarisation rapide (Rudy et McBain, 2001). De plus, les études immunohistochimiques montrent que les sous-unités K_{V3} peuvent être localisées dans les terminaisons axonales (Moreno et al., 1995; Veh et al., 1995; Weiser et al., 1995; Ishikawa et al., 2003; Brooke et al., 2004a; Brooke et al., 2004b). Une application combinée des toxines rMargatoxine et α -Dendrotoxine (blocage combiné de plusieurs K_{V1}) reproduit entièrement l'effet de la 4-AP, un bloqueur à large spectre des K_V . Cette observation suggère que les conductances potassiques portées par d'autres sous-unités que les K_{V1} ne sont pas importantes dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 . Cette supposition est vraie à la seule condition que l'effet pharmacologique maximal de la 4-AP sur les K_{V1} soit atteint à une concentration de 100 μ M.

À une concentration de 100 μ M, la 4-AP peut bloquer plusieurs sous-unités de type K_{V1} et K_{V3} . Rappelons que dans notre modèle, la 4-AP augmente les niveaux de DA dans le striatum d'environ 60 % et que l'effet pharmacologique du quinpirole est coupé de moitié en présence de cet antagoniste. Ces résultats pourraient être expliqués par une combinaison d'effets antagonisants sous-maximaux des sous-unités K_{V1} *et* K_{V3} . D'ailleurs, Van Bogaert rapporte que l'effet de la 4-AP sur le potentiel d'action est différent à des

concentrations de 100 μM , 1 mM et 5 mM, ce qui suggère qu'à une concentration de 100 μM , la 4-AP ne bloque pas entièrement les sous-unités K_v disponibles¹ (Van Bogaert et Snyder, 1982). Il serait éventuellement intéressant d'utiliser des concentrations plus élevées de 4-AP (de l'ordre du mM) afin de vérifier s'il est possible de bloquer une plus grande partie de l'effet du quinpirole. En considérant un tel scénario, il serait possible que l'autorécepteur D_2 module aussi les courants potassiques activés par une grande dépolarisation. Pour confirmer ces dires, nous proposons d'utiliser d'autres toxines spécifiques pour les sous-unités K_v3 , comme les toxines BDS-I² et BDS-II (Gutman et al., 2005; Yeung et al., 2005).

Dans le compartiment somatodendritique, les courants transitoires sortants de type A sont généralement portés par les sous-unités K_v4 (Hoffman et al., 1997; Song et al., 1998; Pongs, 1999). Les études d'hybridation *in situ* montrent que la SN exprime seulement l'ARNm des sous-unités $K_v4.3$ et que le striatum contient beaucoup d'ARNm des sous-unités $K_v4.2$ et peu d'ARNm des $K_v4.1$ (Serodio et Rudy, 1998). Ces résultats démontrent que les neurones dopaminergiques possèdent les sous-unités $K_v4.3$ dans leur compartiment somatodendritique. L'ARNm des sous-unités $K_v4.2$ qui est présent dans le striatum pourrait appartenir aux interneurons cholinergiques de cette région (Song et al., 1998).

¹ Cette concentration (100 μM) est inférieure à la valeur de l' IC_{50} de plusieurs sous-unités K_v1 et K_v3 pour la 4-AP.

² Pour «*blood depressing substance*» en anglais.

Nos expériences avec la toxine peptidique rHétéropodatoxine-2 spécifique pour les sous-unités Kv4.2 sont en accord avec les observations décrites plus haut. Nous avons démontré que cette sous-unité n'a aucun rôle dans la libération striatale de DA et qu'elle n'est pas modulée par l'autorécepteur D₂. Nos expériences ne permettent pas d'éliminer avec certitude l'implication des autres sous-unités K_v4. Les corps neuronaux dopaminergiques contiennent l'ANRm des sous-unités K_v4.3 et il est possible que les terminaisons dopaminergiques expriment cette sous-unité. De plus, la concentration de 4-AP que nous avons utilisée est inférieure à l'IC₅₀ des sous-unités K_v4 pour cet antagoniste (voir tableau VI). Liu rapporte qu'une concentration de 2 à 4 mM de 4-AP est nécessaire afin de bloquer les courants transitoires de type A dans les neurones dopaminergiques et que les récepteurs D₂ peuvent moduler ces courants au niveau somatodendritique (Liu et al., 1994). D'autres études devront être effectuées afin de vérifier si une activation des courants de type A est impliquée dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂. Nous proposons l'utilisation d'une autre toxine peptidique, la Phrixotoxine-2, qui cible spécifiquement les sous-unités K_v4.2 et K_v4.3 (Diochot et al., 1999; Gutman et al., 2005).

Au niveau terminal, les courants transitoires sortants de type A peuvent être portés par d'autres sous-unités que les K_v4, comme les K_v1.4, 3.3 et 3.4 (Veh et al., 1995; Rhodes et al., 1997; Meir et al., 1999; Pongs, 1999). Les courants de type A ont une fonction très particulière dans les terminaisons axonales ; on les considère comme un filtre de l'activité électrique. Lorsque l'activité électrique des neurones est de basse fréquence, les courants de type A terminaux sont actifs, ce qui empêche la transmission des potentiels d'action

dans les terminaisons et par conséquent, l'exocytose de neurotransmetteurs. Lorsque l'activité électrique neuronale est élevée (supérieure à 3-10 Hz), les courants de type A terminaux s'inactivent, ce qui permet la transmission des potentiels d'action dans les terminaisons et l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. Les sous-unités $K_v1.4$, 3.3 et 3.4 portant les courants de type A dans les terminaisons déterminent en quelque sorte la fréquence minimale nécessaire à l'exocytose de neurotransmetteurs (Roepker et al., 1997).

Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de mettre sur pied d'autres études pharmacologiques. Une séparation pharmacologique complète de la sous-unité $K_v1.4$ est assez difficile avec l'arsenal pharmacologique dont on dispose présentement. Un composé non-peptidique, le UK-78,282, bloque spécifiquement les sous-unités $K_v1.3$ et 1.4 avec une IC_{50} de 200-300 nM (Nguyen et al., 1996; Hanson et al., 1999). Il faudrait étudier l'effet additif de ce composé en présence d'un bloc complet des sous-unités $K_v1.3$, par exemple en présence de rMargatoxine. En résumé, nos résultats sur l'implication des canaux potassiques dépendants du voltage dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 sont concluants mais demeurent limités dans leur portée puisqu'il faut considérer l'implication d'autres canaux potassiques. Nous confirmons l'implication des conductances activées par une petite dépolarisation ($K_v1.1$, 1.2, 1.3 et 1.6). Nous suggérons la possibilité d'une implication additionnelle des conductances activées par une grande dépolarisation (K_v3 ?). Finalement, il pourrait être opportun d'étudier également l'implication des courants de type A.

7.2 Canaux potassiques à rectification entrante

Nos résultats infirment l'hypothèse que les autorécepteurs D₂ pourraient moduler les canaux potassiques à rectification entrante. Aux concentrations utilisées, le barium (1 mM) est un bloqueur non sélectif de plusieurs sous-unités Kir et le glibenclamide (3 μ M) un bloqueur des Kir6, via les sous-unités auxiliaires SUR (voir tableau VI). Les différentes familles de Kir possèdent des profils d'expression anatomique distincts. La seule sous-unité de la famille Kir1 (Kir1.1) possède un rôle majeur dans la sécrétion de potassium dans le rein (Boim et al., 1995; Yoo et al., 2004). Cette sous-unité est aussi retrouvée dans le cerveau (Kondo et al., 1996). L'ARNm des sous-unités Kir2 est retrouvée dans le striatum et le noyau accumbens (Karschin et al., 1996). Ces sous-unités semblent toutefois impliquées dans des actions postsynaptiques, car elles sont exprimées dans les neurones GABAergiques du striatum (Dong et al., 2006; Falk et al., 2006). Les sous-unités Kir4 et Kir5 ne sont pas exprimées dans les neurones, mais le sont dans les astrocytes (Neusch et al., 2003; Chen et al., 2004; Hibino et al., 2004; Neusch et al., 2006).

Parmi les quatre sous-unités de Kir3 (GIRK), seulement les sous-unités Kir3.1, 3.2 et 3.3 (ou GIRK1-2-3) sont exprimées dans le cerveau. La sous-unité Kir3.4 (GIRK4) est majoritairement présente dans le cœur et à quelques endroits isolés du cerveau (Karschin et al., 1996; Chen et al., 1997). Les études immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* montrent des niveaux très élevés de GIRK2 dans l'ATV et la SN, tandis que le striatum montre un profil plus faible pour tous les GIRK (Karschin et al., 1996; Chen et al., 1997; Murer et al., 1997). Les sous-unités Kir3 sont régulées par les récepteurs couplés aux

protéines G. Plusieurs études montrent que les récepteurs de la famille D2 sont capables d'activer ces canaux (Lacey et al., 1987; Kuzhikandathil et al., 1998; Uchida et al., 2000; Webb et al., 2005). Les récepteurs D_{2L} et D₃ transfectés dans des modèles cellulaires activent les canaux GIRK et seulement 10 μ M de barium est nécessaire afin d'empêcher l'effet du quinpirole (Kuzhikandathil et al., 1998; Kuzhikandathil et Oxford, 2000).

Nos résultats démontrent qu'une application pharmacologique de barium et de glibenclamide ne produit aucun effet sur la libération évoquée de DA dans le striatum. En présence de ces deux bloqueurs, l'action de l'autorécepteur D₂ reste inchangée, ce qui suggère que l'autorécepteur D₂ terminal ne peut moduler les Kir3 et 6. Nos résultats sont en contradiction apparente avec d'autres études qui montrent que dans un modèle semblable au nôtre, un blocage spécifique des GIRK¹ ou des K_{ATP} provoque une augmentation des niveaux de DA dans le striatum (Avshalumov et al., 2003; Avshalumov et Rice, 2003).

L'absence d'effet apparent du barium et du glibenclamide sur nos préparations pourrait être expliquée par différentes raisons. Les résultats d'Avshalumov ont été obtenus sur des cochons d'Inde et la libération de DA était provoquée par des stimulations électriques à haute fréquence, ce qui diffère de notre modèle expérimental (stimulations électriques uniques chez le rat). De plus, il faut considérer les caractéristiques biophysiques des Kir. En effet, le courant associé à la rectification entrante peut se produire entre les potentiels d'action en moins d'une milliseconde, mais une partie non négligeable de ce courant peut aussi s'étendre sur une période de 500 millisecondes (Hille, 2001). Pour ces

¹ Avec la tertiapine-Q, une toxine peptidique spécifique pour les GIRK1 et GIRK3.

raisons, nous devrions vérifier si un protocole de stimulations électriques à haute fréquence (par exemple 10 Hz pendant 3 secondes) pourrait donner des résultats différents. Les neurones dopaminergiques expriment majoritairement les sous-unités Kir3.2 (GIRK2) et le profil d'expression semble être majoritairement dans le compartiment somatodendritique. Il est possible que ces sous-unités ne possèdent aucune fonction au niveau terminal chez le rat, ce qui expliquerait nos résultats (Davila et al., 2003; Guatteo et al., 2004).

L'implication des canaux K_{ATP} dans la physiologie normale des neurones est encore mal connue. On croit que ces canaux seraient impliqués dans la réduction de l'exocytose durant des processus anormaux comme l'hypoglycémie ou l'hypoxie afin de protéger les neurones (Meir et al., 1999). La contribution des canaux K_{ATP} dans les conductances potassiques terminales serait assez mineure en situation normale, mais cette contribution augmente lorsque les niveaux de glucose ou d'oxygène diminuent (Deist et al., 1992; Takata et al., 1992).

7.3 Canaux calciques dépendants du voltage

Les sous-unités qui forment les canaux calciques sont divisées en trois classes. Les courants de type L, P/Q, N, R et T sont formés respectivement par les sous-unités $Ca_v1.x$, $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.3$ et $Ca_v3.x$ (voir figure 8). Tous les types de courants calciques peuvent être présents dans les neurones, mais certaines sous-unités redondantes comme la sous-unité $Ca_v1.1$ peuvent être absentes (Beam et al., 1992; Catterall et al., 2005b). Le rôle d'un canal calcique est déterminé par ses propriétés moléculaires, mais aussi par sa distribution anatomique dans un neurone. Les canaux calciques de type N, P/Q et R sont localisés à la zone active des terminaisons axonales et ils sont impliqués dans la relâche terminale de plusieurs neurotransmetteurs (Miller, 1990; Dunlap et al., 1995; Tsien et al., 1995; Wu et al., 1999). Les études à ce sujet montrent que les canaux de type N et P/Q sont majoritairement impliqués dans la relâche terminale de DA, tandis que les canaux R et T possèdent un rôle mineur. Les canaux de type L ne sont généralement pas impliqués dans le mécanisme d'exocytose terminale ; ils sont confinés sur les corps cellulaires et les dendrites des neurones où ils possèdent un rôle dans l'intégration postsynaptique (Ahlijanian et al., 1990; Westenbroek et al., 1990; Yuste et Denk, 1995; Bergquist et al., 1998; Kapur et al., 1998; Phillips et Stamford, 2000; Chen et al., 2006a).

À l'aide de toxines peptidiques spécifiques, nous avons confirmé que les canaux calciques de type N ont un rôle important dans la libération terminale de DA, mais nous avons infirmé une contribution significative des canaux calciques de type P/Q et L dans ce mécanisme. Ces résultats sont en accord avec plusieurs données de la littérature concernant

les canaux calciques de type N et L (Woodward et al., 1988; Kato et al., 1992; Bergquist et al., 1998). Par contre, nos résultats sur les canaux calciques de type P/Q sont en désaccord avec d'autres travaux démontrant une implication majoritaire des canaux de type P/Q dans la libération terminale de DA (Harvey et al., 1996; Bergquist et al., 1998; Dobrev et Ravens, 2003; Chen et al., 2006a). Comment pourrions-nous expliquer cette discordance ?

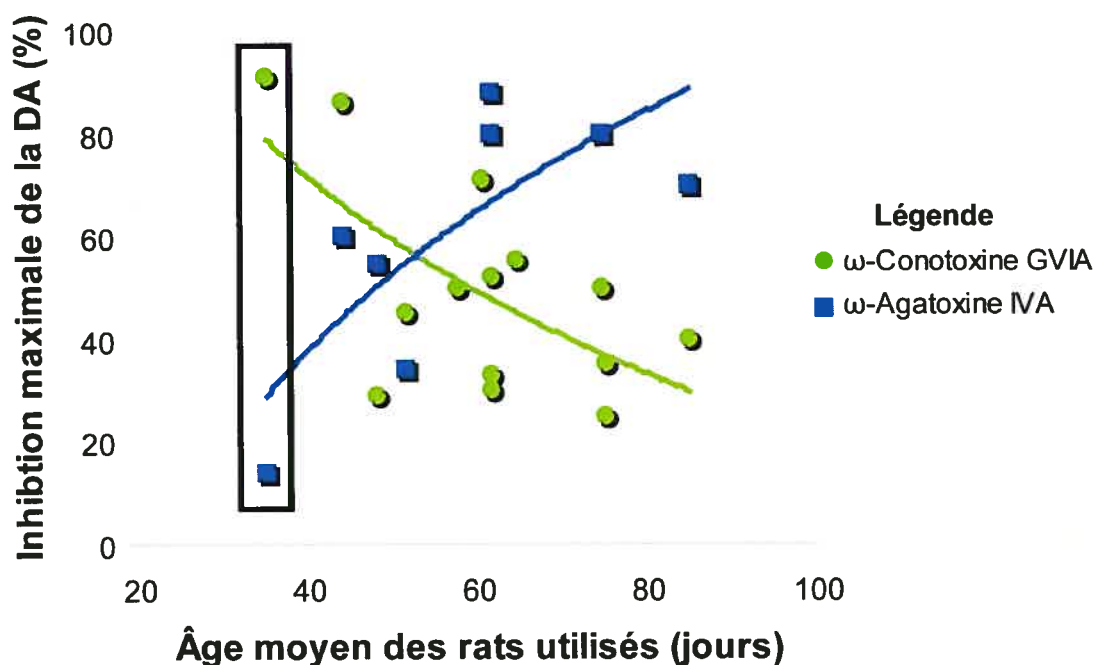


Figure 16 : Méta-analyse sur la dépendance calcique de la libération striatale de DA en fonction de l'âge chez le rat. Les données ont été recueillies à partir de treize articles mesurant l'effet des toxines ω -Conotoxine GVIA (30 nM à 1 μ M) et ω -Agatoxine IVA (100 nM à 1 μ M) sur la libération terminale de DA dans le striatum ou dans des préparations dérivées de cette structure. Les concentrations de DA étaient mesurées par voltamétrie cyclique, HPLC, chromatographie et spectrométrie. Lorsque l'âge des rats n'était pas disponible, il était déduit à l'aide des échelles de poids disponibles sur le site de Charles Rivers Laboratories, Inc.¹. Une corrélation logarithmique a été ajoutée afin d'illustrer la tendance ($R^2 = 0,4$ et $0,6$ pour ω -Conotoxine GVIA et ω -Agatoxine IVA respectivement). Nos résultats ont été obtenus chez des rats âgés d'en moyenne 35 jours (entourés d'un rectangle).

Références

(Herdon et al., 1985; Woodward et al., 1988; Herdon et Nahorski, 1989; Kato et al., 1992; Yamada et al., 1993; Kimura et al., 1995b; Harvey et al., 1996; Prince et al., 1996; Dobrev et Andreas, 1997; Bergquist et al., 1998; Hirota et al., 2000; Phillips et Stamford, 2000; El Ayadi et al., 2001; Dobrev et Ravens, 2003)

¹ <http://www.geneticmodels.com/index.html>

Une nouveauté intéressante dans le domaine des canaux calciques est celle de leur localisation différentielle au cours du développement. En effet, des études immunohistochimiques et électrophysiologiques suggèrent que tôt dans le développement neuronal, les canaux calciques de type N sont impliqués dans l'exocytose des neurotransmetteurs (Pravettoni et al., 2000). Par contre, plus tard dans le développement, les canaux de type N seraient exclus partiellement des terminaisons et leur rôle dans l'exocytose terminale serait grandement diminué.

D'ailleurs, la toxine ω -Conotoxine GVIA inhibe presque complètement la relâche de neurotransmetteurs en culture de neurones immatures alors qu'elle inhibe partiellement cette même relâche chez des neurones matures (~15 jours). Pour sa part, la toxine ω -Agatoxine IVA inhibe moins bien la relâche de neurotransmetteurs dans les cultures immatures, ce qui laisse croire que les canaux calciques de type P/Q sont moins importants à un stade précoce du développement (Scholz et Miller, 1995; Verderio et al., 1995). Whyte et ses collaborateurs ont montré que dans les cultures de neurones dopaminergiques immatures (1-7 jours), les courants calciques portés par les canaux de type P/Q représentent seulement 10 % des courants calciques totaux, tandis que les courants portés les canaux de type N représentent environ 30-40 % des courants totaux (Whyte et Greenfield, 2002).

Puisqu'aucune donnée convaincante sur ce sujet n'existe pour les terminaisons dopaminergiques, nous avons réalisé une méta-analyse de tous les articles que nous avons pu trouver sur la libération terminale de DA dans le striatum chez le rat (figure 16). La tendance générale qu'il est possible de dégager concernant la libération de DA est la

suivante. Plus l'âge des rats augmente, plus l'importance des canaux calciques de type P/Q semble augmenter et plus celle des canaux de type N semble diminuer. À notre connaissance, aucune étude de ce genre n'a utilisé des rats aussi jeunes que les nôtres (35 jours en moyenne). En comparant nos résultats à ceux obtenus dans la littérature, il serait tentant d'avancer que nous avons accidentellement trouvé l'âge auquel les canaux calciques de type P/Q ne sont pas encore importants dans l'exocytose terminale de DA. Selon la méta-analyse de la figure 16, une transition importante semble avoir lieu dans le développement *in vivo* des neurones dopaminergiques autour de 45 jours. Des études plus approfondies devront être entreprises afin de caractériser ce phénomène. En effet, il serait important de vérifier l'effet de ces toxines peptidiques sur la libération de DA provenant de coupes de striatum de rats d'âges divers.

Nos résultats proposent un lien entre l'autorécepteur D₂ et les canaux calciques de type N. Plusieurs autorécepteurs peuvent agir via l'inhibition des canaux calciques (Dittman et Regehr, 1996; Miller, 1998). Certains résultats de la littérature montrent qu'en culture, le récepteur D₂ peut inhiber les canaux calciques de type N, probablement au niveau somatodendritique (Cardozo et Bean, 1995; Momiyama et Koga, 2001; Stefani et al., 2002). Dans le contexte où les canaux calciques de type N seraient moins importants dans la libération terminale de DA chez les neurones matures, une modulation négative de ces canaux par l'autorécepteur D₂ terminal devrait être moins importante ou possiblement absente. Une étude électrophysiologique effectuée sur les neurones GABAergiques du striatum montre que le récepteur D₂ inhibe les canaux calciques de type N et que

l'importance quantitative de ce mécanisme diminue avec l'âge des rats¹ (Momiya, 2002).

Cette possibilité pourrait réconcilier nos résultats avec ceux obtenus par Congar et collaborateurs dans le même laboratoire (Congar et al., 2002). Rappelons que cette étude éliminait complètement l'implication des canaux calciques dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D₂ terminal et que les mesures ont été effectuées sur des cultures de neurones dopaminergiques (12-20 jours). En culture, les neurones atteignent l'état de maturité à environ 15-20 jours, alors qu'en condition *in vivo*, cette maturation peut être un peu plus longue. Il faut cependant rappeler que dans cette étude, la libération de DA n'a pas été mesurée directement, puisque la colibération de glutamate était utilisée comme index indirect de l'activité des terminaisons.

Notre étude exclue la possibilité que les autorécepteurs D₂ puissent agir via une inhibition des canaux calciques de type L et P/Q. Puisque les canaux de type L peuvent supporter l'exocytose de neurotransmetteurs très tôt dans le développement neuronal, il serait intéressant de reproduire notre méthodologie sur des rats naissants et de vérifier si l'autorécepteur D₂ peut interagir via l'inhibition de ces canaux (Pravettoni et al., 2000). De plus, il serait aussi important de vérifier si l'autorécepteur D₂ peut inhiber les canaux calciques de type P/Q chez des animaux plus âgés. Rappelons qu'à un stade d'immaturité, les canaux P/Q sont responsables d'une portion négligeable des courants calciques totaux dans les neurones dopaminergiques (Whyte et Greenfield, 2002), mais que le récepteur D₂

¹ Il s'agit donc du récepteurs D₂ postsynaptique et non de l'autorécepteur D₂ localisé sur les terminaisons dopaminergiques.

peut inhiber les canaux P/Q dans les neurones dopaminergiques matures en culture (Cardozo et Bean, 1995). Quoi qu'il en soit, nos résultats démontrent qu'une modulation négative des canaux calciques de type N par l'autorécepteur D₂ terminal est possible chez des rats immatures et il est fort possible que ce mécanisme soit aussi présent chez les rats matures.

7.4 Mécanismes intracellulaires de régulation

Jusqu'à ce jour, aucune recherche ne s'était encore intéressée aux mécanismes intracellulaires faisant le lien entre l'autorécepteur D_2 et les canaux ioniques impliqués dans son action inhibitrice sur la libération de DA. Autrement dit, comment l'autorécepteur D_2 peut-il activer les sous-unités potassiques de type K_V et inhiber simultanément les canaux calciques de type N ? Rappelons tout d'abord que l'autorécepteur D_2 est un récepteur couplé aux protéines G_{ai} et G_{ao} et qu'il inhibe l'activité de la PKA (Lachowicz et Sibley, 1997; Seamans et Yang, 2004). Se pourrait-il que cette kinase soit impliquée dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 ?

Si la PKA était le médiateur faisant interagir l'autorécepteur D_2 et les sous-unités K_V , il faudrait que cette kinase régule *négativement* l'activité des sous-unités K_V . Ainsi, une inhibition de la PKA par l'autorécepteur D_2 aurait comme effet net d'augmenter les conductances potassiques terminales. En accord avec cette hypothèse, la PKA peut inhiber les courants potassiques de type A au niveau somatodendritique dans plusieurs types de neurones (Hampson et al., 1995; Mu et al., 2000; Hu et al., 2003). Par contre, les sous-unités K_V portant les courants de type A au niveau terminal (ex. sous-unités $K_{V1.4}$ et K_{V3}) semblent plutôt être activées par la PKA (Atzori et al., 2000; Tao et al., 2005). Similairement, les sous-unités $K_{V1.1}$ possèdent des sites de phosphorylation pour la PKA, mais cette kinase semble avoir un effet positif sur la fonction de cette sous-unité (Ivanina et al., 1994; Winklhofer et al., 2003). En effet, une activation de la PKA augmente l'amplitude des courants portés par la sous-unité $K_{V1.1}$. D'autre part, la PKA semble

également influencer la synthèse de cette protéine et sa présence dans les membranes (Bosma et al., 1993; Levin et al., 1995).

Il existe un lien direct entre la protéine $G\beta\gamma$ et la modulation des canaux GIRK via les récepteurs couplés aux protéines G (Dascal, 2001). D'ailleurs, il s'avère que le récepteur D_2 peut activer les GIRK de cette façon (Webb et al., 2005). Par contre, nos résultats semblent suggérer qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme localisé au compartiment somatodendritique seulement. Une régulation potentielle des sous-unités K_v par la protéine $G\beta\gamma$ est possible, mais les rares études dont la littérature fait mention semblent suggérer qu'il s'agirait d'un effet indirect passant par la modulation d'autres protéines telles que la syntaxine et les sous-unités régulatrices $K_v\beta$ (Jing et al., 1999; Michaelovski et al., 2002). Pour ajouter un niveau de complexité additionnel, mentionnons que les sous-unités régulatrices $K_v\beta$ interagissent majoritairement avec les sous-unités K_v1 et qu'elles peuvent elles-mêmes être modulées par différents médiateurs comme la PKA et la PKC (Li et al., 2006).

Le principal médiateur impliqué dans la régulation des canaux calciques est fort probablement la protéine $G\beta\gamma$ (Catterall, 2000; Dascal, 2001; Herlitze et al., 2001; Zamponi, 2003; Catterall et al., 2005b). Une étude récente démontre que le récepteur D_2 peut inhiber les canaux calciques de type N dans des cellules mélanotropes et que la moitié de cet effet implique les protéines $G\beta\gamma$ (Zhang et al., 2004). La partie restante de cette inhibition pourrait être expliquée par d'autres études s'attardant sur les interactions entre les protéines de la famille SNARE et les canaux calciques de type N. Ce domaine d'étude

demeure encore mal compris et plusieurs groupes s'affairent à élucider ce mécanisme. Par exemple, la protéine syntaxine module positivement les canaux calciques de type N et demeure importante dans la régulation de ces canaux par les récepteurs couplés aux protéines G (Jarvis et al., 2002; Zamponi, 2003; Jarvis et Zamponi, 2005). De plus, une phosphorylation de la syntaxine par la PKC peut empêcher l'effet modulateur positif que cette protéine d'exocytose entretient envers les canaux calciques de type N, permettant ainsi une régulation de ce mécanisme à l'aide de seconds messagers (Yokoyama et al., 1997; Jarvis et Zamponi, 2001).

En résumé, les données présentes dans la littérature convergent vers le fait qu'il est peu probable que la PKA soit importante dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 , mais qu'un rôle prédominant de la protéine $G\beta\gamma$ pourrait expliquer en grande partie son effet sur les canaux ioniques (Neve et al., 2004). Pour confirmer ces hypothèses, nous pourrions tout d'abord étudier l'effet de certains activateurs spécifiques des kinases ainsi que l'effet de diverses phosphatases sur la libération de DA et sur l'action du quinpirole. De cette façon, il serait possible d'évaluer le rôle de la PKA dans le mécanisme d'action de l'autorécepteur D_2 . L'évaluation du rôle de la protéine $G\beta\gamma$ dans ce même mécanisme serait plus complexe puisqu'il n'existe aucun inhibiteur non peptidique de cette protéine. Il serait par contre envisageable de tenter de faire entrer des peptides bloquant la fonction du dimère $G\beta\gamma$. Pour se faire, il faudrait utiliser de courtes séquences fusogènes (peptides TAT) qui permettent à diverses protéines de passer la membrane plasmique. Cette méthode a d'ailleurs été appliquée dans une étude récente sur le fonctionnement des récepteurs $GABA_B$ (Pontier et al., 2006).

7.5 Exocytose vésiculaire

La régulation de l'exocytose ne se limite pas seulement à la réduction de l'entrée de calcium découlant d'une modulation des canaux ioniques. Prenons l'exemple d'une protéine importante dans l'exocytose, SNAP-25. Cette dernière contient des sites de régulation pour la PKC et la PKA (Shimazaki et al., 1996; Morgan et al., 2005). Dans les cellules chromaffines, la PKA doit être constitutivement active afin de phosphoryler la protéine SNAP-25, ce qui permet aux vésicules d'être constamment prêtes pour l'exocytose (Nagy et al., 2004). Rappelons que l'autorécepteur D₂ peut inhiber l'activité de la PKA. Afin de réguler la libération de DA, l'autorécepteur D₂ pourrait diminuer la phosphorylation de la protéine SNAP-25, ce qui la rendrait moins active. En accord avec cette hypothèse, une stimulation de la PKA ou une inhibition des phosphatases peut augmenter la libération de neurotransmetteurs par les neurones (Capogna et al., 1995; Victor et al., 1995; Trudeau et al., 1996a; Sistiaga et Sanchez-Prieto, 2000).

Plusieurs récepteurs sont capables de moduler les quantités de neurotransmetteurs par une modulation des protéines de la machinerie d'exocytose vésiculaire (Gereau et Conn, 1995; Scanziani et al., 1995; Tyler et Lovinger, 1995; Capogna et al., 1996; Trudeau et al., 1996b). La plupart des preuves que nous possédons à ce sujet concernent la réduction de la libération de glutamate. Les conditions expérimentales utilisées dans ces expériences suggèrent que l'inhibition de cette libération résulte d'un mécanisme en aval de l'entrée de calcium. Congar et collaborateurs ont montré que le récepteur D₂ terminal peut diminuer la co-libération de glutamate par les neurones dopaminergiques par un mécanisme impliquant

des canaux potassiques et par une modulation directe de la machinerie protéique d'exocytose (Congar et al., 2002). Ces auteurs ont suggéré la possibilité d'un lien entre les canaux potassiques des terminaisons et le mécanisme d'exocytose, une possibilité appuyée par l'observation récente que les protéines syntaxine et SNAP-25 peuvent interagir avec la sous-unité Kv1.1 (Fili et al., 2001; Ji et al., 2002). Dans notre modèle expérimental, aucun antagoniste n'a réussi à produire un bloc complet de l'effet pharmacologique de l'autorécepteur D₂. Une modulation directe de la machinerie vésiculaire d'exocytose est donc théoriquement possible.

8. Conclusion

Les autorécepteurs D₂ modulent le fonctionnement des neurones dopaminergiques (Farnebo et Hamberger, 1971). Au niveau terminal, ils inhibent la libération de DA (Stamford et al., 1991; Kennedy et al., 1992; L'Hirondel et al., 1998). L'objectif du présent travail était de clarifier ce mécanisme dans une préparation *in vivo* de coupes de striatum. Nous avons posé l'hypothèse d'une double implication ionique, soit une activation des canaux potassiques et une inhibition des canaux calciques. Les résultats obtenus et présentés dans le présent travail ont permis de confirmer cette hypothèse de travail ; nous proposons que l'autorécepteur D₂ terminal peut activer des canaux potassiques contenant certaines sous-unités de type K_{v1} et qu'il peut aussi simultanément inhiber les canaux calciques de type N. Une action concertée sur les canaux calciques et les canaux potassiques est parfaitement adaptée afin de produire une inhibition rapide de la libération axonale de DA.

Les résultats présentés dans ce mémoire cadrent particulièrement bien dans le contexte de nombreux travaux récents qui montrent que d'autres récepteurs présynaptiques couplés aux protéines G α /o possèdent la capacité d'inhiber la libération de neurotransmetteurs via un mécanisme semblable à celui que nous avons identifié. Par exemple, les récepteurs cannabinoïdes sont capables de réduire des conductances calciques et d'augmenter des conductances potassiques dans les neurones (Deadwyler et al., 1995; Henry et Chavkin, 1995; Pan et al., 1996; Twitchell et al., 1997). Il est intéressant de noter

qu'au niveau terminal, la modulation des canaux ioniques par les récepteurs cannabinoïdes est indépendante de la PKA (Kreitzer et Regehr, 2001; Ralevic, 2003; del Carmen Godino et al., 2005), même si au niveau somatodendritique, ces mêmes récepteurs peuvent inhiber cette kinase (Howlett et al., 1986; Bidaut-Russell et al., 1990). Ce double mécanisme ionique que nous proposons pour l'autorécepteur D₂ terminal est donc raisonnable dans le contexte des connaissances actuelles sur plusieurs autres récepteurs couplés aux protéines G. Plusieurs aspects de ce mécanisme restent toutefois obscurs. De nombreux travaux additionnels seront nécessaires afin d'évaluer de nouvelles pistes fascinantes concernant ce récepteur qui exerce un puissant contrôle sur la libération de DA à divers endroits dans le cerveau.

BIBLIOGRAPHIE

- Aghajanian GK, Bunney BS (1977) Dopamine "autoreceptors": pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 297:1-7.
- Ahlijanian MK, Westenbroek RE, Catterall WA (1990) Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron* 4:819-832.
- Alagem N, Dvir M, Reuveny E (2001) Mechanism of Ba(2+) block of a mouse inwardly rectifying K+ channel: differential contribution by two discrete residues. *J Physiol* 534:381-393.
- Albert PR, Neve KA, Bunzow JR, Civelli O (1990) Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J Biol Chem* 265:2098-2104.
- Alfonta L, Katz E, Willner I (2000) Sensing of acetylcholine by a tricomponent-enzyme layered electrode using faradaic impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, and microgravimetric quartz crystal microbalance transduction methods. *Anal Chem* 72:927-935.

American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV (2000) Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV-TR, 4th Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association.

Ariano MA, Sibley DR (1994) Dopamine receptor distribution in the rat CNS: elucidation using anti-peptide antisera directed against D1A and D3 subtypes. *Brain Res* 649:95-110.

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.

Arvan P, Castle D (1998) Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J* 332 (Pt 3):593-610.

Atlas D, Wiser O, Trus M (2001) The voltage-gated Ca²⁺ channel is the Ca²⁺ sensor of fast neurotransmitter release. *Cell Mol Neurobiol* 21:717-731.

Atzori M, Lau D, Tansey EP, Chow A, Ozaita A, Rudy B, McBain CJ (2000) H2 histamine receptor-phosphorylation of Kv3.2 modulates interneuron fast spiking. *Nat Neurosci* 3:791-798.

Avshalumov MV, Rice ME (2003) Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11729-11734.

Avshalumov MV, Chen BT, Marshall SP, Pena DM, Rice ME (2003) Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. *J Neurosci* 23:2744-2750.

Bamford NS, Robinson S, Palmiter RD, Joyce JA, Moore C, Meshul CK (2004a) Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci* 24:9541-9552.

Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L, Sulzer D (2004b) Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 42:653-663.

Baranauskas G, Tkatch T, Surmeier DJ (1999) Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 K(+) channels. *J Neurosci* 19:6394-6404.

Beam KG, Adams BA, Niidome T, Numa S, Tanabe T (1992) Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel. *Nature* 360:169-171.

- Beart PM, McDonald D (1980) Neurochemical studies of the mesolimbic dopaminergic pathway: somatodendritic mechanisms and GABAergic neurones in the rat ventral tegmentum. *J Neurochem* 34:1622-1629.
- Beckstead MJ, Grandy DK, Wickman K, Williams JT (2004) Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron* 42:939-946.
- Bennett MR (1999) The early history of the synapse: from Plato to Sherrington. *Brain Res Bull* 50:95-118.
- Berger B, Tassin JP, Blanc G, Moyne MA, Thierry AM (1974) Histochemical confirmation for dopaminergic innervation of the rat cerebral cortex after destruction of the noradrenergic ascending pathways. *Brain Res* 81:332-337.
- Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 9:293-298.
- 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* 70:1532-1540.

- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15:7821-7836.
- Berry MD, Juorio AV, Paterson IA (1994) The functional role of monoamine oxidases A and B in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 42:375-391.
- Bett GC, Morales MJ, Strauss HC, Rasmusson RL (2006) KChIP2b modulates the affinity and use-dependent block of Kv4.3 by nifedipine. *Biochem Biophys Res Commun* 340:1167-1177.
- Bhagvat K, Blaschko H, Richter D (1939) Amine oxidase. *Biochem J* 33:1338-1341.
- Bichet D, Haass FA, Jan LY (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci* 4:957-967.
- Bidaut-Russell M, Devane WA, Howlett AC (1990) Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J Neurochem* 55:21-26.
- Bjorklund A, Lindvall O (1975) Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res* 83:531-537.
- Bjorklund A, Wiklund L, Descarries L (1981) Regeneration and plasticity of central serotonergic neurons: a review. *J Physiol (Paris)* 77:247-255.

Blaschko H (1939) The specific action of L-dopa decarboxylase. *J Physiol* 96:50-51.

Blaschko H (1952) Amine oxidase and amine metabolism. *Pharmacol Rev* 4:415-458.

Blaschko H (1954) Metabolism of epinephrine and norepinephrine. *Pharmacol Rev* 6:23-28.

Blaschko H, Richter D, Schlossmann H (1937) The oxidation of adrenaline and other amines. *Biochem J* 31:2187-2196.

Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC (1995) ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol* 268:F1132-1140.

Borland LM, Michael AC (2004) Voltammetric study of the control of striatal dopamine release by glutamate. *J Neurochem* 91:220-229.

Bosma MM, Allen ML, Martin TM, Tempel BL (1993) PKA-dependent regulation of mKv1.1, a mouse Shaker-like potassium channel gene, when stably expressed in CHO cells. *J Neurosci* 13:5242-5250.

Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ

hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564:203-219.

Boyson SJ, McGonigle P, Molinoff PB (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6:3177-3188.

Bradberry CW, Barrett-Larimore RL, Jatlow P, Rubino SR (2000) Impact of self-administered cocaine and cocaine cues on extracellular dopamine in mesolimbic and sensorimotor striatum in rhesus monkeys. *J Neurosci* 20:3874-3883.

Brooke RE, Atkinson L, Batten TF, Deuchars SA, Deuchars J (2004a) Association of potassium channel Kv3.4 subunits with pre- and post-synaptic structures in brainstem and spinal cord. *Neuroscience* 126:1001-1010.

Brooke RE, Moores TS, Morris NP, Parson SH, Deuchars J (2004b) Kv3 voltage-gated potassium channels regulate neurotransmitter release from mouse motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* 20:3313-3321.

Brown EE, Damsma G, Cumming P, Fibiger HC (1991) Interstitial 3-methoxytyramine reflects striatal dopamine release: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 57:701-707.

- Brown JH, Makman MH (1972) Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and of adenosine-3':5'-cyclic monophosphate formation in intact retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:539-543.
- Brunger AT (2005) Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Q Rev Biophys* 38:1-47.
- Bruns D, Jahn R (1995) Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377:62-65.
- Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ, Sattelle DB (2005) Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci* 26:361-367.
- Bull DR, Sheehan MJ (1991) Presynaptic regulation of electrically evoked dopamine overflow in nucleus accumbens: a pharmacological study using fast cyclic voltammetry in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343:260-265.
- Burgess TL, Kelly RB (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 3:243-293.
- Burgoyne RD, Morgan A (1995) Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci* 18:191-196.

Burlet S, Cespuglio R (1997) Voltammetric detection of nitric oxide (NO) in the rat brain: its variations throughout the sleep-wake cycle. *Neurosci Lett* 226:131-135.

Cajal SR (1899) *Histologia del sistema nervioso*. Moya, Madrid.

Cannon WB, Uridil JE (1921) STUDIES ON THE CONDITIONS OF ACTIVITY IN ENDOCRINE GLANDS: VIII. Some Effects on the Denervated Heart of Stimulating the Nerves of the Liver. *Am J Physiol* 58:353-364.

Canonico PL, Valdenegro CA, MacLeod RM (1983) The inhibition of phosphatidylinositol turnover: a possible postreceptor mechanism for the prolactin secretion-inhibiting effect of dopamine. *Endocrinology* 113:7-14.

Capogna M, Gahwiler BH, Thompson SM (1995) Presynaptic enhancement of inhibitory synaptic transmission by protein kinases A and C in the rat hippocampus in vitro. *J Neurosci* 15:1249-1260.

Capogna M, Gahwiler BH, Thompson SM (1996) Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with ionomycin, gadolinium, and alpha-latrotoxin in the hippocampus. *J Neurophysiol* 75:2017-2028.

Cardozo DL, Bean BP (1995) Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 74:1137-1148.

- Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11:490-493.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Carr GD, White NM (1986) Anatomical disassociation of amphetamine's rewarding and aversive effects: an intracranial microinjection study. *Psychopharmacology (Berl)* 89:340-346.
- Catterall WA (1999) Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci* 868:144-159.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005a) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57:397-409.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005b) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425.

- Chen BT, Rice ME (2001) Novel Ca²⁺ dependence and time course of somatodendritic dopamine release: substantia nigra versus striatum. *J Neurosci* 21:7841-7847.
- Chen BT, Moran KA, Avshalumov MV, Rice ME (2006a) Limited regulation of somatodendritic dopamine release by voltage-sensitive Ca channels contrasted with strong regulation of axonal dopamine release. *J Neurochem* 96:645-655.
- Chen KC (2005) Evidence on extracellular dopamine level in rat striatum: implications for the validity of quantitative microdialysis. *J Neurochem* 92:46-58.
- Chen L, Yu YC, Zhao JW, Yang XL (2004) Inwardly rectifying potassium channels in rat retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 20:956-964.
- Chen SC, Ehrhard P, Goldowitz D, Smeyne RJ (1997) Developmental expression of the GIRK family of inward rectifying potassium channels: implications for abnormalities in the weaver mutant mouse. *Brain Res* 778:251-264.
- Chen X, Talley EM, Patel N, Gomis A, McIntire WE, Dong B, Viana F, Garrison JC, Bayliss DA (2006b) Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3422-3427.
- Cheng HY, Schenk J, Huff R, Adams RN (1979) In vivo electrochemistry: behavior of micro electrodes in brain tissue. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 100:23-31.

- Cheng L, Pacey GE, Cox JA (2001) Carbon electrodes modified with ruthenium metallodendrimer multilayers for the mediated oxidation of methionine and insulin at physiological pH. *Anal Chem* 73:5607-5610.
- Chergui K, Suaud-Chagny MF, Gonon F (1994) Nonlinear relationship between impulse flow, dopamine release and dopamine elimination in the rat brain in vivo. *Neuroscience* 62:641-645.
- Chio CL, Lajiness ME, Huff RM (1994a) Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol* 45:51-60.
- Chio CL, Drong RF, Riley DT, Gill GS, Slightom JL, Huff RM (1994b) D4 dopamine receptor-mediated signaling events determined in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269:11813-11819.
- 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* 15:1714-1723.
- Ciolkowski E, Cooper B, Jankowski J, J. J, Wightman M (1992) Direct Observation of Epinephrine and Norepinephrine Cosecretion from Individual Adrenal Medullary Chromaffin Cells. *J Am Chem Soc* 114:2515-2821.

- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY, Van Tol HH (1991) Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 207:277-286.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:233-285.
- 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* 87:1046-1056.
- Cragg S, Rice ME, Greenfield SA (1997) Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurophysiol* 77:863-873.
- Cragg SJ (2003) Variable dopamine release probability and short-term plasticity between functional domains of the primate striatum. *J Neurosci* 23:4378-4385.
- Cragg SJ, Greenfield SA (1997) Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci* 17:5738-5746.
- Cragg SJ, Rice ME (2004) DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci* 27:270-277.

- 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* 85:1761-1771.
- Crespi F, Campagnola M, Neudeck A, McMillan K, Rossetti Z, Pastorino A, Garbin U, Fratta-Pasini A, Reggiani A, Gaviraghi G, Cominacini L (2001) Can voltammetry measure nitrogen monoxide (NO) and/or nitrites? *J Neurosci Methods* 109:59-70.
- Crow TJ (1980) Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry* 137:383-386.
- Dahlström A, Fuxe K (1964a) A Method for the Demonstration of Monoamine-Containing Nerve Fibres in the Central Nervous System. *Acta Physiol Scand* 60:293-294.
- Dahlström A, Fuxe K (1964b) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand* 62:SUPPL 232:231-255.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *Embo J* 8:4025-4034.
- Dascal N (2001) Ion-channel regulation by G proteins. *Trends Endocrinol Metab* 12:391-398.

- Davidson C, Ellinwood EH, Lee TH (2000) Altered sensitivity of dopamine autoreceptors in rat accumbens 1 and 7 days after intermittent or continuous cocaine withdrawal. *Brain Res Bull* 51:89-93.
- Davila V, Yan Z, Craciun LC, Logothetis D, Sulzer D (2003) D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci* 23:5693-5697.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148:1474-1486.
- Dayton M, Ewing A, Wightman M (1980) Response of Microvoltammetric Electrodes to Homogeneous Catalytic and Slow Heterogeneous Charge-Transfer Reactions. *Anal Chem* 52:2392-2396.
- de Lange EC, de Boer AG, Breimer DD (2000) Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv Drug Deliv Rev* 45:125-148.
- De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A (2005) How do G proteins directly control neuronal Ca²⁺ channel function? *Trends Pharmacol Sci* 26:427-436.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S (1995) Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 273:734-743.

- Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD, Caron MG (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347:72-76.
- Decavel C, Geffard M, Calas A (1987a) Comparative study of dopamine- and noradrenaline-immunoreactive terminals in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 77:149-154.
- Decavel C, Lescaudron L, Mons N, Calas A (1987b) First visualization of dopaminergic neurons with a monoclonal antibody to dopamine: a light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 35:1245-1251.
- Deist M, Repp H, Dreyer F (1992) Sulfonylurea-sensitive K⁺ channels and their probable role for the membrane potential of mouse motor nerve endings. *Pflugers Arch* 421:292-294.
- del Carmen Godino M, Torres M, Sanchez-Prieto J (2005) The modulation of Ca²⁺ and K⁺ channels but not changes in cAMP signaling contribute to the inhibition of glutamate release by cannabinoid receptors in cerebrocortical nerve terminals. *Neuropharmacology* 48:547-557.
- Delgado A, Sierra A, Querejeta E, Valdiosera RF, Aceves J (2000) Inhibitory control of the GABAergic transmission in the rat neostriatum by D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 95:1043-1048.

- Delgado JM, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM (1972) Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 198:9-21.
- Delle Donne KT, Sesack SR, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of neurotensin and the dopamine D2 receptor in the rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 371:552-566.
- Delle Donne KT, Sesack SR, Pickel VM (1997) Ultrastructural immunocytochemical localization of the dopamine D2 receptor within GABAergic neurons of the rat striatum. *Brain Res* 746:239-255.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.
- Demchyshyn LL, Sugamori KS, Lee FJ, Hamadanizadeh SA, Niznik HB (1995) The dopamine D1D receptor. Cloning and characterization of three pharmacologically distinct D1-like receptors from *Gallus domesticus*. *J Biol Chem* 270:4005-4012.
- 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, Beaudet A, Watkins KC (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100:563-588.
- Descarries L, Bosler O, Berthelet F, Des Rosiers MH (1980) Dopaminergic nerve endings visualised by high-resolution autoradiography in adult rat neostriatum. *Nature* 284:620-622.
- 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* 375:167-186.
- Descarries L, Audet MA, Doucet G, Garcia S, Oleskevich S, Seguela P, Soghomonian JJ, Watkins KC (1990) Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationships. *Ann N Y Acad Sci* 600:81-92.
- Devine DP, Leone P, Pocock D, Wise RA (1993) Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1236-1246.
- Diaz J, Levesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, Sokoloff P (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65:731-745.

- Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz JC, Sokoloff P (2000) Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 20:8677-8684.
- Diochot S, Drici MD, Moinier D, Fink M, Lazdunski M (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* 126:251-263.
- Dittman JS, Regehr WG (1996) Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 16:1623-1633.
- Dobrev D, Andreas K (1997) Modulation of potassium-evoked [3H]dopamine release from rat striatal slices by voltage-activated calcium channel ligands: effects of omega-conotoxin-MVIIC. *Neurochem Res* 22:1085-1093.
- Dobrev D, Ravens U (2003) Therapeutically relevant concentrations of neomycin selectively inhibit P-type Ca²⁺ channels in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 461:105-111.
- Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.

- Dodson PD, Forsythe ID (2004) Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci* 27:210-217.
- Dodson PD, Billups B, Rusznak Z, Szucs G, Barker MC, Forsythe ID (2003) Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *J Physiol* 550:27-33.
- Dong Y, Green T, Saal D, Marie H, Neve R, Nestler EJ, Malenka RC (2006) CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat Neurosci* 9:475-477.
- Drouva SV, Rerat E, Bihoreau C, Laplante E, Rasolonjanahary R, Clauser H, Kordon C (1988) Dihydropyridine-sensitive calcium channel activity related to prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone release from anterior pituitary cells in culture: interactions with somatostatin, dopamine, and estrogens. *Endocrinology* 123:2762-2773.
- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89-98.
- Edelman AM, Raese JD, Lazar MA, Barchas JD (1981) Tyrosine hydroxylase: studies on the phosphorylation of a purified preparation of the brain enzyme by the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 216:647-653.

- El Ayadi A, Afailal I, Errami M (2001) Effects of voltage-sensitive calcium channel blockers on extracellular dopamine levels in rat striatum. *Metab Brain Dis* 16:121-131.
- Elverfors A, Nissbrandt H (1991) Reserpine-insensitive dopamine release in the substantia nigra? *Brain Res* 557:5-12.
- 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* 26:359-369.
- Enjalbert A, Sladeczek F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, Garcia-Sainz A, Jard S, Lombard C, Kordon C, et al. (1986) Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion. *J Biol Chem* 261:4071-4075.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Everill B, Rizzo MA, Kocsis JD (1998) Morphologically identified cutaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying proportions. *J Neurophysiol* 79:1814-1824.

Falk T, Zhang S, Erbe EL, Sherman SJ (2006) Neurochemical and electrophysiological characteristics of rat striatal neurons in primary culture. *J Comp Neurol* 494:275-289.

Falkenburger BH, Barstow KL, Mintz IM (2001) Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293:2465-2470.

Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-580.

Farnebo LO, Hamberger B (1971) Drug-induced changes in the release of 3 H-monoamines from field stimulated rat brain slices. *Acta Physiol Scand Suppl* 371:35-44.

Fawaz C, Martel P, Trudeau LE (article en préparation) PRESYNAPTIC ACTION OF NEUROTENSIN ON DOPAMINE RELEASE THROUGH D2 RECEPTOR INHIBITION.

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF (1997) Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.

- Ferroni S, Planells-Cases R, Ahmed CM, Montal M (1992) Expression of a genomic clone encoding a brain potassium channel in mammalian cells using lipofection. *Eur Biophys J* 21:185-191.
- Fili O, Michaelievski I, Bledi Y, Chikvashvili D, Singer-Lahat D, Boshwitz H, Linial M, Lotan I (2001) Direct interaction of a brain voltage-gated K⁺ channel with syntaxin 1A: functional impact on channel gating. *J Neurosci* 21:1964-1974.
- Fillenz M (2005) In vivo neurochemical monitoring and the study of behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 29:949-962.
- Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *Embo J* 17:3297-3308.
- Fishburn CS, Belleli D, David C, Carmon S, Fuchs S (1993) A novel short isoform of the D3 dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop. *J Biol Chem* 268:5872-5878.
- Fortin GD, Desrosiers CC, Yamaguchi N, Trudeau LE (2006) Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *J Neurochem* 96:1740-1749.

- Freeman AS, Bunney BS (1987) Activity of A9 and A10 dopaminergic neurons in unrestrained rats: further characterization and effects of apomorphine and cholecystokinin. *Brain Res* 405:46-55.
- Freneau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3772-3776.
- Freund TF, Powell JF, Smith AD (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13:1189-1215.
- Fritsch G, Hitzig E (1960) On the electrical excitability of the cerebrum. von Bonin G (ed) *The cerebral cortex* Thomas, Springfield, IL:73-96.
- Fuxe K, Agnati LF (1991) *Volume transmission in the brain : novel mechanisms for neural transmission*. New York: Raven Press.
- Gainetdinov RR, Grekhova TV, Sotnikova TD, Rayevsky KS (1994) Dopamine D2 and D3 receptor preferring antagonists differentially affect striatal dopamine release and metabolism in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 261:327-331.

- Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268:18866-18874.
- Garris PA, Wightman RM (1994) Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci* 14:442-450.
- Garris PA, Ciolkowski EL, Pastore P, Wightman RM (1994) Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 14:6084-6093.
- Geffard M, Buijs RM, Seguela P, Pool CW, Le Moal M (1984) First demonstration of highly specific and sensitive antibodies against dopamine. *Brain Res* 294:161-165.
- Geffen LB, Jessell TM, Cuello AC, Iversen LL (1976) Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260:258-260.
- Geldwert D, Norris JM, Feldman IG, Schulman JJ, Joyce MP, Rayport S (2006) Dopamine presynaptically and heterogeneously modulates nucleus accumbens medium-spiny neuron GABA synapses in vitro. *BMC Neurosci* 7:53.

- Gereau RWt, Conn PJ (1995) Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 15:6879-6889.
- Gerhardt G, Adams R (1982) Determination of diffusion coefficients by flow injection analysis. *Analyt Chem* 54:2618-2620.
- 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* 54:388-396.
- Giros B, Martres MP, Pilon C, Sokoloff P, Schwartz JC (1991) Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 176:1584-1592.
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342:923-926.
- Glickstein M (2006) Golgi and Cajal: The neuron doctrine and the 100th anniversary of the 1906 Nobel Prize. *Curr Biol* 16:R147-151.

- Goldstein SA, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:527-540.
- Golgi C (1885) Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervosa. *Revista sperimentale di Freniatria*. . Reprinted in: Golgi, C *Opera Omnia* Milano, Hoepli: 1903.
- Gonon F (1997) Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J Neurosci* 17:5972-5978.
- Grace AA, Bunney BS (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4:2877-2890.
- Grace AA, Bunney BS (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4:2866-2876.
- Grace AA, Bunney BS (1985) Low doses of apomorphine elicit two opposing influences on dopamine cell electrophysiology. *Brain Res* 333:285-298.
- Greenspan FS, Gardner DG (2004) *Basic & clinical endocrinology*, 7th Edition. New York ; Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill.

Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45:1227-1234.

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* 77:6926-6929.

Groves PM, Wilson CJ, Young SJ, Rebec GV (1975) Self-inhibition by dopaminergic neurons. *Science* 190:522-528.

Grupe A, Schroter KH, Ruppertsberg JP, Stocker M, Drewes T, Beckh S, Pongs O (1990) Cloning and expression of a human voltage-gated potassium channel. A novel member of the RCK potassium channel family. *Embo J* 9:1749-1756.

Guatteo E, Bengtson CP, Bernardi G, Mercuri NB (2004) Voltage-gated calcium channels mediate intracellular calcium increase in weaver dopaminergic neurons during stimulation of D2 and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 92:3368-3374.

Gulledge AT, Kampa BM, Stuart GJ (2005) Synaptic integration in dendritic trees. *J Neurobiol* 64:75-90.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508.

Guyton AC, Hall JE (2000) *Textbook of medical physiology*, 10th Edition. Philadelphia ; Toronto: W.B. Saunders.

Hagelberg N, Jaaskelainen SK, Martikainen IK, Mansikka H, Forssell H, Scheinin H, Hietala J, Pertovaara A (2004) Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. *Eur J Pharmacol* 500:187-192.

Hampson RE, Evans GJ, Mu J, Zhuang SY, King VC, Childers SR, Deadwyler SA (1995) Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci* 56:2081-2088.

Hancock PJ, Stamford JA (1999) Stereospecific effects of ketamine on dopamine efflux and uptake in the rat nucleus accumbens. *Br J Anaesth* 82:603-608.

Hanson DC, Nguyen A, Mather RJ, Rauer H, Koch K, Burgess LE, Rizzi JP, Donovan CB, Bruns MJ, Canniff PC, Cunningham AC, Verdries KA, Mena E, Kath JC, Gutman GA, Cahalan MD, Grissmer S, Chandy KG (1999) UK-78,282, a novel piperidine

compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation. *Br J Pharmacol* 126:1707-1716.

Hanson PI, Heuser JE, Jahn R (1997) Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol* 7:310-315.

Harlow ML, Ress D, Stoschek A, Marshall RM, McMahan UJ (2001) The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* 409:479-484.

Harrison TR, Braunwald E (2001) *Harrison's principles of internal medicine*, 15th Edition. New York ; Montreal: McGraw-Hill.

Harvey AL (2001) Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* 39:15-26.

Harvey J, Wedley S, Findlay JD, Sidell MR, Pullar IA (1996) omega-Agatoxin IVA identifies a single calcium channel subtype which contributes to the potassium-induced release of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, dopamine, gamma-aminobutyric acid and glutamate from rat brain slices. *Neuropharmacology* 35:385-392.

Haycock JW, Haycock DA (1991) Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem* 266:5650-5657.

Hayes G, Biden TJ, Selbie LA, Shine J (1992) Structural subtypes of the dopamine D2 receptor are functionally distinct: expression of the cloned D2A and D2B subtypes in a heterologous cell line. *Mol Endocrinol* 6:920-926.

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.

Heien ML, Johnson MA, Wightman RM (2004) Resolving neurotransmitters detected by fast-scan cyclic voltammetry. *Anal Chem* 76:5697-5704.

Henry DJ, Chavkin C (1995) Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 186:91-94.

Henry P, Lorrain D (1990) *Le livre des morts égyptien*. In. Charenton: Mantra.

Herdon H, Nahorski SR (1989) Investigations of the roles of dihydropyridine and omega-conotoxin-sensitive calcium channels in mediating depolarisation-evoked endogenous dopamine release from striatal slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340:36-40.

- 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* 348:309-320.
- Herkenham M (1987) Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications. *Neuroscience* 23:1-38.
- Herlitze S, Zhong H, Scheuer T, Catterall WA (2001) Allosteric modulation of Ca²⁺ channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C, and Ca(v)beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4699-4704.
- Hersch SM, Yi H, Heilman CJ, Edwards RH, Levey AI (1997) Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J Comp Neurol* 388:211-227.
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* 15:5222-5237.
- Hibino H, Fujita A, Iwai K, Yamada M, Kurachi Y (2004) Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J Biol Chem* 279:44065-44073.

- Hida T, Hasegawa Y, Arai R (1999) Histochemical study of dopamine-degrading monoamine oxidase activity in dopaminergic neurons of rat brain. *Brain Res* 842:491-495.
- Hildebrandt JD (1997) Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol* 54:325-339.
- Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*, 3rd Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Hiroi N, Martin AB, Grande C, Alberti I, Rivera A, Moratalla R (2002) Molecular dissection of dopamine receptor signaling. *J Chem Neuroanat* 23:237-242.
- Hirota K, Kudo M, Kudo T, Matsuki A, Lambert DG (2000) Inhibitory effects of intravenous anaesthetic agents on K⁺-evoked norepinephrine and dopamine release from rat striatal slices: possible involvement of P/Q-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Br J Anaesth* 85:874-880.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-348.

Hochstetler S, Wightman M (1998) Detection of Secretion by Electrochemical Methods.

Previously published in Biophysics Textbook Online (BTOL) Site :

(<http://www.biophysics.org/education/wightmanpdf>).

Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.

Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG, Lenard L (1983) Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology (Berl)* 81:158-163.

Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17:427-442.

Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D (1997) K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387:869-875.

Hökfelt T, Johansson O, Goldstein M (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science* 225:1326-1334.

Hökfelt T, Johansson O, Fuxe K, Goldstein M, Park D (1976) Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon. *Med Biol* 54:427-453.

- Holtz P (1950) [Sympathomimetic activity of brain extracts.]. *Acta Physiol Scand* 20:354-362.
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29:307-313.
- Hows ME, Lacroix L, Heidbreder C, Organ AJ, Shah AJ (2004) High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological samples. *J Neurosci Methods* 138:123-132.
- Hu HJ, Glauner KS, Gereau RWt (2003) ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. I. Modulation of A-type K⁺ currents. *J Neurophysiol* 90:1671-1679.
- Hu XT, Wang RY (1988) Comparison of effects of D-1 and D-2 dopamine receptor agonists on neurons in the rat caudate putamen: an electrophysiological study. *J Neurosci* 8:4340-4348.
- Hu XT, Dong Y, Zhang XF, White FJ (2005) Dopamine D2 receptor-activated Ca²⁺ signaling modulates voltage-sensitive sodium currents in rat nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol* 93:1406-1417.

- Huang Q, Zhou D, Chase K, Gusella JF, Aronin N, DiFiglia M (1992) Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11988-11992.
- Inanobe A, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishige KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (1999) Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* 19:1006-1017.
- Ishikawa T, Nakamura Y, Saitoh N, Li WB, Iwasaki S, Takahashi T (2003) Distinct roles of Kv1 and Kv3 potassium channels at the calyx of Held presynaptic terminal. *J Neurosci* 23:10445-10453.
- Ivan G, Szigeti-Csucs N, Olah M, Nagy GM, Goth MI (2005) Treatment of pituitary tumors: dopamine agonists. *Endocrine* 28:101-110.
- Ivanina T, Perets T, Thornhill WB, Levin G, Dascal N, Lotan I (1994) Phosphorylation by protein kinase A of RCK1 K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 33:8786-8792.
- Jackson BP, Wightman RM (1995) Dynamics of 5-hydroxytryptamine released from dopamine neurons in the caudate putamen of the rat. *Brain Res* 674:163-166.

- 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* 18:3548-3553.
- Jahn R (2004) Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci* 1014:170-178.
- Jarvis SE, Zamponi GW (2001) Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels. *J Neurosci* 21:2939-2948.
- Jarvis SE, Zamponi GW (2005) Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium* 37:483-488.
- Jarvis SE, Barr W, Feng ZP, Hamid J, Zamponi GW (2002) Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* 277:44399-44407.
- Ji J, Tsuk S, Salapatek AM, Huang X, Chikvashvili D, Pasyk EA, Kang Y, Sheu L, Tsushima R, Diamant N, Trimble WS, Lotan I, Gaisano HY (2002) The 25-kDa synaptosome-associated protein (SNAP-25) binds and inhibits delayed rectifier potassium channels in secretory cells. *J Biol Chem* 277:20195-20204.

- 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* 23:223-242.
- Jin LQ, Wang HY, Friedman E (2001) Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple G α proteins in different brain regions. *J Neurochem* 78:981-990.
- Jing J, Chikvashvili D, Singer-Lahat D, Thornhill WB, Reuveny E, Lotan I (1999) Fast inactivation of a brain K⁺ channel composed of Kv1.1 and Kvbeta1.1 subunits modulated by G protein beta gamma subunits. *Embo J* 18:1245-1256.
- Joh TH, Park DH, Reis DJ (1978) Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: mechanism of enzyme activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4744-4748.
- John CE, Budygin EA, Mateo Y, Jones SR (2006) Neurochemical characterization of the release and uptake of dopamine in ventral tegmental area and serotonin in substantia nigra of the mouse. *J Neurochem* 96:267-282.
- Johnson RG, Jr. (1987) Proton pumps and chemiosmotic coupling as a generalized mechanism for neurotransmitter and hormone transport. *Ann N Y Acad Sci* 493:162-177.

Jomphe C, Tiberi M, Trudeau LE (2006) Expression of D2 receptor isoforms in cultured neurons reveals equipotent autoreceptor function. *Neuropharmacology* 50:595-605.

Joseph JD, Wang YM, Miles PR, Budygin EA, Picetti R, Gainetdinov RR, Caron MG, Wightman RM (2002) Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience* 112:39-49.

Justice JJB, Nicolaysen LC, Michael AC (1988) Modeling the dopaminergic nerve terminal. *Journal of Neuroscience Methods* 22:239-252.

Kalivas PW, Duffy P (1991) A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *J Neurochem* 56:961-967.

Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16:223-244.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of neural science*, 4th Edition. New York ; Montréal: McGraw-Hill Health Professions Division.

Kaplan GP, Hartman BK, Creveling CR (1979) Immunohistochemical demonstration of catechol-o-methyltransferase in mammalian brain. *Brain Res* 167:241-250.

- Kaplan HI, Sadock VA (2003) Kaplan & Sadock's synopsis of psychiatry : behavioral sciences/clinical psychiatry, 9th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kapur A, Yeckel MF, Gray R, Johnston D (1998) L-Type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP. *J Neurophysiol* 79:2181-2190.
- Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Panula P (1995) Catechol-O-methyltransferase (COMT) in rat brain: immunoelectron microscopic study with an antiserum against rat recombinant COMT protein. *Neurosci Lett* 187:57-60.
- Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Julkunen I, Panula P (1994) Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 42:1079-1090.
- Karschin C, Dissmann E, Stuhmer W, Karschin A (1996) IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* 16:3559-3570.
- Karyakin AA, Karyakina EE, Gorton L (2000) Amperometric biosensor for glutamate using prussian blue-based "artificial peroxidase" as a transducer for hydrogen peroxide. *Anal Chem* 72:1720-1723.

- Kato T, Otsu Y, Furune Y, Yamamoto T (1992) Different effects of L-, N- and T-type calcium channel blockers on striatal dopamine release measured by microdialysis in freely moving rats. *Neurochem Int* 21:99-107.
- Kebabian JW, Greengard P (1971) Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science* 174:1346-1349.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Kennedy RT, Jones SR, Wightman RM (1992) Dynamic observation of dopamine autoreceptor effects in rat striatal slices. *J Neurochem* 59:449-455.
- Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS (1998) Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7731-7736.
- Kimura K, White BH, Sidhu A (1995a) Coupling of human D-1 dopamine receptors to different guanine nucleotide binding proteins. Evidence that D-1 dopamine receptors can couple to both Gs and G(o). *J Biol Chem* 270:14672-14678.
- Kimura M, Yamanishi Y, Hanada T, Kagaya T, Kuwada M, Watanabe T, Katayama K, Nishizawa Y (1995b) Involvement of P-type calcium channels in high potassium-elicited release of neurotransmitters from rat brain slices. *Neuroscience* 66:609-615.

Kizek R, Masarik M, Kramer KJ, Potesil D, Bailey M, Howard JA, Klejdus B, Mikelova R, Adam V, Trnkova L, Jelen F (2005) An analysis of avidin, biotin and their interaction at attomole levels by voltammetric and chromatographic techniques. *Anal Bioanal Chem* 381:1167-1178.

Kolb H, Nelson R (1981) Amacrine cells of the cat retina. *Vision Res* 21:1625-1633.

Kondo C, Isomoto S, Matsumoto S, Yamada M, Horio Y, Yamashita S, Takemura-Kameda K, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996) Cloning and functional expression of a novel isoform of ROMK inwardly rectifying ATP-dependent K⁺ channel, ROMK6 (Kir1.1f). *FEBS Lett* 399:122-126.

Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654:171-191.

Kopin IJ (1985) Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* 37:333-364.

Kozell LB, Machida CA, Neve RL, Neve KA (1994) Chimeric D1/D2 dopamine receptors. Distinct determinants of selective efficacy, potency, and signal transduction. *J Biol Chem* 269:30299-30306.

- Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29:717-727.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:509-526.
- Kuhr WG, Wightman RM (1986) Real-time measurement of dopamine release in rat brain. *Brain Res* 381:168-171.
- Kuzhikandathil EV, Oxford GS (2000) Dominant-negative mutants identify a role for GIRK channels in D3 dopamine receptor-mediated regulation of spontaneous secretory activity. *J Gen Physiol* 115:697-706.
- Kuzhikandathil EV, Yu W, Oxford GS (1998) Human dopamine D3 and D2L receptors couple to inward rectifier potassium channels in mammalian cell lines. *Mol Cell Neurosci* 12:390-402.
- L'Hirondel M, Cheramy A, Godeheu G, Artaud F, Saiardi A, Borrelli E, Glowinski J (1998) Lack of autoreceptor-mediated inhibitory control of dopamine release in striatal synaptosomes of D2 receptor-deficient mice. *Brain Res* 792:253-262.

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.

Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1988) On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J Physiol* 401:437-453.

Lachowicz JE, Sibley DR (1997) Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacol Toxicol* 81:105-113.

Langer SZ (1997) 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 18:95-99.

Langston JW (1990) Predicting Parkinson's disease. *Neurology* 40:suppl 70-74; discussion 75-76.

Le Crom S, Sugamori KS, Sidhu A, Niznik HB, Vernier P (2004) Delineation of the conserved functional properties of D1A, D1B and D1C dopamine receptor subtypes in vertebrates. *Biol Cell* 96:383-394.

Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2

mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355:418-426.

Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R, Bloch B (1990) Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:230-234.

Lee TH, Balu R, Davidson C, Ellinwood EH (2001) Differential time-course profiles of dopamine release and uptake changes induced by three dopamine uptake inhibitors. *Synapse* 41:301-310.

Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18:8751-8757.

Lesage F, Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F793-801.

Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275:28398-28405.

Lesage F, Lauritzen I, Duprat F, Reyes R, Fink M, Heurteaux C, Lazdunski M (1997) The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K⁺ channel. *FEBS Lett* 402:28-32.

Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Fosset M, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M (1995) Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 270:28660-28667.

Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA, Wightman RM (1990) Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *J Biol Chem* 265:14736-14737.

Leung YM, Kang Y, Gao X, Xia F, Xie H, Sheu L, Tsuk S, Lotan I, Tsushima RG, Gaisano HY (2003) Syntaxin 1A binds to the cytoplasmic C terminus of Kv2.1 to regulate channel gating and trafficking. *J Biol Chem* 278:17532-17538.

Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[³H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8155-8159.

- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ, et al. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8861-8865.
- Levin G, Keren T, Peretz T, Chikvashvili D, Thornhill WB, Lotan I (1995) Regulation of RCK1 currents with a cAMP analog via enhanced protein synthesis and direct channel phosphorylation. *J Biol Chem* 270:14611-14618.
- 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 Y, Um SY, McDonald TV (2006) Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *Neuroscientist* 12:199-210.
- Lim JG, Lee HY, Yun JE, Kim SP, Park JW, Suh SI, Jang BC, Cho CH, Bae JH, Kim SS, Han J, Park MJ, Song DK (2004) Taurine block of cloned ATP-sensitive K⁺ channels with different sulfonylurea receptor subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Pharmacol* 68:901-910.
- Liu L, Shen RY, Kapatos G, Chiodo LA (1994) Dopamine neuron membrane physiology: characterization of the transient outward current (I_A) and demonstration of a common signal transduction pathway for I_A and I_K. *Synapse* 17:230-240.

- Ljungdahl A, Hokfelt T, Halasz N, Johansson O, Goldstein M (1977) Olfactory bulb dopamine neurons - the A15 catecholamine cell group. *Acta Physiol Scand Suppl* 452:31-34.
- Lledo PM, Homburger V, Bockaert J, Vincent JD (1992) Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron* 8:455-463.
- Loewi O (1921) Uber humorale Ubertragbarkeit der Herznervenwirkung. I *Pflugers Archiv fur die Gesamte Physiologie Menschen und Tiere* 189:239-242.
- Loffler M, Bubl B, Huethe F, Hubbe U, McIntosh JM, Jackisch R, Feuerstein TJ (2006) Dopamine release in human neocortical slices: characterization of inhibitory autoreceptors and of nicotinic acetylcholine receptor-evoked release. *Brain Res Bull* 68:361-373.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325:321-326.
- Lu Z (2004) Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu Rev Physiol* 66:103-129.

- Maghasi AT, Schlueter KT, Halsall HB, Heineman WR, Rodriguez Rilo HL (2003) Development and characterization of simulant pancreatic islets. *Anal Biochem* 314:38-45.
- Malgaroli A, Vallar L, Elahi FR, Pozzan T, Spada A, Meldolesi J (1987) Dopamine inhibits cytosolic Ca^{2+} increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action. *J Biol Chem* 262:13920-13927.
- Marsden CA, Joseph MH, Kruk ZL, Maidment NT, O'Neill RD, Schenk JO, Stamford JA (1988) In vivo voltammetry--present electrodes and methods. *Neuroscience* 25:389-400.
- Marshall JF, O'Dell SJ, Navarrete R, Rosenstein AJ (1990) Dopamine high-affinity transport site topography in rat brain: major differences between dorsal and ventral striatum. *Neuroscience* 37:11-21.
- May LJ, Wightman RM (1989) Effects of D-2 antagonists on frequency-dependent stimulated dopamine overflow in nucleus accumbens and caudate-putamen. *J Neurochem* 53:898-906.
- McAllister G, Knowles MR, Ward-Booth SM, Sinclair HA, Patel S, Marwood R, Emms F, Patel S, Smith A, Seabrook GR, et al. (1995) Functional coupling of human D2, D3, and D4 dopamine receptors in HEK293 cells. *J Recept Signal Transduct Res* 15:267-281.

McRory JE, Hamid J, Doering CJ, Garcia E, Parker R, Hamming K, Chen L, Hildebrand M, Beedle AM, Feldcamp L, Zamponi GW, Snutch TP (2004) The CACNA1F Gene Encodes an L-Type Calcium Channel with Unique Biophysical Properties and Tissue Distribution. *J Neurosci* 24:1707-1718.

Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Jr., Civelli O (1989) Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7625-7628.

Meador-Woodruff JH, Mansour A, Grandy DK, Damask SP, Civelli O, Watson SJ, Jr. (1992) Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 145:209-212.

Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S, Rahamimoff R (1999) Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev* 79:1019-1088.

Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989) Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251:238-246.

Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 79:323-327.

- Michaevlevski I, Chikvashvili D, Tsuk S, Fili O, Lohse MJ, Singer-Lahat D, Lotan I (2002) Modulation of a brain voltage-gated K⁺ channel by syntaxin 1A requires the physical interaction of Gbetagamma with the channel. *J Biol Chem* 277:34909-34917.
- Michna M, Knirsch M, Hoda J-C, Muenkner S, Langer P, Platzer J, Striessnig J, Engel J (2003) Cav1.3 (alpha1D) Ca²⁺ currents in neonatal outer hair cells of mice. *J Physiol (Lond)* 553:747-758.
- Millar J, Stamford JA, Kruk ZL, Wightman RM (1985) Electrochemical, pharmacological and electrophysiological evidence of rapid dopamine release and removal in the rat caudate nucleus following electrical stimulation of the median forebrain bundle. *Eur J Pharmacol* 109:341-348.
- Miller RJ (1990) Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release. *Faseb J* 4:3291-3299.
- Miller RJ (1998) Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:201-227.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 355:827-829.

- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Momiyama T (2002) [Dopamine receptors and calcium channels regulating striatal inhibitory synaptic transmission]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120:61P-63P.
- Momiyama T, Koga E (2001) Dopamine D(2)-like receptors selectively block N-type Ca(2+) channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 533:479-492.
- Monsma FJ, Jr., McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-929.
- Montmayeur JP, Bausero P, Amlaiky N, Maroteaux L, Hen R, Borrelli E (1991) Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS Lett* 278:239-243.
- Moreno H, Kentros C, Bueno E, Weiser M, Hernandez A, Vega-Saenz de Miera E, Ponce A, Thornhill W, Rudy B (1995) Thalamocortical projections have a K⁺ channel that is phosphorylated and modulated by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 15:5486-5501.

- Morgan A, Burgoyne RD, Barclay JW, Craig TJ, Prescott GR, Ciuffo LF, Evans GJ, Graham ME (2005) Regulation of exocytosis by protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 33:1341-1344.
- Mrini A, Soucy JP, Lafaille F, Lemoine P, Descarries L (1995) Quantification of the serotonin hyperinnervation in adult rat neostriatum after neonatal 6-hydroxydopamine lesion of nigral dopamine neurons. *Brain Res* 669:303-308.
- Mu J, Zhuang SY, Hampson RE, Deadwyler SA (2000) Protein kinase-dependent phosphorylation and cannabinoid receptor modulation of potassium A current (I_A) in cultured rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch* 439:541-546.
- Murer G, Adelbrecht C, Lauritzen I, Lesage F, Lazdunski M, Agid Y, Raisman-Vozari R (1997) An immunocytochemical study on the distribution of two G-protein-gated inward rectifier potassium channels (GIRK2 and GIRK4) in the adult rat brain. *Neuroscience* 80:345-357.
- Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, Binz T, Rettig J, Neher E, Sorensen JB (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41:417-429.
- Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525 Pt 2:285-298.

- Neusch C, Weishaupt JH, Bahr M (2003) Kir channels in the CNS: emerging new roles and implications for neurological diseases. *Cell Tissue Res* 311:131-138.
- Neusch C, Papadopoulos N, Muller M, Maletzki I, Winter SM, Hirrlinger J, Handschuh M, Bahr M, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsmann S (2006) Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K⁺ regulation. *J Neurophysiol* 95:1843-1852.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24:165-205.
- Neve KA, Henningsen RA, Bunzow JR, Civelli O (1989) Functional characterization of a rat dopamine D-2 receptor cDNA expressed in a mammalian cell line. *Mol Pharmacol* 36:446-451.
- Neve KA, Cumbay MG, Thompson KR, Yang R, Buck DC, Watts VJ, DuRand CJ, Teeter MM (2001) Modeling and mutational analysis of a putative sodium-binding pocket on the dopamine D2 receptor. *Mol Pharmacol* 60:373-381.
- Nguyen A, Kath JC, Hanson DC, Biggers MS, Canniff PC, Donovan CB, Mather RJ, Bruns MJ, Rauer H, Aiyar J, Lepple-Wienhues A, Gutman GA, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG (1996) Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *Mol Pharmacol* 50:1672-1679.

- Nguyen CH, Watts VJ (2005) Dexas1 blocks receptor-mediated heterologous sensitization of adenylyl cyclase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 332:913-920.
- Nicholson C (1995) Interaction between diffusion and Michaelis-Menten uptake of dopamine after iontophoresis in striatum. *Biophys J* 68:1699-1715.
- Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM (1996) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 16:436-447.
- Noga BR, Pinzon A, Mesigil RP, Hentall ID (2004) Steady-state levels of monoamines in the rat lumbar spinal cord: spatial mapping and the effect of acute spinal cord injury. *J Neurophysiol* 92:567-577.
- Nyholm D (2006) Pharmacokinetic optimisation in the treatment of Parkinson's disease : an update. *Clin Pharmacokinet* 45:109-136.
- O'Malley KL, Harmon S, Tang L, Todd RD (1992) The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* 4:137-146.
- Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165.

- Onali P, Olanas MC (1989) Involvement of adenylate cyclase inhibition in dopamine autoreceptor regulation of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 102:91-96.
- Onali P, Olanas MC, Gessa GL (1985) Characterization of dopamine receptors mediating inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatum. *Mol Pharmacol* 28:138-145.
- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL (1996) Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca²⁺ channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol* 49:707-714.
- Parent A, Lavoie B (1993) The heterogeneity of the mesostriatal dopaminergic system as revealed in normal and parkinsonian monkeys. *Adv Neurol* 60:25-33.
- Parent A, Hazrati L-N (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews* 20:91-127.
- Parkinson J (1817) *An essay on the shaking palsy*. London: Printed by Whittingham and Rowland for Sherwood : Neely and Jones.
- Pasinetti GM, Morgan DG, Johnson SA, Millar SL, Finch CE (1990) Tyrosine hydroxylase mRNA concentration in midbrain dopaminergic neurons is differentially regulated by reserpine. *J Neurochem* 55:1793-1799.

- Pennartz CM, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH (1994) The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol* 42:719-761.
- Perez MF, White FJ, Hu X-T (2006) Dopamine D2 Receptor Modulation of K⁺ Channel Activity Regulates Excitability of Nucleus Accumbens Neurons at Different Membrane Potentials. In, pp 2217-2228.
- Phillips PE, Stamford JA (2000) Differential recruitment of N-, P- and Q-type voltage-operated calcium channels in striatal dopamine release evoked by 'regular' and 'burst' firing. *Brain Res* 884:139-146.
- Pickel VM, Chan J (1999) Ultrastructural localization of the serotonin transporter in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 19:7356-7366.
- Pihel K, Hsieh S, Jorgenson JW, Wightman RM (1995) Electrochemical detection of histamine and 5-hydroxytryptamine at isolated mast cells. *Anal Chem* 67:4514-4521.
- Pihel K, Travis ER, Borges R, Wightman RM (1996) Exocytotic release from individual granules exhibits similar properties at mast and chromaffin cells. *Biophys J* 71:1633-1640.

- Pihel K, Hsieh S, Jorgenson JW, Wightman RM (1998) Quantal corelease of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells and the effects of prior incubation. *Biochemistry* 37:1046-1052.
- Pizzi M, Da Prada M, Valerio A, Memo M, Spano PF, Haefely WE (1988) Dopamine D2 receptor stimulation inhibits inositol phosphate generating system in rat striatal slices. *Brain Res* 456:235-240.
- Pongs O (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett* 452:31-35.
- Pontier SM, Lahaie N, Ginham R, St-Gelais F, Bonin H, Bell DJ, Flynn H, Trudeau LE, McIlhinney J, White JH, Bouvier M (2006) Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *Embo J* 25:2698-2709.
- Pothos EN, Przedborski S, Davila V, Schmitz Y, Sulzer D (1998) D2-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J Neurosci* 18:5575-5585.
- Povlock SL, Schenk JO (1997) A multisubstrate kinetic mechanism of dopamine transport in the nucleus accumbens and its inhibition by cocaine. *J Neurochem* 69:1093-1105.

- Pravettoni E, Bacci A, Coco S, Forbicini P, Matteoli M, Verderio C (2000) Different localizations and functions of L-type and N-type calcium channels during development of hippocampal neurons. *Dev Biol* 227:581-594.
- Prince RJ, Fernandes KG, Gregory JC, Martyn ID, Lippiello PM (1996) Modulation of nicotine-evoked [³H]dopamine release from rat striatal synaptosomes by voltage-sensitive calcium channel ligands. *Biochem Pharmacol* 52:613-618.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11:1-20.
- Purves D, Williams SM (2001) *Neuroscience*, 2nd Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Radhakrishna U, Blouin JL, Solanki JV, Dhoriani GM, Antonarakis SE (1996) An autosomal dominant triphalangeal thumb: polysyndactyly syndrome with variable expression in a large Indian family maps to 7q36. *Am J Med Genet* 66:209-215.
- Rahman MA, Kwon NH, Won MS, Choe ES, Shim YB (2005) Functionalized conducting polymer as an enzyme-immobilizing substrate: an amperometric glutamate microbiosensor for in vivo measurements. *Anal Chem* 77:4854-4860.

- Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM, Levi G (1979) Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J Pharmacol Exp Ther* 208:195-202.
- Rajan S, Wischmeyer E, Karschin C, Preisig-Muller R, Grzeschik KH, Daut J, Karschin A, Derst C (2001) THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem* 276:7302-7311.
- Ralevic V (2003) Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 472:1-21.
- Rhodes KJ, Strassle BW, Monaghan MM, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Trimmer JS (1997) Association and colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K⁺ channel complexes. *J Neurosci* 17:8246-8258.
- 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* 77:853-862.
- Rice ME, Richards CD, Nedergaard S, Hounsgaard J, Nicholson C, Greenfield SA (1994) Direct monitoring of dopamine and 5-HT release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *Exp Brain Res* 100:395-406.

- Richfield EK, Penney JB, Young AB (1989) Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 30:767-777.
- Rivett AJ, Francis A, Roth JA (1983) Localization of membrane-bound catechol-O-methyltransferase. *J Neurochem* 40:1494-1496.
- Rivot JP, Sousa A, Montagne-Clavel J, Besson JM (1999) Nitric oxide (NO) release by glutamate and NMDA in the dorsal horn of the spinal cord: an in vivo electrochemical approach in the rat. *Brain Res* 821:101-110.
- Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3:641-653.
- 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* 11:2209-2216.
- Robinson DL, Venton BJ, Heien ML, Wightman RM (2003) Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. *Clin Chem* 49:1763-1773.

- Robinson S, Smith DM, Mizumori SJ, Palmiter RD (2004) Firing properties of dopamine neurons in freely moving dopamine-deficient mice: effects of dopamine receptor activation and anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13329-13334.
- Roeper J, Lorra C, Pongs O (1997) Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K⁺ channel KV1.4 regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci* 17:3379-3391.
- Rogawski MA, Barker JL (1985) Neurotransmitter actions in the vertebrate nervous systems. New York: Plenum Press.
- Rosenmund C, Rettig J, Brose N (2003) Molecular mechanisms of active zone function. *Curr Opin Neurobiol* 13:509-519.
- Ross EM, Haga T, Howlett AC, Schwarzmeier J, Schleifer LS, Gilman AG (1978) Hormone-sensitive adenylate cyclase: resolution and reconstitution of some components necessary for regulation of the enzyme. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9:53-68.
- Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci* 22:3293-3301.

- Rudy B, McBain CJ (2001) Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* 24:517-526.
- Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O (1990) Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 345:535-537.
- Rusakov DA, Kullmann DM, Stewart MG (1999) Hippocampal synapses: do they talk to their neighbours? *Trends Neurosci* 22:382-388.
- Sacks OW (1973) *Awakenings*. London: Duckworth.
- Sanguinetti MC, Johnson JH, Hammerland LG, Kelbaugh PR, Volkmann RA, Saccomano NA, Mueller AL (1997) Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol Pharmacol* 51:491-498.
- Santiago M, Westerink BH (1991) The regulation of dopamine release from nigrostriatal neurons in conscious rats: the role of somatodendritic autoreceptors. *Eur J Pharmacol* 204:79-85.
- Sarada BV, Rao TN, Tryk DA, Fujishima A (2000) Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. *Anal Chem* 72:1632-1638.

Sato M, Blumer JB, Simon V, Lanier SM (2006) ACCESSORY PROTEINS FOR G PROTEINS: Partners in Signaling. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 46:151-187.

Scalettar BA (2006) How neurosecretory vesicles release their cargo. Neuroscientist 12:164-176.

Scanziani M, Gahwiler BH, Thompson SM (1995) Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are Ca²⁺ channels involved? Neuropharmacology 34:1549-1557.

Schinelli S, Paolillo M, Corona GL (1994) Opposing actions of D1- and D2-dopamine receptors on arachidonic acid release and cyclic AMP production in striatal neurons. J Neurochem 62:944-949.

Schmitz Y, Schmauss C, Sulzer D (2002) Altered dopamine release and uptake kinetics in mice lacking D2 receptors. J Neurosci 22:8002-8009.

Schmitz Y, Benoit-Marand M, Gonon F, Sulzer D (2003) Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. J Neurochem 87:273-289.

- Schmitz Y, Lee CJ, Schmauss C, Gonon F, Sulzer D (2001) Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *J Neurosci* 21:5916-5924.
- Scholz KP, Miller RJ (1995) Developmental changes in presynaptic calcium channels coupled to glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 15:4612-4617.
- Seabrook GR, McAllister G, Knowles MR, Myers J, Sinclair H, Patel S, Freedman SB, Kemp JA (1994a) Depression of high-threshold calcium currents by activation of human D2 (short) dopamine receptors expressed in differentiated NG108-15 cells. *Br J Pharmacol* 111:1061-1066.
- Seabrook GR, Knowles M, Brown N, Myers J, Sinclair H, Patel S, Freedman SB, McAllister G (1994b) Pharmacology of high-threshold calcium currents in GH4C1 pituitary cells and their regulation by activation of human D2 and D4 dopamine receptors. *Br J Pharmacol* 112:728-734.
- Seamans JK, Yang CR (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74:1-58.
- Seeman P (1992) Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* 7:261-284.

- Seguela P, Watkins KC, Descarries L (1988) Ultrastructural features of dopamine axon terminals in the anteromedial and the suprarhinal cortex of adult rat. *Brain Res* 442:11-22.
- Seguela P, Watkins KC, Descarries L (1989) Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J Comp Neurol* 289:129-142.
- Seguela P, Watkins KC, Geffard M, Descarries L (1990) Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience* 35:249-264.
- Serodio P, Rudy B (1998) Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol* 79:1081-1091.
- 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.
- Sheng M, Liao YJ, Jan YN, Jan LY (1993) Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo. *Nature* 365:72-75.
- Shimazaki Y, Nishiki T, Omori A, Sekiguchi M, Kamata Y, Kozaki S, Takahashi M (1996) Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible

involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release. *J Biol Chem* 271:14548-14553.

Sidhu A, Kimura K (1997) A novel regulation of expression of the alpha-subunit of the G stimulatory protein by dopamine via D1 dopamine receptors. *J Neurochem* 68:187-194.

Siegel GJ (1999) *Basic neurochemistry : molecular, cellular and medical aspects*, 6th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Simmonds SH, Strange PG (1985) Inhibition of inositol phospholipid breakdown by D2 dopamine receptors in dissociated bovine anterior pituitary cells. *Neurosci Lett* 60:267-272.

Sistiaga A, Sanchez-Prieto J (2000) Protein phosphatase 2B inhibitors mimic the action of arachidonic acid and prolong the facilitation of glutamate release by group I mGlu receptors. *Neuropharmacology* 39:1544-1553.

Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13:259-265.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.

- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409-418.
- Song DK, Ashcroft FM (2001) Glibenclamide block of cloned beta-cell, cardiac and smooth muscle K(ATP) channels. *Br J Pharmacol* 133:193-199.
- Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, Ichinohe N, Kitai ST, Surmeier DJ (1998) Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 18:3124-3137.
- Southan AP, Robertson B (1998) Patch-clamp recordings from cerebellar basket cell bodies and their presynaptic terminals reveal an asymmetric distribution of voltage-gated potassium channels. *J Neurosci* 18:948-955.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2046-2050.
- Spano PF, Govoni S, Trabucchi M (1978) Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19:155-165.

- Stamford JA, Kruk ZL, Millar J (1990) Striatal dopamine terminals release serotonin after 5-HTP pretreatment: in vivo voltammetric data. *Brain Res* 515:173-180.
- Stamford JA, Kruk ZL, Millar J (1991) Differential effects of dopamine agonists upon stimulated limbic and striatal dopamine release: in vivo voltammetric data. *Br J Pharmacol* 102:45-50.
- Stamford JA, Kruk ZL, Millar J, Wightman RM (1984) Striatal dopamine uptake in the rat: in vivo analysis by fast cyclic voltammetry. *Neurosci Lett* 51:133-138.
- Stefani A, Spadoni F, Martorana A, Lavaroni F, Martella G, Sancesario G, Bernardi G (2002) D2-mediated modulation of N-type calcium currents in rat globus pallidus neurons following dopamine denervation. *Eur J Neurosci* 15:815-825.
- Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, Van der Kooy D (1981) The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)* 77:157-174.
- Stocker M (2004) Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 5:758-770.

- Stocker M, Hirzel K, D'Hoedt D, Pedarzani P (2004) Matching molecules to function: neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels and afterhyperpolarizations. *Toxicon* 43:933-949.
- Stoof JC, Drukarch B, de Boer P, Westerink BH, Groenewegen HJ (1992) Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine. *Neuroscience* 47:755-770.
- Strader CD, Dixon RA, Cheung AH, Candelore MR, Blake AD, Sigal IS (1987) Mutations that uncouple the beta-adrenergic receptor from G_s and increase agonist affinity. *J Biol Chem* 262:16439-16443.
- Strait KA, Kuczenski R (1986) Dopamine autoreceptor regulation of the kinetic state of striatal tyrosine hydroxylase. *Mol Pharmacol* 29:561-569.
- Sudhof TC (2002) Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* 277:7629-7632.
- Sugamori KS, Demchyshyn LL, Chung M, Niznik HB (1994) D1A, D1B, and D1C dopamine receptors from *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10536-10540.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350:614-619.

- Takata Y, Shimada F, Kato H (1992) Differential effects of diazoxide, cromakalim and pinacidil on adrenergic neurotransmission and $^{86}\text{Rb}^+$ efflux in rat brain cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* 263:1293-1301.
- Tang L, Todd RD, Heller A, O'Malley KL (1994) Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 268:495-502.
- Tao L, Nicholson C (1996) Diffusion of albumins in rat cortical slices and relevance to volume transmission. *Neuroscience* 75:839-847.
- Tao Y, Zeng R, Shen B, Jia J, Wang Y (2005) Neuronal transmission stimulates the phosphorylation of Kv1.4 channel at Ser229 through protein kinase A1. *J Neurochem* 94:1512-1522.
- 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* 82:341-348.
- Thierry AM, Blanc G, Sobel A, Stinus L, Golwinski J (1973) Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* 182:499-501.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Freneau RT, Jr., Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization,

and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7491-7495.

Trantham-Davidson H, Neely LC, Lavin A, Seamans JK (2004) Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* 24:10652-10659.

Trudeau LE, Emery DG, Haydon PG (1996a) Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron* 17:789-797.

Trudeau LE, Doyle RT, Emery DG, Haydon PG (1996b) Calcium-independent activation of the secretory apparatus by ruthenium red in hippocampal neurons: a new tool to assess modulation of presynaptic function. *J Neurosci* 16:46-54.

Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A (1995) Reflections on Ca²⁺-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18:52-54.

Tso MM, Blatchford KL, Callado LF, McLaughlin DP, Stamford JA (2004) Stereoselective effects of ketamine on dopamine, serotonin and noradrenaline release and uptake in rat brain slices. *Neurochem Int* 44:1-7.

- Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78:43-50.
- Tyler EC, Lovinger DM (1995) Metabotropic glutamate receptor modulation of synaptic transmission in corticostriatal co-cultures: role of calcium influx. *Neuropharmacology* 34:939-952.
- Uchida S, Akaike N, Nabekura J (2000) Dopamine activates inward rectifier K⁺ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology* 39:191-201.
- Ungerstedt U, Pycock C (1974) Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 30:44-55.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203.
- Vallar L, Meldolesi J (1989) Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 10:74-77.
- Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O (1990) Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK-

fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca^{2+} concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem* 265:10320-10326.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:125-132.

Van Bockstaele EJ, Pickel VM (1993) Ultrastructure of serotonin-immunoreactive terminals in the core and shell of the rat nucleus accumbens: cellular substrates for interactions with catecholamine afferents. *J Comp Neurol* 334:603-617.

Van Bogaert PP, Snyders DJ (1982) Effects of 4-aminopyridine on inward rectifying and pacemaker currents of cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch* 394:230-238.

Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.

Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V (1992) Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358:149-152.

Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O (1995) Immunohistochemical localization of five members of the K_v1 channel subunits:

contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci* 7:2189-2205.

Verderio C, Coco S, Fumagalli G, Matteoli M (1995) Calcium-dependent glutamate release during neuronal development and synaptogenesis: different involvement of omega-agatoxin IVA- and omega-conotoxin GVIA-sensitive channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6449-6453.

Victor RG, Thomas GD, Marban E, O'Rourke B (1995) Presynaptic modulation of cortical synaptic activity by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6269-6273.

Vizi ES, Labos E (1991) Non-synaptic interactions at presynaptic level. *Prog Neurobiol* 37:145-163.

Vogt M (1954) The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J Physiol* 123:451-481.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Ding YS, Gatley SJ (2002) Role of dopamine in the therapeutic and reinforcing effects of methylphenidate in humans: results from imaging studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:557-566.

Wadiche JI, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP (1995) Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* 14:1019-1027.

- Walker D, De Waard M (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 21:148-154.
- Wamsley JK, Alburges ME, McQuade RD, Hunt M (1992) CNS distribution of D1 receptors: use of a new specific D1 receptor antagonist, [3H]SCH39166. *Neurochem Int* 20 Suppl:123S-128S.
- Wang H, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Tempel BL (1994) Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J Neurosci* 14:4588-4599.
- Wang HS, McKinnon D (1995) Potassium currents in rat prevertebral and paravertebral sympathetic neurones: control of firing properties. *J Physiol* 485 (Pt 2):319-335.
- Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, Sankoorikal EB (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* 20:8305-8314.
- Webb CK, McCudden CR, Willard FS, Kimple RJ, Siderovski DP, Oxford GS (2005) D2 dopamine receptor activation of potassium channels is selectively decoupled by Galpha-specific GoLoco motif peptides. *J Neurochem* 92:1408-1418.

- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:463-472.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1859-1863.
- Weiser M, Bueno E, Sekirnjak C, Martone ME, Baker H, Hillman D, Chen S, Thornhill W, Ellisman M, Rudy B (1995) The potassium channel subunit KV3.1b is localized to somatic and axonal membranes of specific populations of CNS neurons. *J Neurosci* 15:4298-4314.
- Werkman TR, Kawamura T, Yokoyama S, Higashida H, Rogawski MA (1992) Charybdotoxin, dendrotoxin and mast cell degranulating peptide block the voltage-activated K⁺ current of fibroblast cells stably transfected with NGK1 (Kv1.2) K⁺ channel complementary DNA. *Neuroscience* 50:935-946.
- Westenbroek RE, Ahljianian MK, Catterall WA (1990) Clustering of L-type Ca²⁺ channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 347:281-284.
- White FJ, Wang RY (1984) A10 dopamine neurons: role of autoreceptors in determining firing rate and sensitivity to dopamine agonists. *Life Sci* 34:1161-1170.

- Whyte KA, Greenfield SA (2002) Expression of voltage-dependent calcium channels in the embryonic rat midbrain. *Brain Res Dev Brain Res* 139:189-197.
- Wightman RM, Zimmerman JB (1990) Control of dopamine extracellular concentration in rat striatum by impulse flow and uptake. *Brain Res Brain Res Rev* 15:135-144.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr., Viveros OH (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10754-10758.
- Williams GV, Millar J (1990) Concentration-dependent actions of stimulated dopamine release on neuronal activity in rat striatum. *Neuroscience* 39:1-16.
- Willner I, Willner B, Katz E (2002) Functional biosensor systems via surface-nanoengineering of electronic elements. *J Biotechnol* 82:325-355.
- Wilson CJ, Groves PM, Fifkova E (1977) Monoaminergic synapses, including dendrodendritic synapses in the rat substantia nigra. *Exp Brain Res* 30:161-174.
- Winklhofer M, Matthias K, Seifert G, Stocker M, Sewing S, Herget T, Steinhauser C, Saaler-Reinhardt S (2003) Analysis of phosphorylation-dependent modulation of Kv1.1 potassium channels. *Neuropharmacology* 44:829-842.

- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469-492.
- Witkovsky P, Nicholson C, Rice ME, Bohmaker K, Meller E (1993) Extracellular dopamine concentration in the retina of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5667-5671.
- Woodward JJ, Rezazadeh SM, Leslie SW (1988) Differential sensitivity of synaptosomal calcium entry and endogenous dopamine release to omega-conotoxin. *Brain Res* 475:141-145.
- Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:204-212.
- Wu LG, Westenbroek RE, Borst JG, Catterall WA, Sakmann B (1999) Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* 19:726-736.
- Wu Q, Reith ME, Walker QD, Kuhn CM, Carroll FI, Garris PA (2002) Concurrent autoreceptor-mediated control of dopamine release and uptake during neurotransmission: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci* 22:6272-6281.

- Wu RL, Barish ME (1992) Two pharmacologically and kinetically distinct transient potassium currents in cultured embryonic mouse hippocampal neurons. *J Neurosci* 12:2235-2246.
- Yamada K, Teraoka T, Morita S, Hasegawa T, Nabeshima T (1993) Neuropharmacological characterization of voltage-sensitive calcium channels: possible existence of neomycin-sensitive, omega-conotoxin GVIA- and dihydropyridines-resistant calcium channels in the rat brain. *Jpn J Pharmacol* 63:423-432.
- Yavich L, Jakala P, Tanila H (2005) Noradrenaline overflow in mouse dentate gyrus following locus coeruleus and natural stimulation: real-time monitoring by in vivo voltammetry. *J Neurochem* 95:641-650.
- Yeung SY, Thompson D, Wang Z, Fedida D, Robertson B (2005) Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: significance for CNS and biophysical studies. *J Neurosci* 25:8735-8745.
- Yokoyama CT, Sheng ZH, Catterall WA (1997) Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J Neurosci* 17:6929-6938.

- Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, Welling PA (2004) Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279:6863-6873.
- 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* 65:709-730.
- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
- Zamponi GW (2003) Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci* 92:79-83.
- Zapata A, Witkin JM, Shippenberg TS (2001) Selective D3 receptor agonist effects of (+)-PD 128907 on dialysate dopamine at low doses. *Neuropharmacology* 41:351-359.
- Zhang H, Jenks BG, Ciccarelli A, Roubos EW, Scheenen WJ (2004) Dopamine D2-receptor activation differentially inhibits N- and R-type Ca²⁺ channels in *Xenopus* melanotrope cells. *Neuroendocrinology* 80:368-378.
- Zhang MY, Beyer CE (2006) Measurement of neurotransmitters from extracellular fluid in brain by in vivo microdialysis and chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 40:492-499.

Zhang X, Kim-Miller MJ, Fukuda M, Kowalchyk JA, Martin TF (2002) Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron* 34:599-611.

Zhou FM, Liang Y, Salas R, Zhang L, De Biasi M, Dani JA (2005) Corelease of dopamine and serotonin from striatal dopamine terminals. *Neuron* 46:65-74.

Zhuang X, Belluscio L, Hen R (2000) G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. *J Neurosci* 20:RC91.

Zucker RS (1996) Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17:1049-1055.