



UNIVERSITE DE LIEGE
Faculté de Médecine
GIGA – Neurosciences
Laboratoire de Neurophysiologie

UNE NOUVELLE HYPOTHÈSE SUR LE
MÉCANISME DE PACEMAKING DANS
LES NEURONES DOPAMINERGIQUES
DE LA SUBSTANCE NOIRE COMPACTE

Kevin Jehasse

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques
Promoteurs : Pr. Vincent Seutin et Dr. Dominique Engel
Année académique : 2020-2021



UNIVERSITE DE LIEGE
Faculté de Médecine
GIGA – Neurosciences
Laboratoire de Neurophysiologie

UNE NOUVELLE HYPOTHÈSE SUR LE MÉCANISME DE PACEMAKING DANS LES NEURONES DOPAMINERGIQUES DE LA SUBSTANCE NOIRE COMPACTE

Kevin Jehasse

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteurs : Pr. Vincent Seutin et Dr. Dominique Engel

Année académique : 2020-2021

RÉSUMÉ

Les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte sont intégrés dans la voie nigrostriée des ganglions de la base. Ils libèrent de la dopamine dans le striatum, ce qui permet de moduler l'activité des différents noyaux des ganglions de la base. Ces neurones sont donc impliqués dans le contrôle moteur, mais aussi dans différents comportements, comme l'exploration et la motivation par exemple. Une perturbation de la libération de la dopamine, suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques par exemple, entraîne différents troubles moteurs comme la maladie de Parkinson, ou des troubles du comportement. Cette libération de dopamine est contrôlée par l'activité électrique des neurones dopaminergiques. *In vivo*, le profil de décharge de ces neurones est contrôlé par les afférences synaptiques. Ils peuvent avoir une décharge régulière, irrégulière ou en bouffées (burst). *In vitro*, seul l'activité autonome régulière persiste. Cette activité spontanée est induite et contrôlée par des conductances intrinsèques. Cependant, le mécanisme exact de cette activité dans les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte reste flou. En effet, le blocage d'une ou plusieurs conductances cause une modification de la fréquence de décharge, sans pour autant observer une inhibition complète. Pour générer une activité spontanée dans les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, il a été démontré qu'un courant entrant de très faible amplitude était activé durant la phase de dépolarisation lente entre deux potentiels d'action (Khaliq and Bean, 2008). Étant donné que les propriétés de l'activité spontanée semblent être identiques au sein des neurones dopaminergiques, malgré que ceux-ci constituent une population

hétérogène au sein du mésencéphale, il n'est pas impossible que l'activité spontanée soit médiée par la même conductance.

Nous avons exploré plusieurs pistes pour identifier la nature de ce courant, dont la présence de conductances non-conventionnelles médiées par des courants ω . Nous avons utilisé un bloqueur de ces pores, le 1-(2,4-xylyl)guanidine (XG) afin de vérifier notre hypothèse. Nous avons observé que cette molécule est capable d'inhiber sélectivement l'activité spontanée des neurones dopaminergiques mésencéphaliques, sans affecter la décharge en bouffées, ni les canaux ioniques impliqués dans la genèse des potentiels d'action et en interagissant avec une seule cible. Nous avons également observé que l'effet du XG persiste même lorsque les principaux modulateurs de l'activité intrinsèque des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte sont bloqués, démontrant le caractère essentiel de cette conductance. Nous avons ensuite vérifié la présence de pores ω dans ces neurones et nous n'avons pas observé de preuves en faveur de leur présence. Cependant, nous avons réussi à isoler un courant bloqué par ce bloqueur. Nous avons caractérisé ce courant et nous avons observé qu'il s'active dans l'intervalle entre deux potentiels d'action et qu'il était soutenu par du Na^+ et Cl^- . Enfin, nous avons vérifié si cette conductance correspondait au transporteur de la dopamine, étant donné les propriétés de la conductance sensible au XG, en utilisant des animaux n'exprimant pas ce transporteur. L'absence du transporteur à la dopamine n'influence pas la fréquence de décharge, ni l'effet du bloqueur sur les neurones dopaminergiques.

Pour conclure, même si nous n'avons pas pu identifier la cible du XG, nous avons mis en évidence une nouvelle conductance indispensable à l'activité spontanée des neurones dopaminergiques mésencéphaliques.

ABSTRACT

Substantia Nigra pars compacta dopamine neurons are integrated in the nigrostriatal pathways of the basal ganglia. They release dopamine in the striatum to modulate the activity of the different nuclei from the basal ganglia. Thus, those neurons are involved in motor control, as well as exploration and motivation behaviors. Dopamine release disruption, due to neurodegeneration, leads to various motor impairment (Parkinson Disease) and behavioral diseases. Dopamine release is controlled by the electrical activity of dopamine neurons. The firing pattern of these neurons is controlled by synaptic activity *in vivo*. They can present a regular firing called “pacemaking”, an irregular firing or a bursting firing. Only the pacemaking activity remains *in vitro*. This regular firing is therefore sustained and controlled by intrinsic conductances. However, the exact mechanism underlying Substantia Nigra pars compacta dopamine neurons pacemaking activity remains unclear. In fact, blocking one or few conductances only affects the firing frequency but it does not fully inhibit the spontaneous activity. In order to sustain such activity, it has been showed that a small inward current is activated during the slow depolarization phase between two action potentials in ventral tegmental area dopamine neurons (Khaliq and Bean, 2008). Given the similar properties within midbrain dopamine neurons being heterogenous, it is not excluded that their pacemaking is mediated by one and same conductance.

We investigated several potential candidates, including the unconventional conductance mediated by ω pores. We used the only known blockers of such pores, 1-(2,4-xylyl)guanidine (XG), in order to verify our hypothesis. We

observed that this compound is able to selectively inhibit midbrain dopamine neurons pacemaking activity by blocking one target, without affecting either the burst activity nor the ion channels underlying action potentials. We also observed that the effect of XG still persists even when the pacemaking main modulators are being blocked. These results demonstrate that the XG-sensitive conductance is crucial to sustain the spontaneous activity in midbrain dopamine neurons. We next investigated the presence of ω pores but we did not observe evidence in favor of this hypothesis. However, we managed to isolate a XG-sensitive current occurring during the interspike interval corresponding the pacemaker current described by Khaliq and Bean. We characterized this current and found that it is sustained by Na^+ and Cl^- . Finally, we investigated whether this current was sustained by the dopamine transporter because it displays similar properties. We used transgenic mice lacking the dopamine transporter in dopamine neurons. We found that the absence of the transporter did not affect either the firing frequency nor XG effect on those neurons.

To conclude, even though we did not manage to identify the molecular target of XG, we emphasized a new conductance crucial to sustain pacemaking activity in midbrain dopamine neurons.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers mes deux promoteurs :

- Pr. Vincent Seutin qui m'a donné la chance de participer à cette aventure scientifique et humaine. Le chemin parcouru a été semé d'embûches mais finalement, on s'en est bien sorti ! Votre enthousiasme communicatif, votre écoute, vos conseils et vos encouragements à prendre des initiatives m'ont été très précieux durant le doctorat. Merci de m'avoir fait confiance.
- Dr. Dominique Engel, qui a toujours veillé à ce que je reste sur le droit chemin de la recherche scientifique. Merci pour tes précieux conseils, ta générosité et les conversations que nous avons eues dans ton bureau, qui m'ont permis de développer un esprit plus critique.

Je souhaite également remercier mes différents partenaires de patch et tout particulièrement Geoffrey Destreel, qui en plus d'avoir été un collègue, est devenu un ami. Je n'oublierai jamais notre séjour à Woods Hole, ainsi que les autres moments passés ensemble. Je remercie aussi Sofian Ringlet. Je te souhaite bon courage pour ton doctorat !

Je remercie les différents membres du Laboratoire de Neurophysiologie et en particulier Laurent Massotte (notre cher MacGyver) et Christelle Gillissen pour leur soutien logistique et surtout moral. Merci pour votre bonne humeur et vos blagues ! Je remercie également tous les membres du GIGA – Neurosciences pour les moments passés ensemble et votre soutien.

Je souhaite également remercier les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Merci au Pr. Jochen Roeper pour les différentes suggestions qui ont permis de bien faire avancer le schmilblick et à Kathleen Jacquerie qui m'a initié aux neurosciences computationnelles et pour une inoubliable SfN 2019.

Merci à tous mes amis : la Compagnie des Bras Cassés pour les journées entières consacrées au JDR ; Axon Villa dont les défaites resteront à jamais gravées dans les annales ; les loulous (presque tous) médecins pour les barbecues thématiques et les nombreux fou-rires ; the Not Right Crew for those long evenings/nights playing videogames and chatting about everything. Merci à mon ancien voisin de bureau, Renaud Vandenbosch, pour les conversations scientifiques et vidéoludiques. Je remercie également mon cher ami Christian Damblon pour ses précieux encouragements et sermons (et les nombreux boulets).

Je remercie le Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS), le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA) et la Fondation Léon Fredericq pour leur soutien financier. J'exprime également ma gratitude envers Mme Marie-José de Ridder pour le prix de l'Espoir, sa précieuse relecture de mon manuscrit et son amitié.

Je remercie chaleureusement ma famille qui m'a donné la possibilité et toutes les facilités pour réaliser ce parcours. Merci à ma belle-famille pour son soutien inconsideré. Enfin, je dédie cette thèse à Aurélie, ma compagne, et Apolline, notre petite fille, sans qui cette aventure n'aurait pas été aussi exceptionnelle.

ABRÉVIATIONS

2GBI :	2-guanidinobenzimidazole
6-OHDA :	6-hydroxydopamine
AMPA :	acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
ATV :	aire tegmentale ventrale
Ca _v :	canaux Ca ²⁺ voltage-dépendants
Ch ⁺ :	choline
CV :	coefficient de variation
CVISI :	coefficient de variation de l'intervalle entre deux potentiels d'action
DA :	dopamine(rgique)
DAT :	transporteur de la dopamine
FFA :	acide flufénamique
GABA :	acide γ-aminobutyrique
GB :	ganglions de la base
$g_{pacemaking}$:	conductance responsable du pacemaking
GPe :	globus pallidus externe
GPi :	globus pallidus interne
Gua ⁺ :	guanidinium
HCN :	<i>Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotide-gated</i>

H_v :	canaux protons voltage-dépendants
I_{pace} :	courant de pacemaking
I_{XG} :	courant sensible au XG
I_{ω} :	courant de gating pore/courant ω
K_v :	canaux K^+ voltage-dépendants
LCRa :	Liquide Céphalo-Rachidien artificiel
MPP ⁺ :	1-methyl-4-phenylpyridinium cationique
MPTP :	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MSN :	medium spiny neurons
NAc :	noyau accumbens
Na_v :	canaux Na^+ voltage-dépendants
NMDA :	acide <i>N</i> -méthyl-D-aspartique
NMDG :	<i>N</i> -Methyl-D-Glucamine
NPP :	noyau pédonculopontin
NST :	noyau sous-thalamique
PHPm :	posthyperpolarisation moyenne
S4 :	4 ^e segment transmembranaire
SEM :	Standard Error of the Mean
SK :	small conductance calcium-activated potassium channels
SNc :	substance noire compacte
SNr :	substance noire réticulée

TEA :	tetraéthylammonium
TH :	tyrosine hydroxylase
TRP :	Transient Receptor Potential
TTX :	tétrodotoxine
VMAT2 :	transporteur vésiculaire des monoamines type 2
WT :	wild-type
XG :	1-(2,4-xylyl)guanidine

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....1

1. Les ganglions de la base	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Structure, fonction et connectivité des ganglions de la base	3
1.2.1. Le striatum	3
1.2.2. Le globus pallidus	4
1.2.3. Le noyau sous-thalamique	5
1.2.4. La substance noire	6
1.2.5. L'aire tegmentale ventrale	6
1.3. Circuits des ganglions de la base.....	7
1.3.1. La voie directe.....	7
1.3.2. La voie indirecte.....	7
1.3.3. La voie hyperdirecte.....	7
1.3.4. Modulation des circuits des ganglions de la base par la dopamine	8
2. Morphologie des neurones dopaminergiques mésencéphaliques	10
3. Rôle des neurones dopaminergiques mésencéphaliques	11
3.1. Rôle de la dopamine dans le contrôle moteur	11
3.2. Rôle de la dopamine dans la prédiction de l'erreur	14
4. La maladie de Parkinson	17

5. Propriétés électrophysiologiques des neurones dopaminergiques mésencéphaliques	23
5.1. Identification des neurones DA	23
5.2. Décharges en bouffées	26
5.3. Activité spontanée	29
5.3.1. Nature ionique du potentiel d'action.....	29
5.3.2. Nature ionique de la genèse de l'activité spontanée.....	30
5.3.3. Régulation de la fréquence de décharge par des courants potassiques transitoires.....	34
5.3.4. Rôle des canaux SK dans la régularité de l'activité autonome	38
5.3.5. Mécanisme de maintien du potentiel pacemaker.....	39
6. Diversité des neurones dopaminergiques mésencéphaliques.....	44
6.1. Diversité développementale	44
6.2. Diversité génétique.....	45
6.3. Diversité électrophysiologique.....	47
7. Mécanismes compensatoires des neurones DA de la SNc au cours de la maladie de Parkinson	50
8. Objectif du projet.....	52
MATERIEL ET METHODES.....	54
1. Approbation éthique.....	54
2. Edition de ARN messenger	54
3. Génotypage des souris DAT ^{-/-}	56

4. Enregistrements extracellulaires	58
4.1. Modèles animaux et préparation des tranches de cerveaux	58
4.2. Identification des neurones dopaminergiques.....	59
5. Enregistrements en <i>patch-clamp</i>.....	59
5.1. Modèles animaux et préparation des tranches de cerveaux	59
5.2. Configuration des enregistrements.....	60
5.2.1. Cellule-attachée	60
5.2.2. Cellule-entière	61
5.3. Décharge en bouffées.....	64
5.4. Pacemaker-clamp.....	64
6. Agents pharmacologiques	65
7. Acquisition et analyse des données	66
8. Statistiques.....	68
RESULTATS.....	69
1. Rôle des canaux modulateurs de l'activité spontanée	69
1.1. Canaux Ca_v de type L et N, SK et I_h	69
1.2. Canal NALCN.....	70
2. Rôle des canaux TRPM dans l'activité spontanée	72
3. Courants ω et activité spontanée	78
3.1. Expériences avec guanidinium	81
3.1.1. Enregistrements extracellulaires	81
3.1.2. Enregistrements en <i>patch-clamp</i>	82
3.2. Expériences avec XG	88

3.2.1.	Effet du XG sur l'activité spontanée des neurones DA.....	88
3.2.2.	Rôle de la conductance sensible au XG dans la modulation de l'activité spontanée	103
3.3.	Mise en évidence de pores ω	109
4.	Caractérisation de la conductance sensible au XG	114
4.1.	Isolation de I_{XG} dans l'activité spontanée	114
4.2.	Nature ionique de I_{XG}	114
5.	Rôle du transporteur de la dopamine dans la génération de l'activité spontanée	119
5.1.	Recapture de la dopamine.....	120
5.2.	Expériences sur souris DAT ^{-/-}	121
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		124
1.	Importance de la conductance sensible au XG dans l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques.....	124
2.	Modélisation de la physiologie des neurones DA	127
3.	Influence des courants ω dans l'excitabilité cellulaire	128
4.	Comparaison de l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques avec d'autres cellules pacemaker.....	131
5.	Conclusion	134
BIBLIOGRAPHIE.....		136
ANNEXES.....		178
ARTICLES.....		184

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Représentation schématique des structures constituant les GB chez l'Homme (adaptée de Vicq d'Azyr, 1786).	2
Figure 2 Représentation schématique de la voie directe, indirecte et hyperdirecte des GB.	9
Figure 3 Reconstruction de l'arborisation axonal d'un neurone DA.	12
Figure 4 Changement phasique de la concentration de DA lié à la prédiction de l'erreur.	15
Figure 5 Causes possibles et conséquences de l'agrégation de α -synucléine dans la maladie de Parkinson.	19
Figure 6 Rôles à double-tranchant des niveaux de concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre et de l'activité spontanée dans les fonctions physiologiques des neurones DA de la SNc et leur vulnérabilité à aux déclencheurs de la maladie de Parkinson.	22
Figure 7 Caractéristiques électrophysiologiques des neurones DA.	25
Figure 8 Transition du mode de décharges des neurones DA.	28
Figure 9 Canaux ioniques impliqués dans la génération de potentiels d'action de neurones DA de la SNc.	32
Figure 10 Effets différentiels des dihydropyridines sur l'activité spontanées des neurones DA de la SNc.	33
Figure 11 Courants ioniques impliqués durant l'intervalle interspike des neurones DA mésencéphaliques.	36

Figure 12 Rôle des canaux Kv4.3 dans la modulation de l'activité pacemaker des neurones DA mésencéphaliques.	37
Figure 13 Rôle des canaux SK dans le maintien du profil pacemaker des neurones DA mésencéphaliques.	41
Figure 14 Rôle des canaux HCN dans le maintien du potentiel pacemaker des neurones DA mésencéphaliques.	43
Figure 15 Représentation de la distribution des progéniteurs de neurones DA à différents stades embryonnaires.	46
Figure 16 Identification moléculaire des sous-populations de neurones DA mésencéphalique.	46
Figure 17 Exemple de différences électrophysiologiques des neurones DA mésencéphalique.	49
Figure 18 Mécanismes hypothétiques de compensation pré- et post-synaptique lors de lésions partielles des neurones DA de la SNc.	51
Figure 19 Validation de la méthode de microdissection de la SNc.	55
Figure 20 Identification par génotypage des souris transgéniques.	57
Figure 21 Propriétés électrophysiologiques des neurones DA de la SNc.	63
Figure 22 Effet de blocage des modulateurs de l'activité spontanée des neurones DA.	71
Figure 23 Le FFA inhibe l'activité spontanée des neurones DA de la SNc.	74
Figure 24 L'inhibition de l'activité autonome par le FFA est le résultat d'une hyperpolarisation.	75
Figure 25 Le FFA augmente la conductance cellulaire.	77

Figure 26 Représentation des I_w généré par un pore dans le 4 ^e segment transmembranaire des canaux voltage-dépendants.	80
Figure 27 Effet du gua ⁺ sur l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc. .	83
Figure 28 Le gua ⁺ augmente la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc.	83
Figure 29 Le gua ⁺ dépolarise le potentiel membranaire des neurones DA de la SNc	85
Figure 30 Effet du gua ⁺ sur la courbe de relation courant-potentiel des neurones DA de la SNc.....	86
Figure 31 Le XG inhibe l'activité pacemaker des neurones DA mésencéphaliques.	90
Figure 32 Le XG inhibe l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc chez la souris en configuration cellule-attachée.	92
Figure 33 Effet du XG sur l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc chez le rat en courant-imposé.	94
Figure 34 L'application extracellulaire ou intracellulaire du XG inhibe l'activité autonome des neurones DA de la SNc.	95
Figure 35 Le XG n'augmente pas la conductance cellulaire.	96
Figure 36 Effet du XG sur l'activité pacemaker rapide des neurones GABAergiques de la SNr.	97
Figure 37 Effet du XG sur les canaux voltage-dépendants impliqués dans la genèse d'un potentiel d'action.	100
Figure 38 Le XG n'affecte pas l'activité de décharge en bouffées des neurones DA de la SNc.	102
Figure 39 Effet du XG sur les oscillations calciques des neurones DA de la SNc.	105

Figure 40 Effet du XG sur l'activité spontanée des neurones DA de la SNc en l'absence de coopérativité des canaux $K_v4.3$, $Ca_v1.3$ et HCN.	106
Figure 41 Effet du XG les courants NALCN.	110
Figure 42 Mise en évidence d'un courant sensible au XG.	112
Figure 43 Isolation de I_{XG} en pacemaker-clamp.	115
Figure 44 I_{XG} est généré par un pore perméable au Na^+ et Cl^-	118
Figure 45 Effet du blocage du DAT sur l'activité spontanée des neurones DA de la SNc.	122
Figure 46 L'absence du DAT n'affecte pas la stabilité de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc.	123

INTRODUCTION

1. Les ganglions de la base

1.1. Généralités

Les ganglions de la base (GB) correspondent à un ensemble de noyaux sous-corticaux interconnectés qui s'étend sur le télencéphale, le diencephale et le mésencéphale. Cet ensemble reprend le putamen et le noyau caudé (le striatum), le globus pallidus interne (GPi) et externe (GPe), le noyau sous-thalamique (NST) et la substance noire compacte (SNc) et la réticulée (SNr) (**Fig. 1**). Des études de lésions au sein de ce circuit ont permis de mettre en évidence le contrôle excitateur et inhibiteur des GB dans l'initiation volontaire du mouvement (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Mink, 1996). En outre, les GB forment également un territoire limbique impliquant le noyau accumbens (NAc), le pallidum ventral et l'aire tegmentale ventrale (ATV). Ainsi, en plus d'intervenir dans la préparation du mouvement, les GB jouent un rôle dans les processus cognitifs et émotionnels qui y sont associés tels que la mémoire procédurale pour déterminer le comportement le plus approprié en fonction des informations senso-motrices, associatives et limbiques de l'environnement (Brown and Pluck, 2000; Chakravarthy et al., 2010; Middleton and Strick, 2000). *Etant donné que ce projet s'est principalement focalisé sur les neurones dopaminergiques de la SNc, le circuit dans lequel est inséré la SNc sera décrit plus en détails, avec quelques précisions sur l'ATV, le deuxième noyau dopaminergique du mésencéphale.*

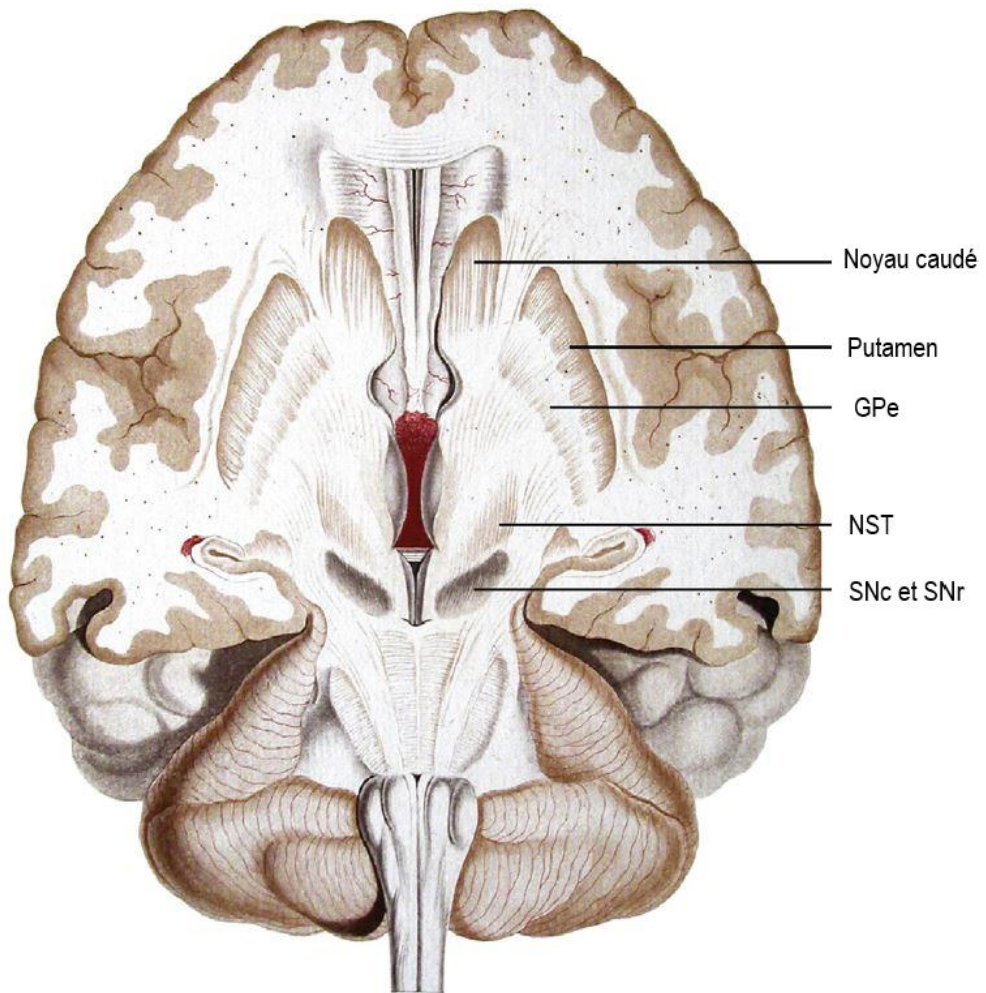


Figure 1 | Représentation schématique des structures constituant les GB chez l'Homme (adaptée de Vicq d'Azyr, 1786).

1.2. Structure, fonction et connectivité des ganglions de la base

1.2.1. Le striatum

Le striatum constitue la principale structure d'entrée des GB et est positionné au sein de diverses boucles parallèles cortico - subcorticales. Il reçoit des projections glutamatergiques venant du cortex et du thalamus et il projette vers d'autres régions qui relaient l'information au cortex par l'intermédiaire du thalamus (Alexander et al., 1986; Garrett E. Alexander and Crutcher, 1990). Des afférences glutamatergiques provenant de l'amygdale et des afférences sérotonergiques du noyau raphé projettent vers cette région. Par ailleurs, les entrées dopaminergiques (DA) de la SNc modulent fortement l'ensemble du striatum.

Au niveau organisationnel, il peut être divisé en deux parties : le striatum dorsal, principalement impliqué dans le contrôle conscient du mouvement, et le striatum ventral, chargé des fonctions limbiques de la récompense et l'aversion (Young and Sonne, 2019). Le striatum dorsal se divise également, chez l'homme, en deux zones de fonctions distinctes : le striatum dorsomédial correspondant au noyau caudé responsable de l'apprentissage (Grahn et al., 2008), et le striatum dorsolatéral, correspondant au putamen, responsable du contrôle moteur (G. E. Alexander and Crutcher, 1990). Par ailleurs, le striatum comprend un ensemble de petits îlots distribués au sein de sa matrice. Cet ensemble est appelé le striosome (Graybiel and Ragsdale, 1978) et il est impliqué dans la planification du mouvement (Friedman et al., 2015) tandis que la matrice jouerait plutôt un rôle de contrôle moteur.

Les neurones de projections épineux moyens (ou « medium spiny neurons » en anglais, MSN) sont le principal type cellulaire du striatum. Une étude

comparative a montré que les MSNs représentent plus de 95% des neurones de cette structure chez le rat, le reste étant composé d'interneurones cholinergiques et de différents sous-groupes d'interneurones GABAergiques (Kawaguchi, 1993; Oorschot, 1996). Les MSNs peuvent être divisés en deux sous-populations équivalentes en fonction de leur projection, de marqueurs géniques codant pour certains neuropeptides et du type de récepteurs à la dopamine exprimés. Approximativement la moitié des MSNs projette vers le GPi et la SNr, formant ainsi la « voie directe » des GB (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Ces MSNs co-expriment la substance P et la dynorphine avec l'acide γ -aminobutyrique (GABA), en plus des récepteurs à la dopamine D1 (D1, D5) couplés à une protéine Gs (Gerfen et al., 1990; Le Moine and Bloch, 1995). L'autre moitié des MSNs projette vers le GPe, dont la sortie principale et le NST. Cette structure, dont la sortie est la SNr et le GPi, forme la « voie indirecte » des GB. Ces MSNs co-expriment l'enképhaline avec le GABA, en plus des récepteurs D2 (D2, D3 et D4) couplés à une protéine Gi/o. La ségrégation de ces deux groupes de MSNs n'est pas aussi évidente, mais il semblerait que les striosomes soient enrichis en MSNs exprimant les récepteurs D1 (striatum dorsomédial) tandis que la matrice serait enrichie en MSNs exprimant les récepteurs D2 (striatum dorsolatéral) (Crittenden and Graybiel, 2011; Yin and Knowlton, 2006).

1.2.2. Le globus pallidus

Le globus pallidus est localisé médialement par rapport au putamen et séparé de celui-ci par la lamine médullaire latérale. La lamina médullaire latérale passe au sein du globus pallidus en le séparant en GPe et GPi.

Le GPe sert de noyau relais de la voie indirecte en permettant la transmission des informations du striatum vers les noyaux de sortie des GB. Il est constitué de neurones GABAergiques qui reçoivent des

afférences GABAergiques du striatum, glutamatergiques du NST et DA de la SNc sous forme de projections collatérales. Ils projettent en retour vers le striatum et le NST. A l'heure actuelle, la classification des neurones GABAergiques composants le GPe est toujours en cours d'étude mais deux catégories ressortent : les neurones prototypiques et les arkypallidiaux (Abdi et al., 2015; Hegeman et al., 2016). Les premiers reçoivent des afférences du striatum et projettent vers le NST tandis que les seconds projettent vers le striatum.

Le GPi (chez l'humain ou le noyau entopédunculaire chez le rongeur) est l'une des deux structures de sortie des GB, la deuxième étant la SNr. Il s'agit du point de convergence des voies directe, indirecte et hyperdirecte et ces noyaux reçoivent également des afférences dopaminergiques de la SNc (Lavoie et al., 1989; Singh-Bains et al., 2016). Leurs projections GABAergiques permettent d'exercer une inhibition du relais thalamocortical.

1.2.3. Le noyau sous-thalamique

Le NST est l'unique noyau à projection glutamatergique (excitateur) sur l'ensemble des GB. Il sert de noyau de relais de la voie indirecte, tout en étant la structure d'entrée de ce circuit. Il reçoit des afférences du GPe, de la SNc, du thalamus, du noyau pédonculopontin (NPP) et du raphé. Il projette toutes les structures des GB (Benarroch, 2008; Parent and Hazrati, 1995). Par ailleurs, le NST reçoit des afférences glutamatergiques du cortex, court-circuitant ainsi le striatum. Ce circuit cortico-subthalamo-pallidale forme la voie hyperdirecte des GB qui contribuent à l'inhibition tonique du relais thalamocortical (Benarroch, 2008; Nambu et al., 2002).

1.2.4. La substance noire

La substance noire est la structure principale de modulation des GB. Elle est divisée en deux parties : la SNr et la SNc. La SNr est principalement composée de neurones GABAergiques (Nair-Roberts et al., 2008). Ses projections sont semblables à celles du GPi et donc, la SNr également un point de convergence des voies directe, indirecte et hyperdirecte.

Au sein de la SNc, 71% des neurones expriment la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme clé de la synthèse de la dopamine, et 29% des neurones expriment l'acide glutamique décarboxylase, permettant la synthèse du GABA (Nair-Roberts et al., 2008). La majorité des neurones au sein de la SNc sont donc dopaminergiques. La dopamine est le neurotransmetteur régulateur de l'activité des GB. Ces neurones projettent vers l'ensemble des noyaux des GB, à l'exception du GPe. La SNc reçoit des afférences glutamatergiques du NST, du cortex et du NPP (ainsi que des afférences cholinergiques) et GABAergiques de la SNr ainsi que tegmentum rostromédian (Watabe-Uchida et al., 2012). Les neurones DA sont également la cible des projections des MSNs du striosome exprimant les récepteurs D1 (Friedman et al., 2015; Gerfen, 1992). *Les caractéristiques des neurones DA seront décrites plus en détails dans les points suivants de l'introduction.*

1.2.5. L'aire tegmentale ventrale

L'ATV est le deuxième noyau dopaminergique du mésencéphale. Cette structure joue un rôle clé dans les phénomènes liés à la récompense et à l'addiction (Schultz, 1998). Elle est composée de neurones DA (~60%), GABAergique (~35%) et d'une petite population de neurones glutamatergiques (Morales and Margolis, 2017). Ces neurones présentent une très grande hétérogénéité sur la base de l'expression de divers

marqueurs moléculaires tels que la TH, le transporteur vésiculaire du glutamate *VGLUT2* ou du transporteur de la dopamine (DAT) par exemple (Morales and Margolis, 2017; Poulin et al., 2014, 2020). Par ailleurs, il a été montré que les neurones DA de l'ATV libèrent de la dopamine avec du glutamate (Silm et al., 2019).

1.3. Circuits des ganglions de la base

1.3.1. La voie directe

La voie directe débute avec l'activation des récepteurs D1 des MSNs, projetant vers le GPi et la SNr. Les neurones de ces deux régions, quand ils sont actifs, empêchent les neurones du thalamus de décharger. Dès lors, quand la voie directe est activée, l'inhibition de ces régions libère le blocage des neurones thalamiques, ce qui leur permet de stimuler le cortex moteur pour initier le mouvement (**Fig. 2**).

1.3.2. La voie indirecte

La voie indirecte est initiée par l'activation des récepteurs des récepteurs D2 des MSNs du striatum. Leurs projections vers le GPe permettent d'inhiber cette structure, ce qui lève l'inhibition du NST. Pour rappel, le NST est le seul noyau des GB à envoyer des projections glutamatergiques, donc excitatrices. Ainsi, l'activation de la voie indirecte permet au NST d'activer le GPi et la SNr pour bloquer l'action excitatrice du thalamus sur le cortex. Cette voie permet donc d'inhiber le cortex moteur et empêcher le mouvement (**Fig. 2**).

1.3.3. La voie hyperdirecte

La voie hyperdirecte court-circuite le striatum grâce aux projections excitatrices du cortex vers le NST. Cette voie contrecarre les programmations motrices de la voie directe. D'un point de vue fonctionnel,

cette voie permet le passage d'un mouvement automatique vers un mouvement volontaire en adoptant un comportement moteur motivé (Isoda and Hikosaka, 2008; Nambu et al., 2002).

1.3.4. Modulation des circuits des ganglions de la base par la dopamine

La dopamine relarguée dans le striatum par les neurones DA de la SNc (voie nigro-striée) joue un rôle important dans la modulation des voies directe et indirecte. L'activation des récepteurs D1 des MSNs des striosomes permet d'initier la voie directe tandis que celle des récepteurs D2 des MSNs de la matrice du striatum freine la voie indirecte. Ce double effet de la dopamine permet donc à la voie nigro-striée de stimuler le cortex moteur, en faveur de l'initiation du mouvement.

Cette double modulation est entre-autre due au fait que les récepteurs D1 et D2 ont une affinité différentielle pour la dopamine. En effet, la dopamine a une plus grande affinité pour les récepteurs D2 que pour les récepteurs D1 (Richfield et al., 1989). La voie indirecte est donc celle privilégiée. Pour initier le mouvement par l'activation de la voie directe, une libération plus importante de dopamine est nécessaire. Ce recrutement de dopamine est possible quand les neurones DA de la SNc déchargent en bouffées (Heien and Wightman, 2006; Howe and Dombeck, 2016). *Les modes de décharges des neurones DA de la SNc seront détaillés plus en détails dans la troisième partie de l'introduction.*

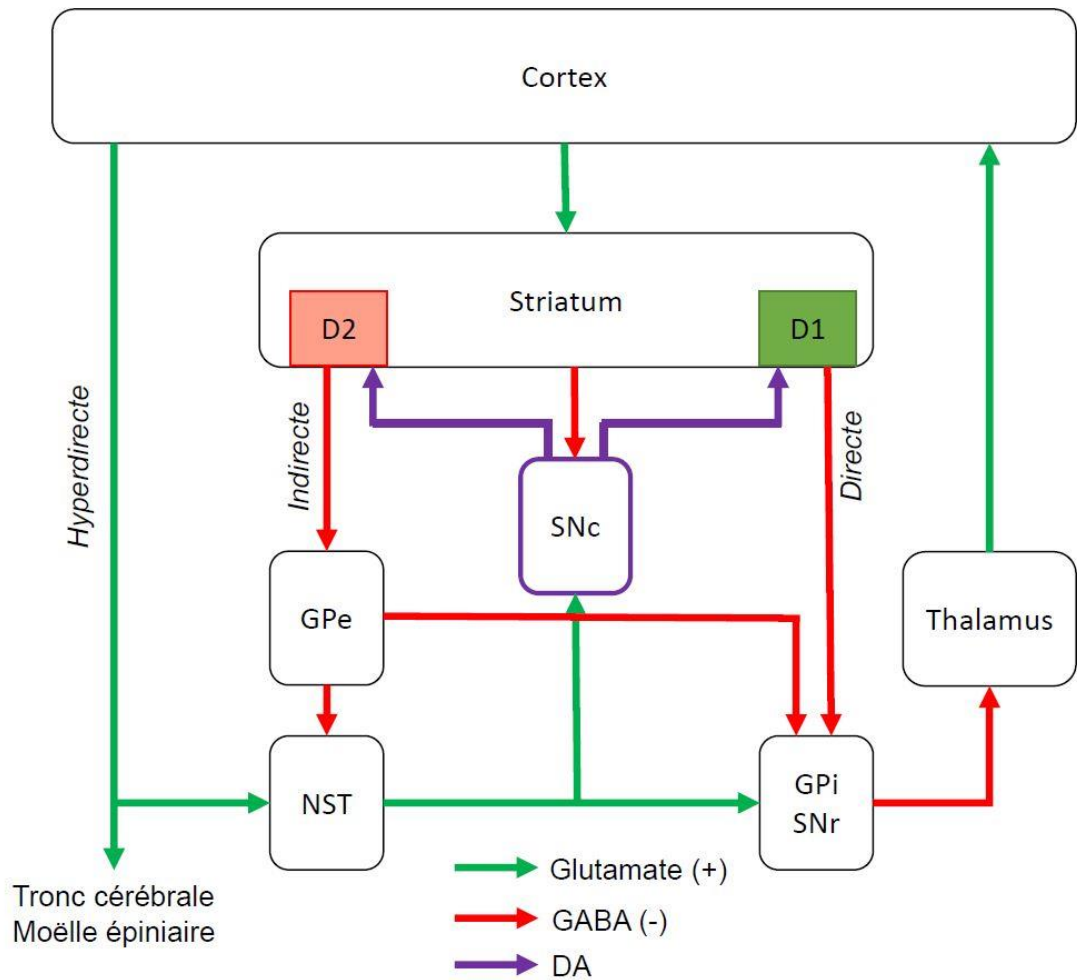


Figure 2 | Représentation schématique de la voie directe, indirecte et hyperdirecte des GB. Il est important de préciser que l'activation des récepteurs D2 n'active pas la voie indirecte, mais elle la freine.

2. Morphologie des neurones dopaminergiques mésencéphaliques

L'étude de la morphologie des neurones DA mésencéphaliques a permis de révéler deux populations distinctes (Fallon et al., 1978). En effet, les neurones du tiers ventral de la SNc possèdent un corps cellulaire pyramidal avec une arborisation dendritique selon un axe dorsoventral, tandis que les neurones du tiers dorsal de la SNc, ainsi que de l'ATV, possèdent un corps cellulaire fusiforme avec une arborisation dendritique orientée dans un axe mediolatéral. *D'autres études ont permis de confirmer cette hétérogénéité au sein des neurones DA mésencéphaliques, sur base de marqueurs génétiques et électrophysiologiques. Cette partie est détaillée dans la partie « Diversité des neurones dopaminergiques mésencéphaliques ».*

Malgré la multipolarité de l'arborisation dendritique des neurones DA, elle reste organisée. On peut distinguer deux groupes de dendrites : les dendrites latérales qui s'étendent dans la SNc sur une distance pouvant dépasser la centaine de micromètre pour former des synapses dendro-dendritiques avec d'autres neurones DA (synapses dites « en passage »), et les dendrites ventrales qui plongent dans la SNr sous forme de faisceaux denses orthogonaux (« bouquets ») (Crittenden et al., 2016; Paladini and Tepper, 2016; Wilson et al., 1977). Elles peuvent également former des épines dendritiques, mais leur densité reste faible (environs deux épines tous les 10 μm) (Hage et al., 2016; Jang et al., 2015).

L'axone des neurones DA est généralement porté par une dendrite primaire ou secondaire dont le diamètre est supérieure à 3 μm , à des distances variables du soma, allant jusqu'à 240 μm (Häusser et al., 1995; Meza et al., 2018; Moubarak et al., 2019). Il se prolonge médialement et

rostralement avant de rejoindre d'autres axones pour former le faisceau médian du télencéphale (Paladini and Tepper, 2016). Au cours de leur ascension dans le diencephales, les axons commencent leur arborisation en traversant le NTS (Cragg et al., 2004; W. Matsuda et al., 2009). Lorsqu'ils atteignent le GPe, ils se déploient largement avant d'atteindre le striatum (**Fig.3**) (W. Matsuda et al., 2009).

3. Rôle des neurones dopaminergiques mésencéphaliques

Les neurones DA mésencéphaliques projettent sur différents territoires fonctionnels dans le striatum (Parker et al., 2016). En effet, les projections dopaminergiques de l'ATV et de la SNc médiodorsale interviennent dans les fonctions limbiques, celles de la SNc du tiers ventrale participe au circuit associatif et celles de la SNc latérale s'intègrent dans le circuit sensorimoteur (Haber et al., 2000; Parker et al., 2016). Les neurones DA de ces régions fonctionnelles reçoivent ensuite, de façon indirecte, les projections de différentes régions du cortex préfrontal, associatif et moteurs. Dès lors, la DA est impliquée dans des fonctions motrices et comportementales, notamment dans le contrôle du mouvement et la prédiction de l'erreur.

3.1. Rôle de la dopamine dans le contrôle moteur

Vers la fin des années 1960, l'utilisation de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) a permis d'identifier le rôle de la voie nigrostriée dans le contrôle moteur. La 6-OHDA est un agent pharmacologique qui permet d'induire des lésions des neurones à catécholamine par accumulation dans le corps cellulaire et les neurites où elle est métabolisée en 6-hydroxyquinone avec synthèse de peroxyde d'hydrogène, deux agents très oxydants (Zigmond et al., 1990).

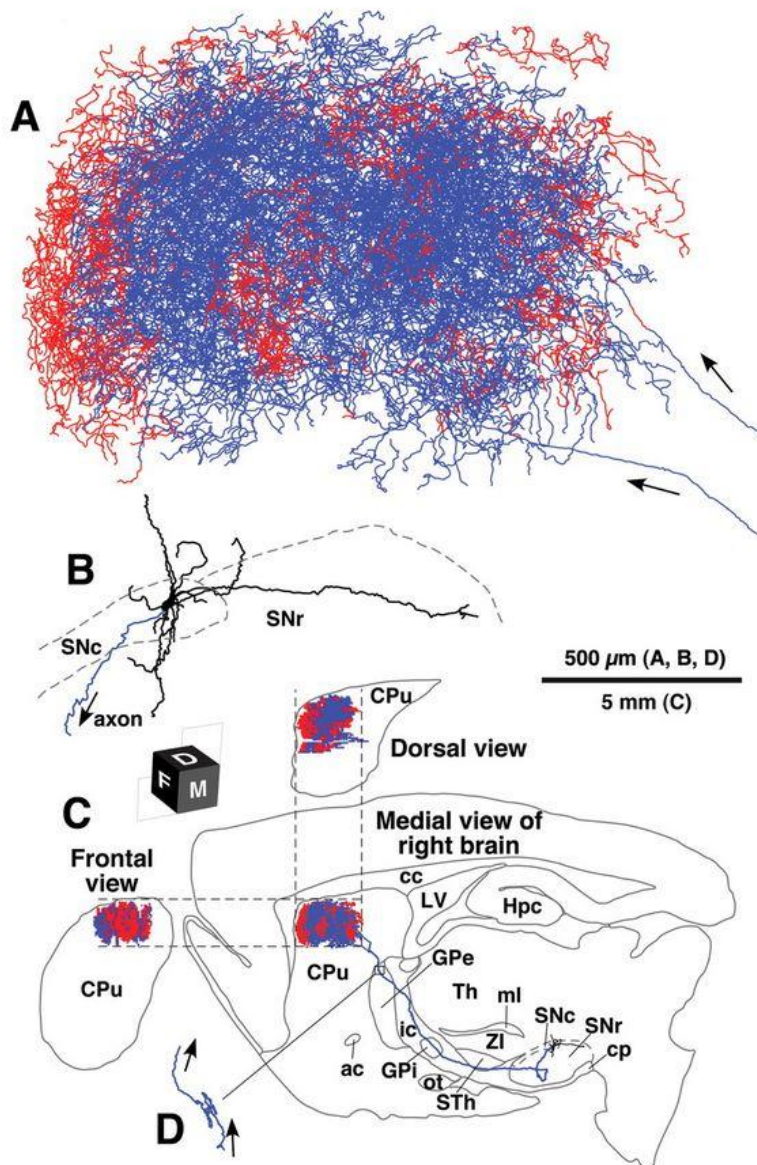


Figure 3 | Reconstruction de l'arborisation axonale d'un neurone DA. **A.** Termination des fibres axonales de neurones DA de la SNc projetant dans le striatum dorsal, selon un plan parasagittal. En rouge est représenté une terminaison projetant dans les striosomes et en bleu, une terminaison projetant dans la matrice du striatum. **B.** Reconstruction de l'arborisation dendritique d'un neurone DA de la SNc, avec une longue dendrite plongeant ventralement dans la SNr. **C.** Représentation parasagittale de la trajectoire des projections axonales. Les vues, frontale et dorsale, des terminaisons axonales sont représenté en haut à gauche **D.** Formation d'une collatérale mineure dans le segment externe du GPe (W. Matsuda et al., 2009).

Lorsqu'elle est injectée dans le faisceau médian du télencéphale, on observe une dégénérescence des neurones DA, entraînant une déplétion en dopamine dans le striatum et le noyau accumbens (Ungerstedt, 1968). La lésion des terminaisons DA dans le striatum entraîne des symptômes similaires à la maladie de Parkinsons tels qu'une akinésie du côté opposé à la lésion et une posture asymétrique (Ungerstedt, 1971, 1968). La 6-OHDA est donc un agent intéressant pour étudier la fonction des projections DA dans le striatum. Une autre approche utilisée pour étudier le rôle de la voie nigrostriée consiste en une suractivation de cette dernière par des agonistes DA directs ou indirects, tels que la cocaïne ou l'amphétamine. En effet, il a été montré que l'administration de ces drogues d'abus entraîne une hyperlocomotion stéréotypée avec l'activation de la voie mésolimbique, jusqu'à l'apparition, à forte dose, d'une psychomotricité désorganisée appelée stéréotypies (Di Chiara and Imperato, 1988; Freye and Levy, 2009; Ritz et al., 1987). Ces stéréotypies sont le résultat d'un déséquilibre de l'activité de la matrice du striatum et des striosomes (Canales and Graybiel, 2000; Capper-Loup et al., 2002; Graybiel et al., 2000). Afin d'assurer les fonctions motrices en conditions physiologiques, le tonus DA doit être régulé de façon optimale.

Récemment, il a été démontré qu'il y a une libération phasique de la DA dans le striatum suite à l'initiation du mouvement (Howe and Dombeck, 2016). Cette observation a permis de faire le lien direct entre le changement de l'activité électrique des neurones DA de la SNc et le contrôle du mouvement. Par ailleurs, les neurones DA de la SNc ne seraient requis que pour l'initiation du mouvement. En effet, une étude a montré que l'inhibition de l'activité de ces neurones par stimulation optogénétique diminue la probabilité d'initiation du mouvement sans altérer le mouvement en cours (Da Silva et al., 2018).

3.2. Rôle de la dopamine dans la prédiction de l'erreur

En plus de son implication dans l'initiation du mouvement, la dopamine participe dans l'apprentissage par renforcement lié à la prédiction de l'erreur (Schultz, 2019; Wise, 2004). Ce phénomène est le résultat d'une association entre un stimulus environnemental et une présentation d'une récompense ou d'une punition qui s'en suit. Le renforcement consiste en une consolidation de cette association, par exemple par la présentation d'une récompense suite à une action motrice préalable.

Tout comme l'initiation du mouvement, la prédiction de l'erreur est contrôlée la concentration de DA dans le striatum : l'activité tonique des neurones DA au repos est associée à libération tonique de DA dans le striatum (10-20 nM) (Church et al., 1987; Gonon and Buda, 1985; Sulzer et al., 2016), mais en présence de stimulus environnemental, détecté par l'ATV et la SNc, l'activité électriques des neurones DA et la concentration de DA libérée dans le striatum varient en fonction de la nature bénéfique ou délétère du stimulus (Bayer and Glimcher, 2005; Berke, 2018; Hassani et al., 2001; Kobayashi and Schultz, 2014; Schultz et al., 1997; Sulzer et al., 2016; Wise, 2004). La prédiction de l'erreur peut être divisée en trois phases distinctes sur base de la concentration de DA mesurée dans le striatum : l'apparition du stimulus, la prédiction et la récompense (Schultz, 2016; Schultz et al., 1997; Sulzer et al., 2016) (**Fig.4**). L'apparition d'un stimulus reconnu lié à une récompense ou l'obtention de la récompense entraîne une transition des neurones DA vers un mode de décharge en bouffées, permettant ainsi une libération phasique de dopamine dans les régions de striatum cibles des projections DA (~200 nM) (Robinson et al., 2002, 2001; Sulzer et al., 2016; Tsai et al., 2009; Venton et al., 2003).

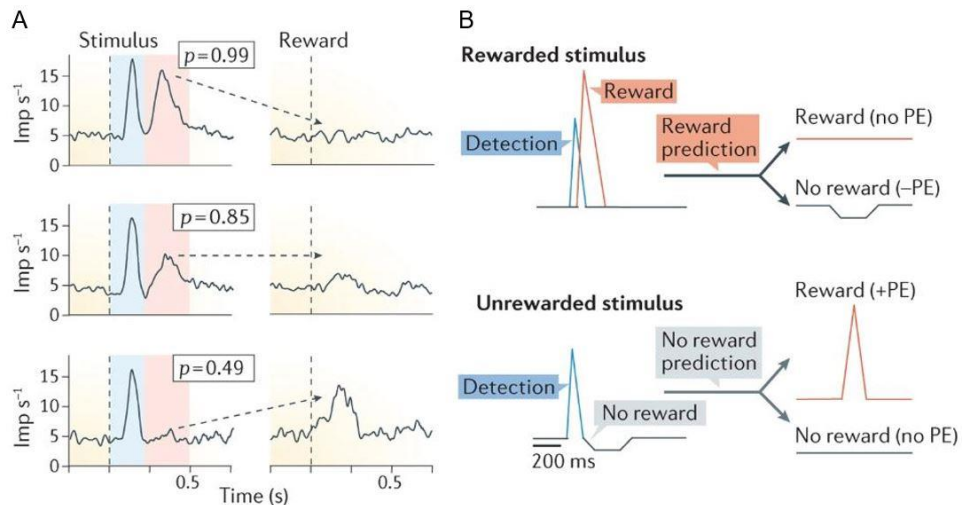


Figure 4 | Changement phasique de la concentration de DA lié à la prédiction de l'erreur. **A.** Evolution de la concentration de la dopamine, mesurée par voltamétrie, lors de la prédiction de l'erreur. A l'apparition d'un stimulus (zone en bleu), on observe une augmentation transitoire de la concentration de DA dans le striatum. Il s'en suit une phase de prédiction (en rose), où l'intensité du pic dépend de la probabilité à recevoir une récompense. Lorsque que la probabilité est haute ($p = 0.99$), la concentration de DA est plus importante que lorsque cette probabilité diminue ($p = 0.85$ et $p = 0.49$). Lorsque que l'attente est élevée, la présentation de la récompense (Reward), on n'observe pas d'augmentation de la concentration de DA. A l'inverse, plus la présentation de la récompense est difficile à prédire, plus la concentration de DA augmente lors de la présentation de la récompense. **B.** Lorsqu'un stimulus est associé à une récompense, l'obtention de la récompense n'induit pas d'augmentation de concentration DA (no PE) tandis que l'absence de récompense induit une diminution du tonus DA (-PE). Lorsque le stimulus n'est pas associé à une récompense, la présentation de la récompense induit une augmentation du tonus DA (+PE) tandis que l'absence de récompense de change pas la concentration de DA (Schultz, 2016).

Cependant, l'apparition d'un stimulus aversif ou l'absence de récompense lorsqu'elle est attendue entraîne une diminution de l'activité des neurones DA, ce qui diminue le tonus DA dans le striatum.

La prédiction de l'erreur est également liée à des tâches plus complexes telles que les réponses, alternances et correspondances retardées (Ljungberg et al., 1991; Schultz et al., 1993; Takikawa et al., 2004), les mouvements séquentiels (Enomoto et al., 2011; Nakahara et al., 2004; Satoh et al., 2003), la discrimination des mouvements aléatoires de points (Nomoto et al., 2010), la perception subjective (De Lafuente and Romo, 2011) et la mémorisation de signaux visuels (Matsumoto and Takada, 2013).

Plusieurs études ont révélé des sous-populations des neurones DA de la SNc dans l'apprentissage par renforcement en fonction de la valeur bénéfique (région rostromédiane de la SNc, circuit associatif) ou négative (région caudolatérale de la SNc, circuit sensorimoteur) d'un stimulus environnemental (H. F. Kim et al., 2015; Lerner et al., 2015; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Menegas et al., 2018). Le circuit associatif intervient dans les comportements dirigés par un but. C'est la perspective d'une récompense imminente qui dirige le comportement (Wise, 2004). Lorsque la récompense est omise ou dévaluée, ces comportements dirigés s'atténuent. Le circuit sensorimoteur intervient dans les comportements automatiques. Ces comportements apparaissent suite à un apprentissage intensif d'une tâche et qui persistent même la récompense qui en résulte est absente ou dévaluée (Belin and Everitt, 2008; Yin and Knowlton, 2006).

4. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer (Bartels and Leenders, 2009). La prévalence de la maladie augmente avec l'âge et touche 1% de la population au-dessus de 60 ans (Tysnes and Storstein, 2017). Elle est principalement sporadique ; 10% des cas ont une composante héréditaire lié aux gènes codant pour l' α -synucléine, LRRK2, Parkin, DJ1 et Pink1 (Michel et al., 2016).

La perte des neurones DA de la SNc est la principale cause des symptômes moteurs et neuropsychiatriques associés à cette pathologie (Hornykiewicz, 2006). Ces symptômes apparaissent lorsqu'il y a une dégénérescence de plus de 50% de neurones DA dans la SNc, et une diminution de 70% de la concentration en dopamine dans le striatum (Marsden, 1982). Dans ces conditions d'hypodopaminergie, les patients présentent une triade de troubles locomoteurs caractéristiques : de la bradykinésie, une rigidité musculaire et des tremblements lorsque les muscles sont au repos. A l'heure actuelle, un traitement est proposé pour atténuer ces symptômes, qui consiste en l'administration de L-dopa (Levodopa) (Marsden, 1982). La L-dopa est un précurseur de la dopamine qui, contrairement à cette dernière, passe la barrière hémato-encéphalique. Dès que la L-dopa est dans le compartiment cérébral, elle est transformée en dopamine par la dopadécarboxylase dans le cytoplasme des neurones DA. Même si ce traitement fournit une source en dopamine pour limiter les symptômes, l'administration de L-dopa comporte des effets secondaires dont le développement d'une motricité anormale (dyskinésie, effets « on-off ») et comportements addictifs (jeux, sexe,...) (Chaudhuri, 2016). Toutefois, deux études récentes ont montré des résultats très prometteurs en offrant des stratégies pour reproduire des neurones DA. Dans la première, les auteurs

ont réussi à convertir des astrocytes dans la SNc en neurones DA fonctionnels dans un modèle murin de la maladie Parkinson, restaurant ainsi la motricité physiologique (Qian et al., 2020). Ils ont également démontré que leur approche fonctionne également avec des astrocytes humains. Dans la deuxième, les auteurs ont transplanté des cellules progénitrices de neurones DA, issues de cellules souches à pluripotence induite, dans le striatum de rats, dont les terminaisons DA ont été détruites avec la 6-OHDA, ainsi que des singes traités au 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) et ils ont observé une amélioration des fonctions motrices, sans qu'il n'y ait d'effet secondaire délétère (Doi et al., 2020). Leurs résultats ont d'ailleurs permis la mise en place d'une étude clinique à Kyoto.

La cause de la maladie de Parkinson est due à de multiples facteurs, dont l'exposition à des toxines environnementales, à la neuroinflammation, le stress oxydatif, la dérégulation du Ca^{2+} et un dysfonctionnement des mitochondries. Ces facteurs, individuels et/ou combinés, favorisent une agrégation d' α -synucléines dans le corps cellulaire des neurones DA de la SNc, entraînant la mort de ces cellules (Michel et al., 2016) (Fig. 5).

L'hypothèse environnementale est apparue aux débuts des années 1980 avec la mort de plusieurs toxicomanes présentant des symptômes semblables à ceux de la maladie de Parkinson en Californie. Ces derniers avaient consommé un agent de composition artisanal, le MPTP. La molécule n'est pas lui-même toxique, mais lorsqu'elle passe la barrière hémato-encéphalique, elle est convertie en 1-méthyl-4-phénylpyridinium cationique (MPP⁺) par l'enzyme monoamine oxydase B (Heikkila et al., 1984; Markey et al., 1984). Le MPP⁺ est assimilé dans les neurones DA via le DAT (Langston et al., 1999).

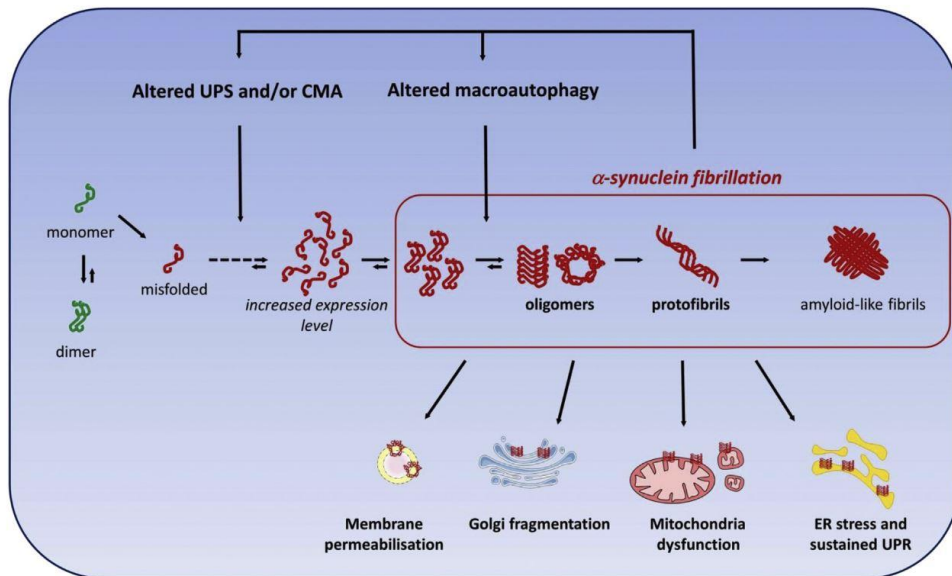


Figure 5 | Causes possibles et conséquences de l'agrégation de α -synucléine dans la maladie de Parkinson. Une altération de la structure de l' α -synucléine entraîne une agglomération de cette dernière par défaut de l'activité du protéasome, causant ainsi différents dégâts aux organites tels que les mitochondries et l'appareil de Golgi (Michel et al., 2016). *UPS* : ubiquitin proteasome system ; *CMA* : chaperone-mediated autophagy ; *ER* : endoplasmic reticulum ; *UPR* : unfolded proteins

Par la suite, des pesticides de structure similaire au MPTP, tels que le paraquat et la roténone, ont été identifiés comme inducteur de syndromes Parkinsoniens (Tanner et al., 2011). Ces molécules sont également utilisées dans des modèles animaux de parkinsonisme induit.

Le stress oxydatif est également un facteur d'induction de la dégénérescence des neurones DA de la SNc, en raison d'une augmentation de production de radicaux libres d'oxygène. Cette augmentation peut être le résultat d'une diminution d'agents antioxydants comme le glutathion (Jenner and Olanow, 1996), l'absence et/ou un dysfonctionnement de la protéine mitochondriale DJ-1 (Guzman et al., 2010; R. H. Kim et al., 2005) ou bien une augmentation du stress métabolique lié à l'homéostasie du Ca^{2+} (Chan et al., 2009; Surmeier et al., 2010). Cette dernière hypothèse suggère que l'entrée de Ca^{2+} via les canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v) 1.3 durant l'activité spontanée des neurones DA de la SNc entraîne une production énergétique élevée pour maintenir l'homéostasie du Ca^{2+} , ce qui diminue les défenses antioxydantes de la cellule (Chan et al., 2007; Surmeier et al., 2010). Il s'agirait alors d'un phénomène d'excitotoxicité qui expliquerait la vulnérabilité sélective des neurones DA à la neurodégénérescence (**Fig. 6**). Outre l'implication des canaux Ca_v 1.3, il a été démontré que les canaux K^+ sensibles à l'adénosine triphosphate ($\text{K}_{\text{ATP}}/\text{ATP}$) était impliqué dans la vulnérabilité des neurones DA de la SNc (Liss et al., 2005).

Une autre hypothèse suggère que la vulnérabilité des neurones DA de la SNc pourrait provenir que leur immense arborisation axonale (Wakoto Matsuda et al., 2009), entraînant des demande énergétiques élevées et un puissant stress oxydatif chronique (Bolam and Pissadaki, 2012; Giguère et al., 2018).

Cette caractéristique pourrait imposer un fardeau énergétique, laissant place à peu de marge pour un stress métabolique supplémentaire (Bolam and Pissadaki, 2012; Pacelli et al., 2015; Ren et al., 2005). En effet, il a été démontré que le besoin en ATP pour la propagation d'un potentiel d'action augmente de façon exponentielle avec le niveau d'arborisation axonale (Pissadaki and Bolam, 2013). Par ailleurs, une réduction de la taille de l'arbre axonal des neurones DA de la SNc à une taille similaire à celle des neurones DA l'ATV, grâce au facteur de guidance axonale sémaphorine 7A, permet de réduire la production basale de radicaux libre de l'oxygène et leur vulnérabilité aux agents inducteurs de symptômes parkinsoniens comme le MPP⁺ et la roténone (Pacelli et al., 2015).

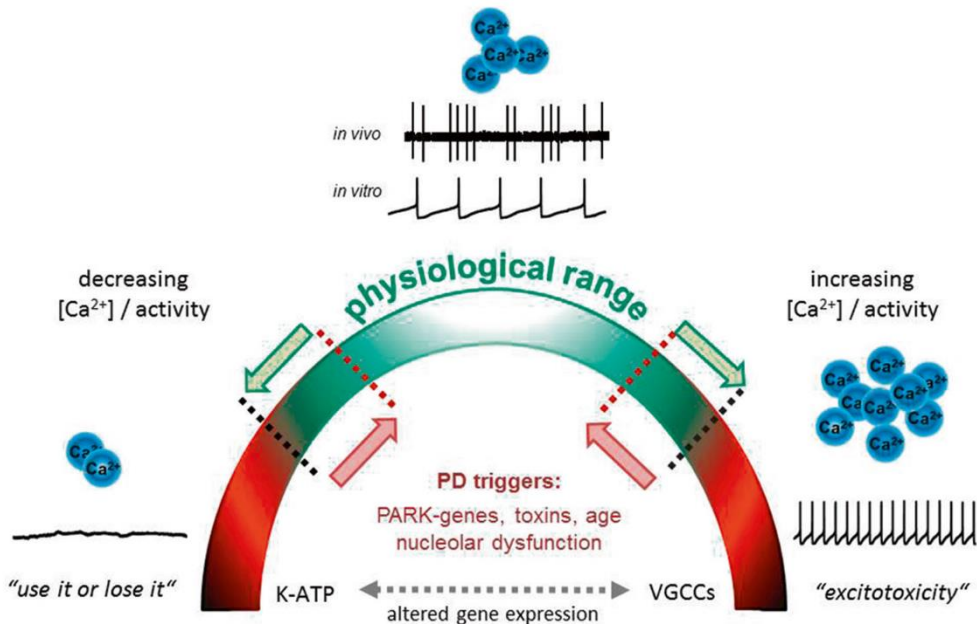


Figure 6 | Rôles à double-tranchant des niveaux de concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre et de l'activité spontanée dans les fonctions physiologiques des neurones DA de la SNc et leur vulnérabilité à aux déclencheurs de la maladie de Parkinson. Une activité réduite ou grande, associé à l'homéostasie du Ca^{2+} peuvent déclencher la dégénération des neurones DA de la SNc. Dans le cas d'une activité faible et d'une concentration de calcium faible, le neurone s'inactive et est enclin à la mort (« use it or lose it »). Dans le cas d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre, l'activité du neurone accélère et la production de radicaux libres de l'oxygène augmente (excitotoxicité). Le Ca^{2+} est nécessaire à la libération de dopamine car il est responsable de l'oscillation du potentiel de membrane pour maintenir une activité spontanée physiologique. Les facteurs « pro-parkinson » réduisent cette fenêtre physiologique (Parlato and Liss, 2017).

5. Propriétés électrophysiologiques des neurones dopaminergiques mésencéphaliques

5.1. Identification des neurones DA

Les neurones DA ont la caractéristique intéressante de générer spontanément des potentiels d'action (**Fig. 7A**), même s'ils sont isolés en culture ou s'ils sont pharmacologiquement isolés de toute afférence présynaptique. Cette activité spontanée, dite pacemaker, est nécessaire pour maintenir une concentration basale de dopamine dans le striatum et maintenir la sensibilité physiologique des récepteurs D1 et D2 (Heien and Wightman, 2006; Robinson et al., 2004).

En 1973, les premiers enregistrements électrophysiologiques *in vivo* de rats anesthésiés ont permis de mettre en évidence trois profils d'activité : une activité autonome régulière (1), une activité irrégulière (2) et des décharges en bouffées, dite burst (3) (Bunney et al., 1973a, 1973b) (**Fig. 7C**). L'application systémique d'agonistes de la dopamine tels que l'apomorphine, la d-amphétamine et la l-dopa inhibe l'activité des neurones DA sans affecter celle des neurones non-DA. Cette inhibition est levée par l'application d'antagonistes de récepteurs D2 tels que l'halopéridol et la chlorpromazine (Aghajanian and Bunney, 1974; Bunney et al., 1973a). En condition d'activité régulière, la fréquence de décharge est comprise entre 1 et 8 Hz (Grace and Bunney, 1984a) (**Fig. 7D**) et la durée des potentiels d'action est plus longue que celle des neurones non-DA (>2.5 ms) (**Fig. 7B**). Ils sont également biphasiques à cause de la rétropropagation de potentiels d'action provenant du segment initial de l'axone et du compartiment somato-dendritique (Engel and Seutin, 2015; Grace and Bunney, 1983; Häusser et al., 1995).

Des études ont démontré une autre propriété intéressante des neurones DA de la SNc. En effet, ils sont capables de libérer de la dopamine à partir du compartiment somatodendritique. Ce type de libération permet de moduler l'activité des neurones non-DA dans la SNc et d'autoréguler celle des neurones DA (Cheramy et al., 1981; Geffen et al., 1976). Les neurones DA expriment des autorécepteurs D2 qui, lorsqu'ils sont activés, permettent l'ouverture de canaux potassiques couplés à une protéine G (canaux GIRK) et d'inhiber à la fois de certains Ca_v (les « high-threshold ») et les canaux de fuite Na^+ (canaux NALCN), entraînant une hyperpolarisation de la cellule et donc, limitant le relargage de dopamine dans le striatum (Cardozo and Bean, 1995; Lacey et al., 1987; Philippart and Khaliq, 2018) (**Fig. 7E**).

Par ailleurs, on peut observer dans ces neurones une rectification du potentiel de membrane (sag) coïncidant avec l'activation d'un courant entrant activé par une hyperpolarisation. Ce type de courant (I_h), porté par les canaux HCN, cause une chute de la résistance membranaire de ces neurones (**Fig. 7F**).

Les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des neurones DA *in vitro* sont similaires à celles décrites *in vivo* (Paladini and Tepper, 2016; Sanghera et al., 1984), excepté l'absence de l'activité irrégulière et de décharge en bouffée. L'activité spontanée régulière est d'ailleurs renforcé lorsque les neurones sont en présence de bloqueurs synaptiques. Ces observations indiquent que les activités irrégulières et en bouffées observées *in vivo* sont le fruit des afférences synaptiques des neurones DA.

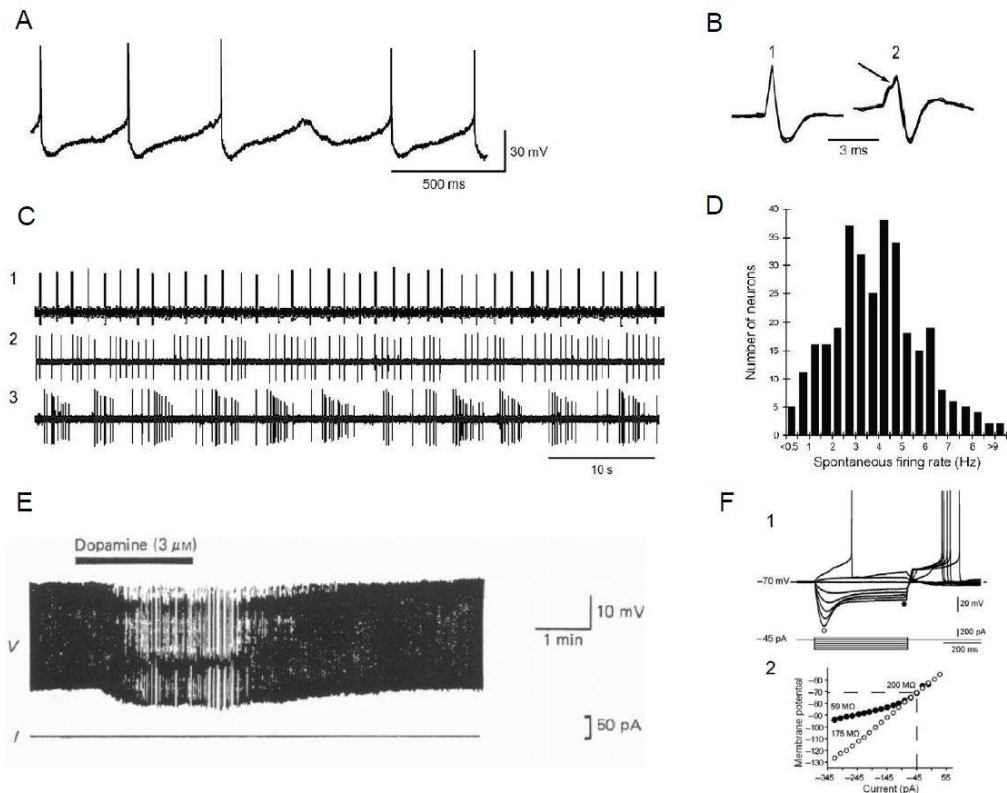


Figure 7 | Caractéristiques électrophysiologiques des neurones DA. **A :** Enregistrement intracellulaire *in vivo* d'une activité pacemaker régulière d'un neurone DA. Même si un potentiel d'action a échoué, il est intéressant de noter la présence d'une oscillation entre les deux potentiels d'actions, responsable de cette activité. **B :** Potentiels d'action extracellulaires biphasiques *in vivo*. La flèche en (2) indique la présence de deux potentiels d'action d'origine différente, due à la séparation nette entre le compartiment axonal et le somatodendritique. **C :** Enregistrements extracellulaires des trois modes de décharges de neurones DA : pacemaker régulier (1), décharge irrégulière (2) et décharge en bouffées (3). **D :** Histogramme de distribution de la fréquence de décharge des neurones DA *in vivo*. **E :** Enregistrement intracellulaire *in vitro* d'un neurone DA. L'application de dopamine 3 μM ralentit l'activité pacemaker du neurone par hyperpolarisation de ce dernier. **F :** Mise en évidence du sag par injection de courant hyperpolarisation. Les figures A-D et F sont adaptées de Paladini & Tepper, 2016 ; la figure E est tirée de Lacey et al., 1987.

En plus de ces propriétés, un marqueur a été mis en évidence pour distinguer les neurones DA des non-DA en *post-hoc* : le marquage de l'enzyme TH (Grace and Bunney, 1980). Cet enzyme convertit la tyrosine en l-dopa et est, par conséquent, essentiel à la biosynthèse de dopamine.

5.2. Décharges en bouffées

Les neurones DA possèdent la particularité de présenter deux modes de décharges, à savoir une activité spontanée et une décharge en bouffées transitoire. La première permet d'assurer une libération tonique de DA tandis que la deuxième permet une libération phasique de DA dans le striatum (Heien and Wightman, 2006). Plusieurs groupes ont montré que le mode de décharge en bouffées était impliqué dans les comportements d'exploration liée à la nouveauté, dans la motivation de l'apprentissage et dans le contrôle moteur (Howe and Dombeck, 2016; Schiemann et al., 2012; Schultz, 2007; Wise, 2004). Ce changement de mode de décharge est assuré par une modulation présynaptique des neurones DA, axée sur un équilibre entre des conductances médiées par les récepteurs GABA de type A (GABA_A) et par les récepteurs à l'acide *N*-méthyl-D-aspartique (NMDA) (Lobb et al., 2010).

Au niveau de la modulation glutamatergique, la génération de décharges en bouffées peut se faire par l'activation du NST et du NPP (Kitai et al., 1999). En effet, une étude a montré que l'activation du NPP permet le changement de mode de décharge en faveur des bouffées *in vitro* (Galtieri et al., 2017). Une autre étude a démontré qu'une activation des récepteurs synaptiques à l'acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque (AMPA) et NMDA par stimulation électrique des afférences des neurones DA dans la SNc permet également de générer une activité en bouffées *in vitro* (Blythe et al., 2007). Bien qu'il y ait une activation simultanée des récepteurs AMPA et NMDA, ces derniers sont la

clé du changement de mode de décharge. En effet, l'inactivation génétique des récepteurs NMDA *in vivo* empêchent la génération de bouffées et entraîne la disparition de comportement lié à la libération phasique de DA (Zweifel et al., 2009). De plus, l'activation de ces récepteurs par application de NMDA permet de générer une activité en bouffées et qui est stabilisée par le blocage des canaux K^+ activé par du Ca^{2+} de petite conductance (« small conductance calcium-activated potassium channels » ou SK) (Johnson et al., 1992; Seutin et al., 1993) (**Fig. 8A**). Les canaux SK jouent donc un rôle antagoniste dans la génération de décharges en bouffées. L'activation des récepteurs AMPA et NMDA permettent de fortement dépolariser la membrane pour recruter des canaux Na^+ (Na_v) voltage-dépendants et des canaux Ca_v pour surpasser l'hyperpolarisation générée par les canaux SK (Blythe et al., 2007). Une étude a par ailleurs montré qu'une mutation du canal SK3 le rendant complètement non fonctionnel facilite les neurones DA à décharger en bouffées (**Fig. 8B**) (Soden et al., 2013).

Au niveau de la modulation GABAergique, il a été montré que l'application de bicuculline, bloqueur de récepteurs $GABA_A$, au niveau du GPe diminue l'activité de la SNr, ce qui potentialise l'apparition des décharges en bouffées des neurones DA de la SNc (**Fig. 8C**). A l'inverse, l'application d'un agoniste de ces récepteurs, le muscimol, au niveau du GPe lève l'inhibition de la SNr ce qui régularise l'activité spontanée des neurones DA de la SNc (Tepper and Lee, 2007).

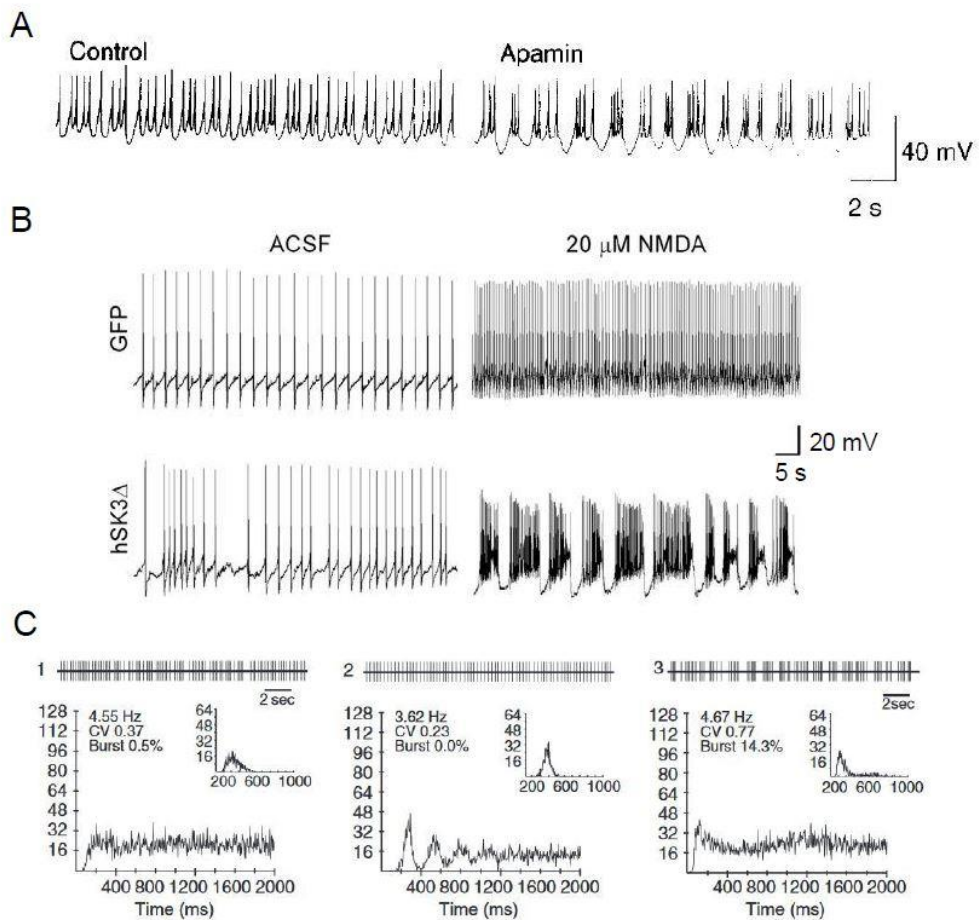


Figure 8 | Transition du mode de décharges des neurones DA. **A** : Enregistrements intracellulaires d'activité en bouffées en condition contrôle sous application de NMDA 30 μ M (panel de gauche) et suivi d'application d'apamine 300 nM (panel de droite) (Seutin et al., 1993). **B** : Enregistrements en patch-clamp avant (gauche) et après (droite) de NMDA. Le panel du bas (hSK3 Δ correspond au modèle mutant non fonctionnel SK3) (Soden et al., 2013). **C** : Corrélogrammes représentatifs d'un neurone DA de la SNc en condition contrôle (1), après micro-injection pallidale de muscimol (2), et après micro-injection pallidale de bicuculline (3) (Tepper & Lee, 2007).

5.3. Activité spontanée

Les neurones DA mésencéphaliques sont capables de générer des potentiels d'action même en présence de bloqueurs synaptiques qui permettent de les isoler pharmacologiquement. Cette observation suggère que le mécanisme interne sous-jacent à l'activité spontanée, dite *pacemaker*, de ces neurones est due à une combinaison de canaux ioniques. *Dans cette partie, les propriétés des potentiels d'action seront décrites avant de s'intéresser aux mécanismes qui sous-tendent la genèse de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc, ainsi que sa régulation, sa régularité et le maintien du potentiel pacemaker. Quelques comparaisons seront également faites avec les neurones DA de l'ATV, capables aussi de générer une activité pacemaker.*

5.3.1. Nature ionique du potentiel d'action

Un potentiel d'action se définit comme étant un changement rapide de la polarité membranaire. Le potentiel membranaire moyen d'un neurone DA de la SNc en l'absence d'activité spontanée, quand les canaux Na_v et Ca_v de type L sont bloqués, se situe aux alentours de -55 mV. Lorsque le seuil du potentiel d'action est atteint (~ -36 mV *in vitro* et ~ -41 mV *in vivo*), l'activation rapide des canaux Na_v suivie de celles des canaux Ca_v de type L, N (Ca_v 2.2) et P/Q (Ca_v 2.1) génère une dépolarisation abrupte du potentiel membranaire (Puopolo et al., 2007; Seutin and Engel, 2010) (**Fig. 9A**).

Il s'en suit une repolarisation de la membrane par l'activation de canaux K^+ voltage-dépendant (K_v) à rectification retardée, les canaux K_v1 et K_v2 et des canaux K^+ de grande conductance, dont l'activation est dépendante du voltage et de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre (ou canaux BK) (Kimm et al., 2015). Ces deux types de canaux ont des cinétiques

d'activation différentes (**Fig. 9B**), ce qui permet d'assurer la repolarisation lorsque l'un des deux est bloqué et donc renforce la robustesse des potentiels d'action des neurones DA de la SNc.

L'activation de ces canaux K^+ repolarise la membrane à une valeur en-dessous de la valeur moyenne du potentiel de membrane. C'est la phase d'hyperpolarisation. Durant ce bref instant (50-150 ms), il y a une activation des canaux SK qui sous-tendent la phase dite de posthyperpolarisation (et tout particulièrement la posthyperpolarisation moyenne, ou PHPm) (Wolfart et al., 2001). La durée et l'amplitude de la posthyperpolarisation permet de recruter les canaux Na_v et Ca_v en les faisant passer de l'état inactivé à fermé. *L'importance de la posthyperpolarisation et l'implication des canaux SK seront détaillées dans la section « régularité de l'activité spontanée ».*

5.3.2. Nature ionique de la genèse de l'activité spontanée

Le mécanisme exact qui sous-tend l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques est toujours débattu. Une hypothèse est que cette activité, dans les neurones DA de la SNc, est soutenue par des oscillations du potentiel de membrane qui permettent de recruter des canaux Na_v pour générer des potentiels d'action. Sur le plan expérimental, on peut observer de telles oscillations en présence de tétrodotoxine (TTX), un bloqueur de canaux Na_v (**Fig. 10A**). La nature ionique de ces oscillations a été associée à une activité de canaux Ca_v de type L car l'application de dihydropyridines (DHP) permet d'éteindre des oscillations (Guzman et al., 2009; Mercuri et al., 1994; Nedergaard et al., 1993; Puopolo et al., 2007; Putzier et al., 2009). De plus, ces oscillations spontanées sont soutenues par les canaux $Ca_v1.3$ en raison de leur activation à des potentiels plus hyperpolarisés,

leur inactivation lente et leur densité dans les neurones DA de la SNc (Philippart et al., 2016). Par ailleurs, les canaux $Ca_v 1.3$ transfèrent 40 % de la charge calcique totale lors de l'activité spontanée. Cependant, l'implication des oscillations calciques dans la genèse de l'activité pacemaker reste controversée. En effet, certains ont observé une diminution, voire l'inhibition de l'activité spontanée en présence de DHP (**Fig. 10B**) (Mercuri et al., 1994; Nedergaard et al., 1993; Puopolo et al., 2007; Putzier et al., 2009), tandis que d'autres ont observé une absence d'effet sur la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (**Fig. 10C**) (Chan et al., 2007; Drion et al., 2011; Guzman et al., 2010, 2009). Cet effet différentiel pourrait être expliqué par un effet non sélectif de la DHP utilisé, mais un modèle d'activité pacemaker a été proposé pour expliquer ces différentes observations (Drion et al., 2011). Dans ce modèle, la genèse de l'activité spontanée s'explique par une coopération entre les canaux Na_v et Ca_v , dont la contribution varie d'un neurone à l'autre. En effet, la dépolarisation lente entre deux potentiels d'action (ou intervalle interspike) des neurones DA de la SNc est soutenue par des courants (majoritairement) calciques et des courants sodiques (**Fig. 11A**) (Puopolo et al., 2007). L'effet différentiel du blocage de certains canaux peut également s'expliquer par le fait que les neurones DA mésencéphaliques constituent une population hétérogène en termes de propriétés physiologiques, pharmacologiques et moléculaires. *Cette hétérogénéité des neurones DA mésencéphaliques sera détaillée ultérieurement dans cette introduction.*

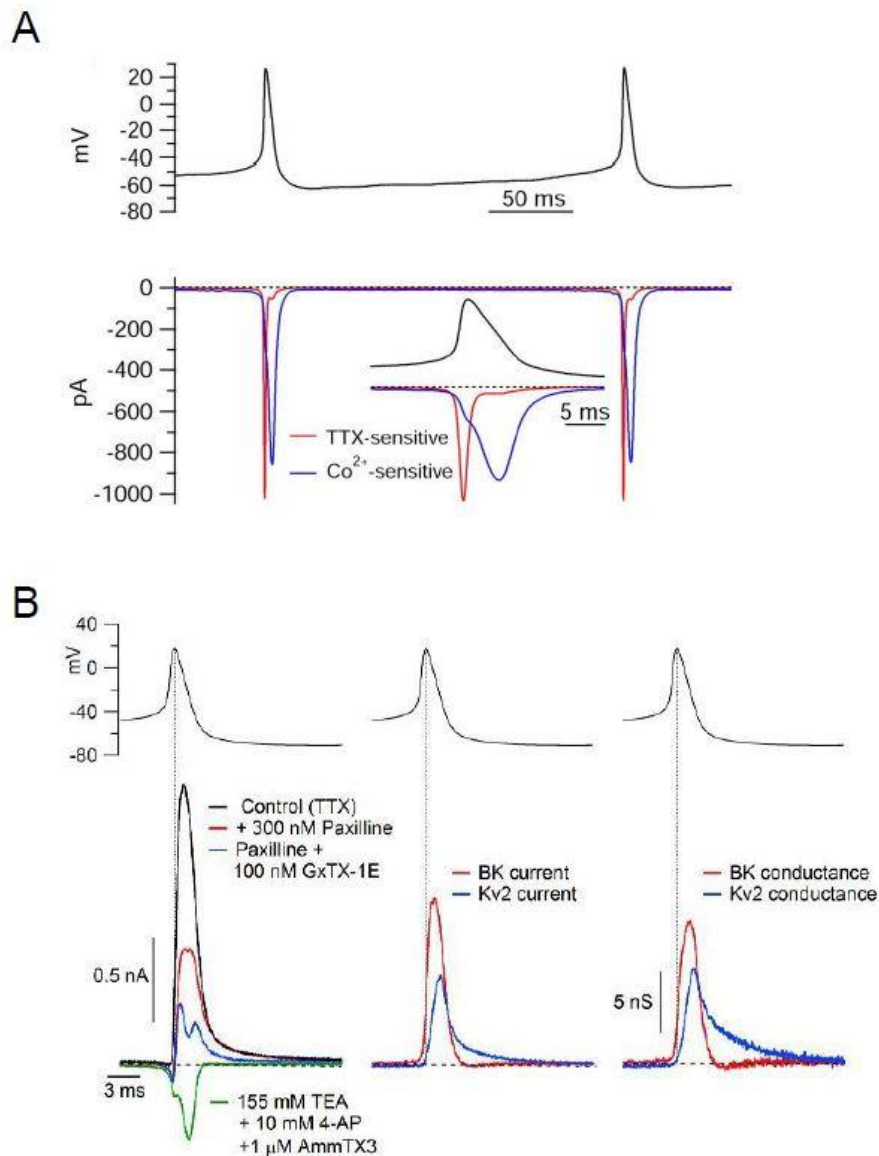


Figure 9 | Canaux ioniques impliqués dans la génération de potentiels d'action de neurones DA de la SNC. **A** : Enregistrements en potentiel d'action imposé des courants entrants responsable des potentiels d'action. Les courants Na^+ (rouge) ont été isolés par soustraction des courants avant et après application de TTX et les courants Ca^{2+} (bleu) ont été isolés par soustraction des courants avant et après remplacement équimolaire de Ca^{2+} par du Co^{2+} (Puopolo et al., 2007). **B** : Enregistrements en potentiel d'action imposé des courants sortants au sein de potentiels d'action. Les courants BK (rouge) montre une activation plus rapide et une conductance plus élevée que les courants Kv2 (bleu) (Kimm et al., 2015).

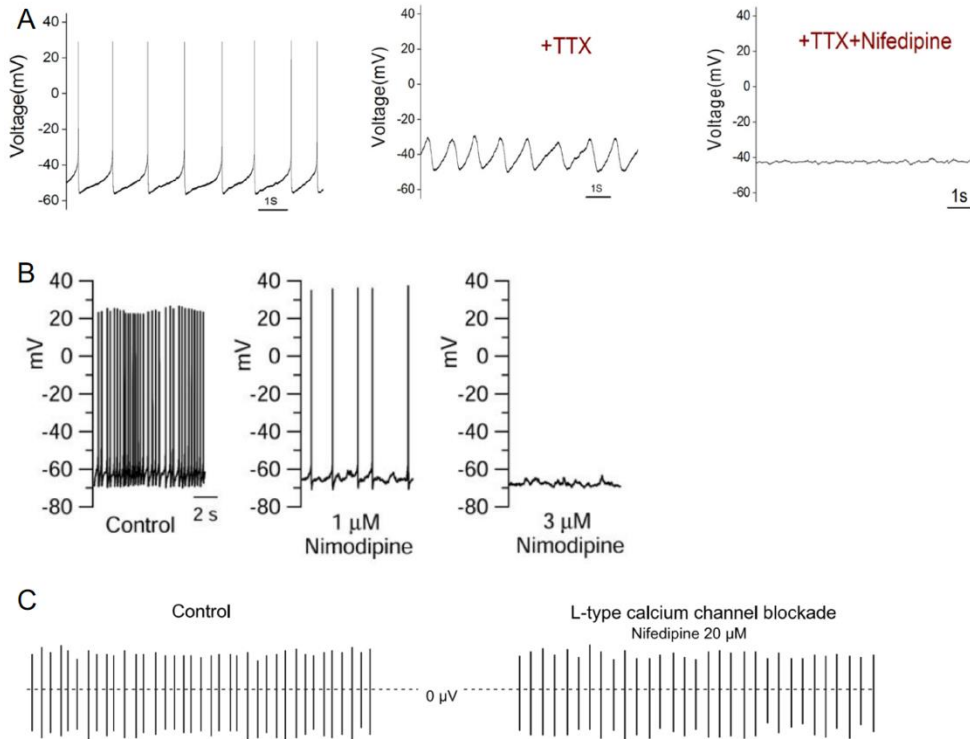


Figure 10 | Effets différentiels des dihydropyridines sur l'activité spontanée des neurones DA de la SNc. **A :** Oscillations calciques dans les neurones DA de la SNc. A gauche, il s'agit d'une trace d'activité autonome en courant-imposé. Au milieu, le blocage des canaux Na_v par la TTX permet de mettre en évidence ces oscillations calciques. A droite, l'application de nifédipine, une DHP, inhibe les oscillations calciques, permettant de confirmer l'implication des canaux Ca_v de type L (Sun et al., 2017). **B :** Enregistrements en courant-imposé de l'effet de la nimodipine, une autre DHP, sur l'activité rythmique. Ici, la nimodipine 1 μM ralentit la fréquence de décharge tandis qu'à 3 μM , elle l'inhibe (Puopolo et al., 2007). **C :** Enregistrements extracellulaires de l'activité spontanée d'un neurone DA. L'application d'une haute concentration de nifédipine n'impacte pas la fréquence de décharge (Drion et al., 2011).

Le mécanisme d'activité spontanée dans les neurones DA de l'ATV diffère de ceux de la SNc. En effet, l'application de TTX n'a pas révélé la présence d'oscillations calciques (Khaliq and Bean, 2010). La nature ionique du courant durant l'intervalle interspike est exclusivement lié au Na^+ , le Ca^{2+} n'étant impliqué que très faiblement (**Fig. 11B**). De plus, des expériences de substitution du Na^+ par de la *N*-Methyl-D-Glucamine (NMDG) ont révélé la présence d'un courant de fond sodique insensible à la TTX (**Fig. 11C**). Ce courant semble très présent dans les neurones DA de l'ATV, mais il n'a pas été observé dans l'ensemble des neurones DA de la SNc (Khaliq and Bean, 2010). *Ce courant de fuite sodique sera détaillé dans la partie consacré aux mécanismes de maintien du potentiel membranaire.*

5.3.3. Régulation de la fréquence de décharge par des courants potassiques transitoires

Les courants sodiques et calciques intervenant dans l'intervalle interspike permettent de soutenir une lente dépolarisation pour générer l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques. Cependant, cette dépolarisation entraîne une activation de canaux Kv transitoires qui interfère avec ces courants entrants, principalement les canaux $\text{K}_{v4.3}$. Ces canaux génèrent des courants transitoires, désigné I_A (**Fig. 12A**). Ces canaux jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité spontanée des neurones DA. En effet, il a été démontré que la densité des canaux $\text{K}_{v4.3}$ était inversement corrélé à la fréquence de décharge de ces neurones et que le blocage pharmacologique de ces canaux par l'AmmTx3 ou par l'heteropodatoxine, HpTX2 augmente de la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (**Fig. 12B**) (Amendola et al., 2012; Hahn et al., 2003; Liss et al., 2001).

Une étude a montré, dans un modèle de souris surexprimant l' α -synucléine, qu'il y avait une déplétion en canaux $K_v4.3$ corrélé à une augmentation croissante de la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (Subramaniam et al., 2014). Une autre a montré que l'antagonisme à long-terme des récepteurs D1 et D2 par l'halopéridol entraîne une augmentation de la densité des canaux $K_v4.3$ et donc diminution de la fréquence de décharge (Hahn et al., 2003).

Les canaux $K_v4.3$ permettent de réguler par l'activité spontanée des neurones DA de l'ATV, car l'intensité de I_A est proportionnelle à la vitesse de dépolarisation durant l'intervalle interspike (**Fig. 12C, D**) (Khaliq and Bean, 2008). Ainsi, I_A permet de contrebalancer la dépolarisation liée aux courants entrants et d'assurer une lente dépolarisation pour une activité autonome stable. Il est probable que les canaux $K_v4.3$ contrôlent la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc par le même mécanisme.

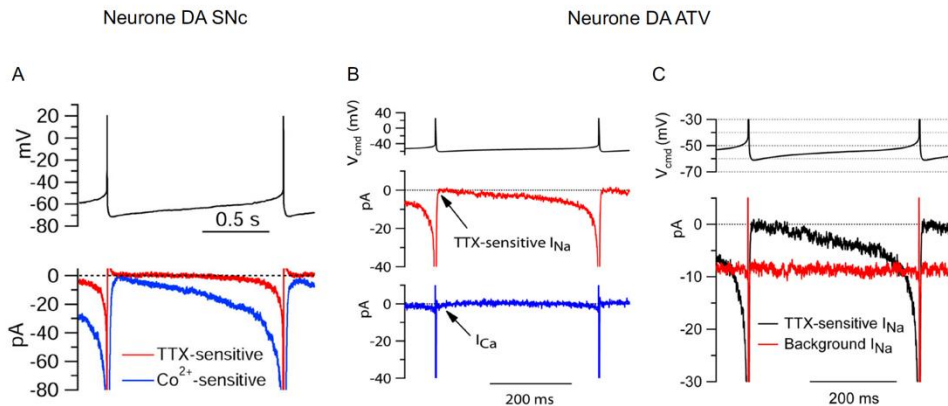


Figure 11 | Courants ioniques impliqués durant l'intervalle interspike des neurones DA mésencéphaliques. **A :** Enregistrement en potentiel d'action imposé d'un neurone DA de la SNc. En rouge est représenté le courant sodique sensible à la TTX et en bleu les courants calciques sensibles au cobalt. Ces traces montrent que le courant calcique est principalement impliqué dans l'intervalle interspike tandis que le courant sodique intervient dès la genèse d'un potentiel d'action (Puopolo et al., 2007). **B :** Enregistrement en potentiel d'action imposé d'un neurone DA de l'ATV. En rouge est représenté le courant sodique sensible à la TTX et en bleu les courants calciques. **C :** Enregistrement en potentiel d'action imposé d'un neurone DA de l'ATV. En noir est représenté le courant sodique sensible à la TTX et en rouge le courant de fond sodique. B et C montrent que les courants sodiques sont l'élément central pour générer une activité spontanée dans ces neurones (Khaliq and Bean, 2010).

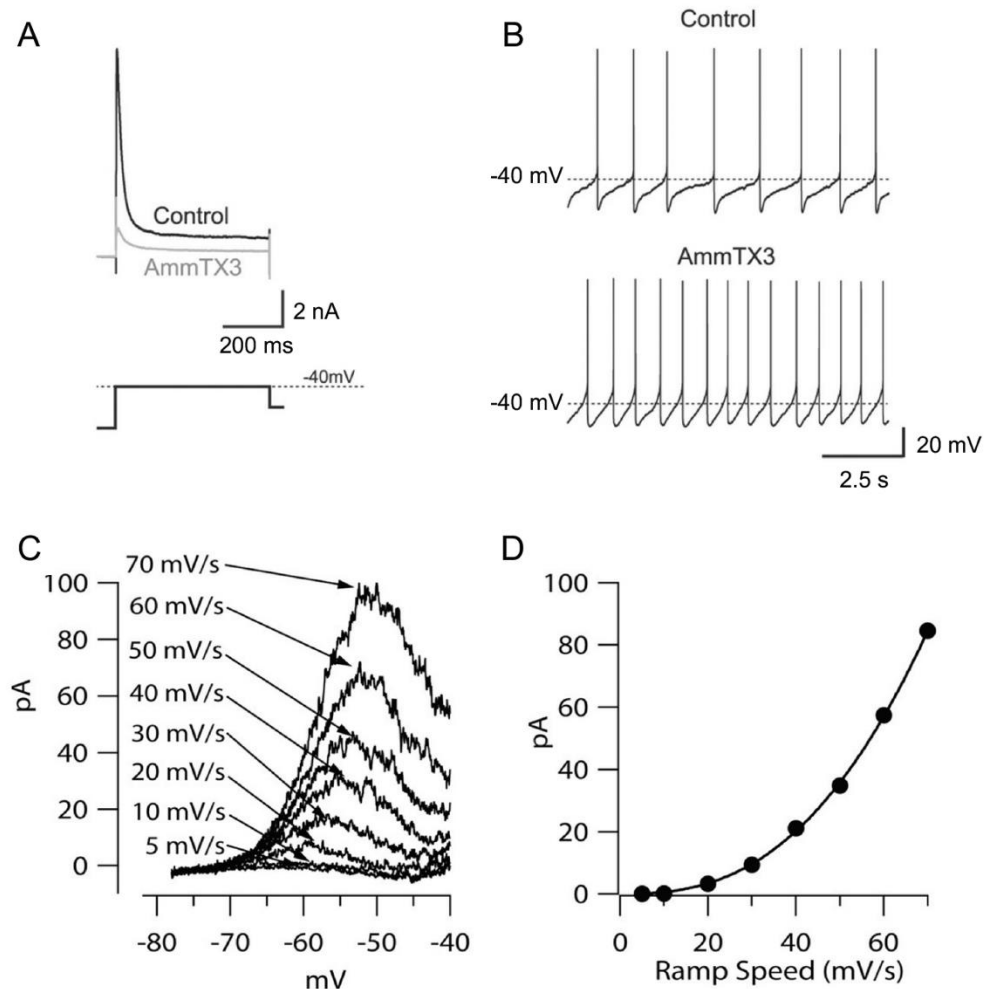


Figure 12 | Rôle des canaux K_v 4.3 dans la modulation de l'activité pacemaker des neurones DA mésencéphaliques. **A** : Enregistrement en potentiel imposé de I_A avant (noir) et après (gris) application d'AmmTX3. **B** : Enregistrement de l'activité pacemaker d'un neurone DA de la SNc avant (haut) et après (bas) application d'AmmTX3. Le blocage des canaux K_v 4.3 entraîne une augmentation de la fréquence de décharge (A et B sont tirés de Amendola et al, 2012). **C et D** : Corrélation positive entre l'intensité de I_A et la vitesse de dépolarisation dans un neurone DA de l'ATV (Khaliq and Bean, 2008).

5.3.4. Rôle des canaux SK dans la régularité de l'activité autonome

En plus d'avoir une fréquence de décharge lente, l'activité pacemaker des neurones est régulière et stable. En effet, le coefficient de variation (CV), paramètre qui définit la variation de la fréquence de décharge, des neurones DA mésencéphaliques est inférieur à 10 %. Le CV est dépendant de l'activité des récepteurs synaptiques et des canaux SK (de Vrind et al., 2016; Deignan et al., 2012; Ji et al., 2009; Waroux et al., 2005; Wolfart et al., 2001; Wolfart and Roeper, 2002). En effet, l'inhibition des canaux SK par l'apamine abolit la PHPm et entraîne une augmentation du CV, créant une irrégularité dans l'activité rythmique pouvant mener à une transition vers le mode de décharge en bouffées (**Fig. 13A, B**).

Les canaux SK sont des canaux K⁺ voltage-indépendant qui s'activent à la suite d'une élévation de la concentration en Ca²⁺ libre dans le milieu intracellulaire (Fakler and Adelman, 2008). Cette élévation peut être due à une ouverture de canaux calciques au niveau de la membrane plasmique ou à relargage des réserves intracellulaires (réticulum endoplasmique par exemple). Dans les neurones DA de la SNc, plusieurs études ont mis en évidence des couplages entre des canaux SK et des canaux Ca_v de type N (**Fig. 13C**) (de Vrind et al., 2016) et de type T (**Fig. 13D**) (Wolfart and Roeper, 2002) ainsi que des récepteurs NMDA dans l'ATV (**Fig. 13E**) (Soden et al., 2013). Le couplage avec les canaux Ca_v reste un sujet débattu. En effet, le couplage avec les Ca_v de type T n'a pas été observé dans cette étude exploratrice (de Vrind et al., 2016). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les animaux utilisés n'ont pas le même âge, car le profil d'expression des canaux ioniques dans les neurones DA de la SNc varie au cours du développement (Dufour et al., 2014b). On retrouve les trois isoformes des canaux SK dans le système nerveux central. Au niveau des

neurones DA mésencéphaliques, les canaux SK3 sont exprimés préférentiellement, bien qu'on retrouve également une expression de canaux SK2 (Dufour et al., 2014b; Wolfart et al., 2001). Il semblerait qu'il y ait une distribution spatiale distincte de ceux deux isoformes : les canaux SK2 seraient principalement exprimés au niveau des dendrites distales tandis que les canaux SK3 seraient préférentiellement exprimés dans le compartiment somatodendritique (Deignan et al., 2012).

Outre les canaux SK, les canaux K_{ATP} semblent également contribuer à la régularité de l'activité spontanée d'une sous-population de neurones DA de la SNc, dans la partie médiane de la SNc (Schiemann et al., 2012). L'activation de ces canaux semble avoir un effet favorable à la transition vers les décharges en bouffées induites par le NMDA, alors que l'activation des canaux SK produit l'effet inverse en stabilisant l'activité pacemaker des neurones DA.

5.3.5. Mécanisme de maintien du potentiel pacemaker

Afin d'assurer une activité autonome, la valeur du potentiel membranaire doit être proche du seuil d'activation de canaux Na_v et des Ca_v pour générer un potentiel d'action. Dans les neurones DA mésencéphaliques, la valeur du potentiel membranaire au repos, mesuré en bloquant les phénomènes oscillatoires, se trouve entre -55 et -50 mV. Lorsque du courant négatif est injecté, la membrane s'hyperpolarise et il s'en suit une rectification entrante qui s'intensifie en fonction du voltage (**Fig. 14**). Cette rectification correspond au « sag » et elle est médiée par l'activation de canaux dits *Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotide-gated* (HCN) qui sous-tendent I_h . Il existe quatre isoformes de canaux HCN (HCN1-4) et les neurones DA expriment les ARNm codant pour HCN2, HCN3 et HCN4

(Franz et al., 2000). Ils sont perméables aux cations monovalents de manière non sélective et sont principalement localisés au niveau des dendrites (Engel and Seutin, 2015; Franz et al., 2000). I_h est souvent décrit comme courant pacemaker car il participe à la genèse de l'activité spontanée dans diverses cellules rythmiques mais leur implication dans l'activité autonome des neurones DA reste débattue. En effet, l'application de Cs^+ , un bloqueur non-sélectif, n'altère pas la fréquence de décharge (Mercuri et al., 1995) alors que l'application d'un bloqueur spécifique, le ZD7288 entraîne une diminution de la fréquence de décharge sans jamais l'inhiber (**Fig. 14B-D**) (Neuhoff et al., 2002; Puopolo et al., 2007; Seutin et al., 2001). Ces observations peuvent être le résultat de l'interaction entre le ZD7288 avec des canaux Na_v plutôt que l'interaction entre le bloqueur et les canaux HCN (X. Wu et al., 2012).

Dès la levée du courant négatif, on observe un courant résiduel lié à la désactivation lente des canaux HCN, suivi d'une activation de canaux Ca_v de type T responsable d'un rebond calcique post-inhibiteur (**Fig. 14A**) (Evans et al., 2017). Cette propriété permet de rapidement restaurer l'activité spontanée. Cependant, le rebond calcique est souvent contrecarré par I_A qui retarde la génération de potentiels d'action. En effet, il a été montré que le blocage d' I_A par l'AmmTx3 raccourcit le délai du rebond post-inhibiteur (Amendola et al., 2012; Tarfa et al., 2017). Amendola et al. ont montré que le ratio des conductances I_h et I_A détermine le délai du rebond : lorsque que le rapport est en faveur de I_h , le délai est court mais si le rapport est inversé, alors le délai est long.

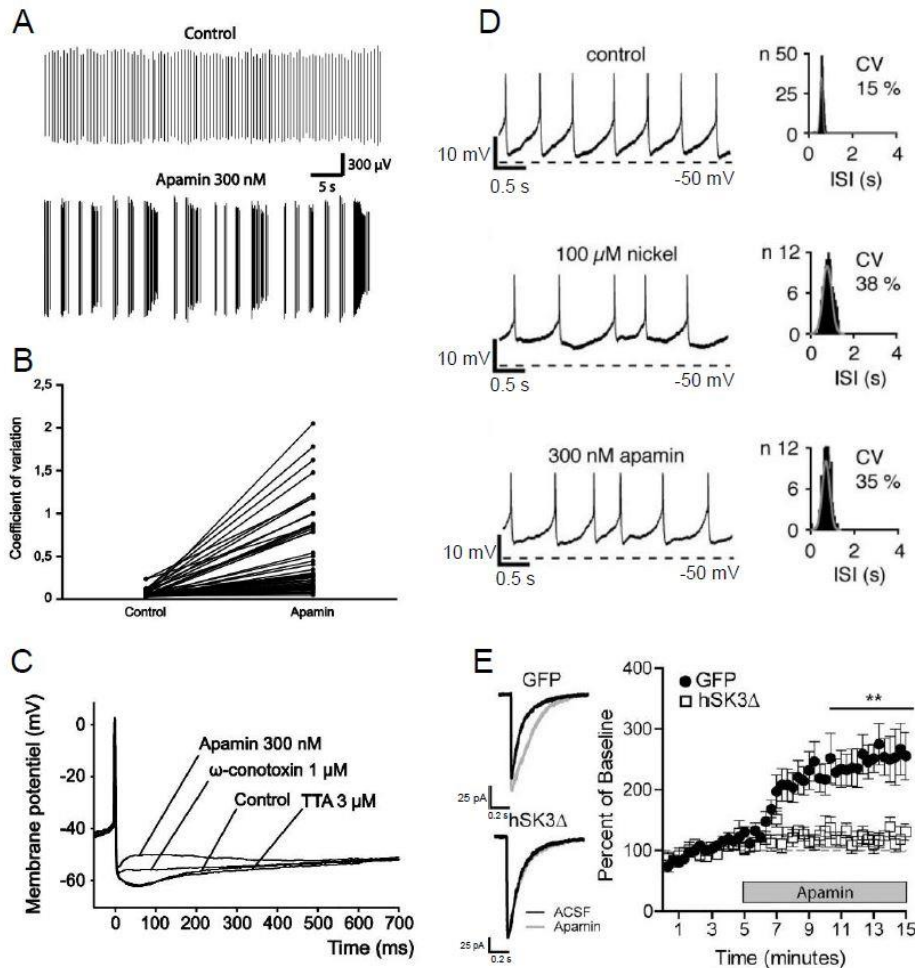


Figure 13 | Rôle des canaux SK dans le maintien du profil pacemaker des neurones DA mésencéphaliques. **A et B :** Enregistrement extracellulaire *in vivo*. L'application d'apamine entraîne une transition vers un mode de décharge en bouffée avec une augmentation du CV (de Vrind et al., 2016). **C :** Enregistrement intracellulaire d'un potentiel d'action. Le blocage des canaux Ca_v de type N par la ω -conotoxine réduit la PHPm, indiquant un couplage avec des canaux SK. Le blocage des canaux Ca_v de type T par la TTA n'a pas d'impact sur la PHPm (de Vrind et al., 2016). **D :** Enregistrement en patch-perforé de l'activité spontanée d'un neurone DA. L'application de Ni^+ , bloqueur non sélectif des canaux Ca_v de type T, montre une augmentation du CV avec une diminution de la PHPm. L'application d'apamine ne potentialise pas l'effet du Ni^+ , indiquant un couplage entre les canaux SK et les canaux Ca_v de type T (Wolfart and Roeper, 2002). **E :** Effet de l'apamine sur les courants médiés par les récepteurs NMDA synaptiques. Le blocage des canaux SK3 par l'apamine amplifie les courants synaptiques médiés par les récepteurs NMDA, mais cet effet est absent quand le canal n'est pas fonctionnel (ΔhSK3), indiquant un couplage entre les récepteurs NMDA et les canaux SK3 au niveau de la synapse (Soden et al., 2013).

Les canaux HCN ne sont pas les seuls acteurs dans le maintien d'un potentiel pacemaker dans les neurones. Khaliq et Bean ont mis en évidence la présence d'un courant de fond sodique dans les neurones DA de l'ATV qui joue le rôle de drive dépolarisant et permet de maintenir le potentiel de membrane aux alentours de -50 mV (Khaliq and Bean, 2010). Ils émettent l'hypothèse que ce courant pourrait être médié par des canaux de fuite sodiques, les canaux NALCN. Les canaux NALCN sont des canaux voltage-dépendant perméables au Na^+ , K^+ et Ca^{2+} et ils ne s'inactivent pas (Chua et al., 2020a). Ils sont exprimés de façon ubiquitaire dans le cerveau (Lee et al., 1999) et sont responsables fortement impliqués dans le potentiel de repos membranaire neuronal (Lu et al., 2007). Ils sont bloqués par le Gd^{3+} et ils sont insensibles à la TTX et au Cs^+ . L'absence de bloqueurs sélectifs de ces canaux a rendu leur étude compliquée, bien qu'un groupe semble avoir réussi à synthétiser le premier bloqueur sélectif de ces canaux (Hahn et al., 2020). Des modèles de souris dont l'expression du NALCN est déplété ont permis d'explorer leur fonction physiologique. Au niveau de la SNc, Philippart et Khaliq ont montré que lorsque ce canal est déplété dans les neurones, environ 70% des neurones DA ne présentaient plus une activité pacemaker (Philippart and Khaliq, 2018). Une faible injection constante de courant positif a permis de récupérer cette activité, ce qui confirme que le NALCN joue le rôle de drive dépolarisant dans les neurones DA.

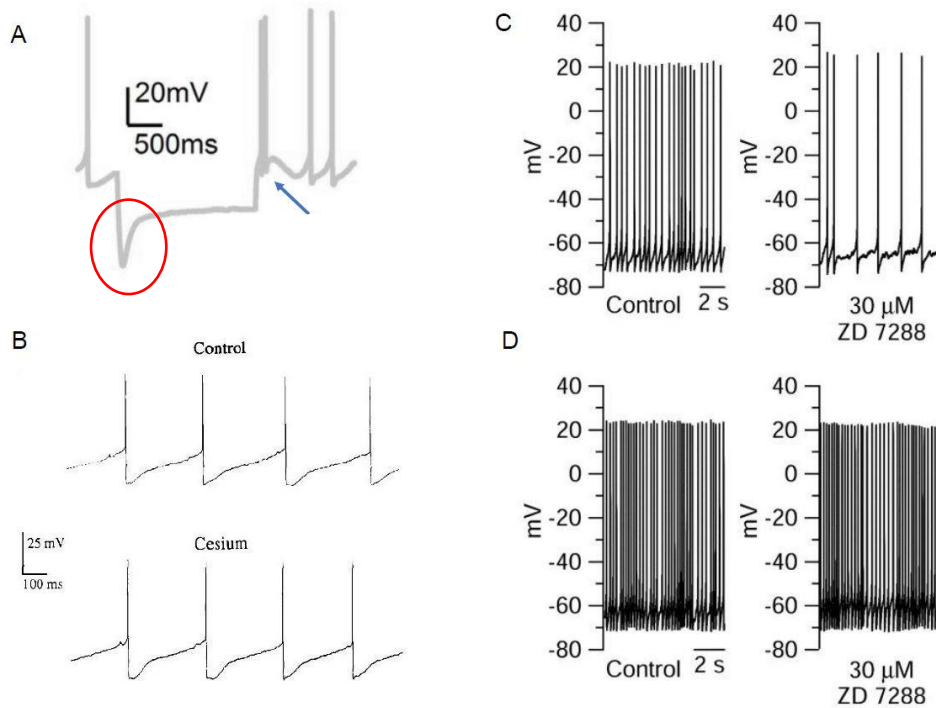


Figure 14 | Rôle des canaux HCN dans le maintien du potentiel pacemaker des neurones DA mésencéphaliques. **A :** Enregistrement en courant-imposé du sag. L'injection de courant négatif permet de mettre en évidence une réctification de la membrane (rouge) médiée par I_h . La flèche bleue indique le rebond calcique (Evans et al., 2017). **B :** L'application de Cs⁺ pour bloquer les canaux HCN ne modifie pas la fréquence de décharge (Mercuri et al., 1995). **C et D :** L'application de ZD 7288 produit des effets différentiels sur la fréquence de décharge allant d'une diminution de la fréquence de décharge (C) à aucun effet (D) (Puopolo et al., 2007).

6. Diversité des neurones dopaminergiques mésencéphaliques

6.1. Diversité développementale

Tous les neurones DA mésencéphaliques proviennent d'une population commune de progéniteurs localisé au sein du mésencéphale ventral et du diencephale caudal (Marin et al., 2005). Des molécules de signalisation telles que la protéine *Sonic hedgehog*, le facteur de croissance fibroblastique 8, et des acteurs de la voie Wnt jouent un rôle important dans l'expression des facteurs de transcriptions tels que *Lmx1a*, *Lmx1b*, *Otx2*, et *FoxA2* dans les progéniteurs de neurones DA mésencéphaliques (Arenas et al., 2015). La plupart des études ont permis de suivre l'évolution de ces facteurs de transcriptions, mais sans pouvoir faire une distinction claire entre les neurones DA de la SNc et de l'ATV. Toutefois, une étude a permis d'identifier deux marqueurs moléculaires discriminant : *Sox6* (SNc) et *Otx2* (ATV) (Panman et al., 2014). Au jour embryonnaire E11.5, les progéniteurs de neurones DA sont situés dans la zone progénitrice du mésencéphale ventrale. Les progéniteurs *Sox6*⁺ sont localisés dans la zone médiane tandis que les progéniteurs *Otx2*⁺ sont localisés dans la zone latérale. Vers E13.5, les deux populations de progéniteurs quittent la zone progénitrice et migrent ventralement. On voit également apparaître une ségrégation entre les deux populations : les neurones *Otx2*⁺ resteront dans la zone ventromédiane du mésencéphale pour former l'ATV tandis que les neurones *Sox6*⁺ continuent leur migration latéralement pour former la SNc. A E18.5, les deux populations sont clairement séparées et on peut distinguer les deux régions (Arenas et al., 2015; Panman et al., 2014) (**Fig.15**).

6.2. Diversité génétique

Bien que les neurones DA mésencéphaliques partagent un bon nombre de propriétés, il existe une grande hétérogénéité au sein de la SNc et de l'ATV. L'une des différences les plus évidentes est la sensibilité à la neurodégénérescence amenant aux symptômes typiques de la maladie de Parkinson. En effet, les neurones situés dans les régions ventrolatérales et caudales de la SNc sont plus enclins à dégénérer que ceux situés dans les régions rostromédiales et dorsales de la SNc (Michel et al., 2016). Cette sensibilité différentielle a été attribuée à l'expression de la calbindin, une protéine chélatrice du Ca^{2+} (Gerfen et al., 1985). Cependant, il a été montré que la déplétion de l'expression de cette protéine ne sensibilise pas les neurones DA à la dégénérescence et donc, la calbindin ne peut être utilisé que comme marqueur de neurones moins sensible (Airaksinen et al., 1997). Il a été aussi suggéré que le transporteur vésiculaire des monoamines type 2 (VMAT2) jouerait un rôle neuroprotecteur (Harrington et al., 1996; Liu et al., 1992).

D'un point de vue génétique, il s'agit d'une première dichotomie des neurones DA dans la SNc. Il faudra attendre quelques années pour voir apparaître des études pour caractériser la signature moléculaire des neurones DA mésencéphaliques. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence une signature moléculaire pour plusieurs sous-populations de neurones DA mésencéphaliques en se focalisant sur l'expression de divers facteurs tels que *Sox6*, *Aldh1a1*, *Vglut2*, *Otx2*, *Vgat* et *Vip* (**Fig. 16**) (Poulin et al., 2014, 2018; Saunders et al., 2018). Il a aussi été montré que les neurones DA *Aldh1a1*⁺ dans la SNc n'expriment pas la calbindin (Evans et al., 2017). L'*aldh1a1* est une aldéhyde déshydrogénase impliquée notamment dans la synthèse non conventionnelle de GABA (J. I. Kim et al., 2015).

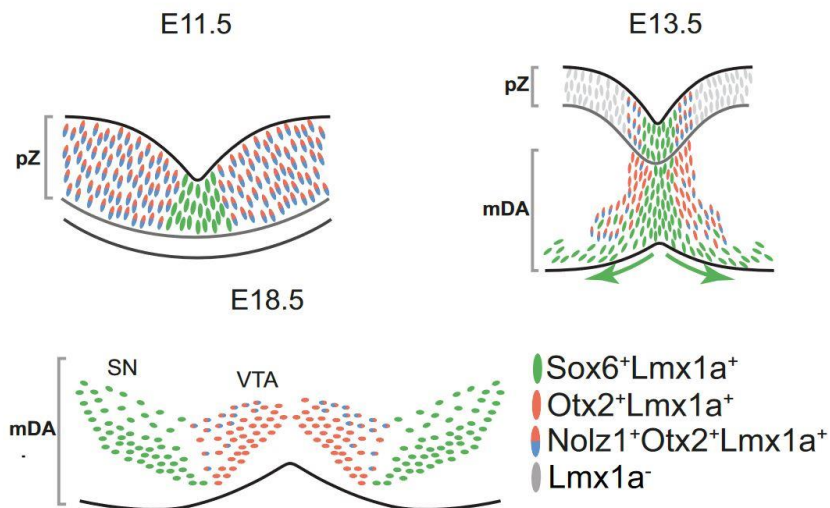


Figure 15 | Représentation de la distribution des progéniteurs de neurones DA à différents stades embryonnaires. pZ = *progenitor zone*, mDA = *midbrain dopamine neurons* (Panman et al., 2014).

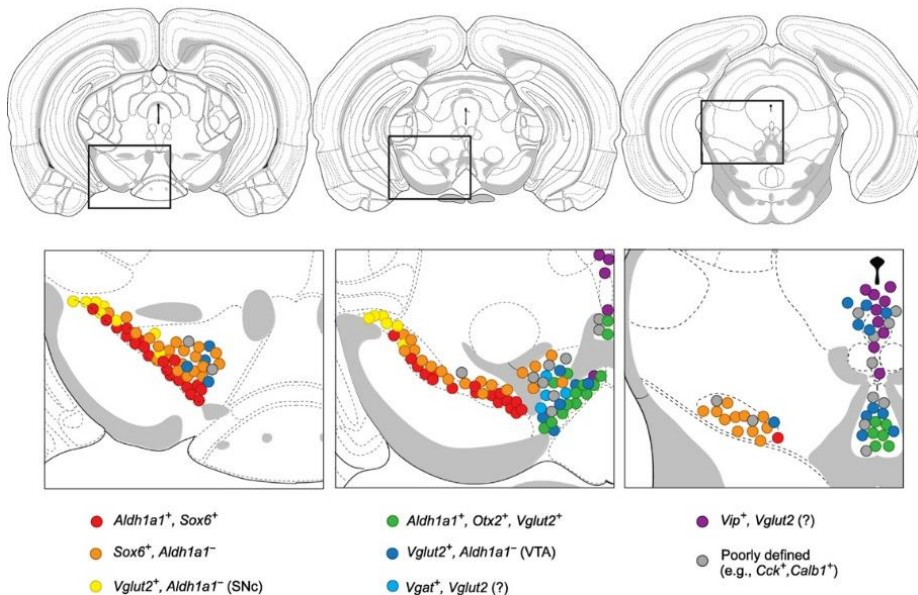


Figure 16 | Identification moléculaire des sous-populations de neurones DA mésencéphalique. Les indicateurs rouges, oranges et jaunes correspondent aux populations de la SNc tandis que les verts, bleus foncés et claires et les violets représentent les populations de l'ATV (Poulin et al., 2020).

6.3. Diversité électrophysiologique

La signature moléculaire des neurones DA mésencéphaliques a permis une classification de ces sous-populations. En plus de cette signature, plusieurs différences ont également été observées sur le plan de l'excitabilité de ces neurones et corrélées avec l'expression de ces facteurs génétiques. Par exemple, les neurones DA du tiers dorsal de l'ATV qui expriment la calbindin ont une fréquence de décharge bien plus élevée que le reste des neurones (Neuhoff et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré, chez la souris, que les neurones ayant des projections vers le cortex préfrontal déchargent plus rapidement que les autres et ils présentent des propriétés atypiques, dont une insensibilité à la dopamine et par l'absence de « sag » (**Fig. 17A, B**) (Lammel et al., 2008). Chez le rat, ce sont les neurones DA de l'ATV projetant vers l'amygdale qui sont insensibles aux agonistes des récepteurs D2, comme le quinpirole (Margolis et al., 2008).

De manière générale, certains paramètres varient en fonction d'un axe médio-latéral déterminé par le type de projection : les projections mésocorticales (médian), les projections mésolimbiques (intermédiaire) et les projections nigrostriées (latéral). La durée des potentiels d'action semble diminuer le long de cet axe, mais il est difficile d'affirmer cette corrélation au vu des différentes méthodologies utilisées (Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008). On observe également un gradient d'expression croissante de I_h selon l'axe médio-latéral (Neuhoff et al., 2002). Le potentiel de mi-activation de I_A est plus dépolarisé dans l'ATV que dans la SNc et donc, le délai du rebond s'allonge et l'intensité du « sag » augmente selon cet axe (Tarfa et al., 2017).

En plus d'une coopération entre I_h et I_A , le rebond est aussi influencé par les canaux Ca_v de type T. En effet, ces canaux portent le nom de « Low-Voltage-Activated » car ils s'activent à des potentiels plus hyperpolarisés

que les autres canaux Ca_v , classés dans la catégorie des « High-Voltage-Activated ». L'injection d'un courant négatif pour l'activation de I_h permet de les dé-activer et lorsque ce courant est levé, on observe une forte dépolarisation appelé « afterdepolarization », qui permet ainsi de restaurer rapidement l'activité spontanée (Evans et al., 2017). Evans et al. ont montré que les courants calciques médiés par les canaux Ca_v de type T étaient plus importants dans les neurones DA qui n'expriment pas la calbindin, donc *Aldh1a1*⁺ et que l'inhibition par la dopamine permet le recrutement de ces canaux, augmentant ainsi l'excitabilité de ces neurones (**Fig. 17C**) (Evans et al., 2017).

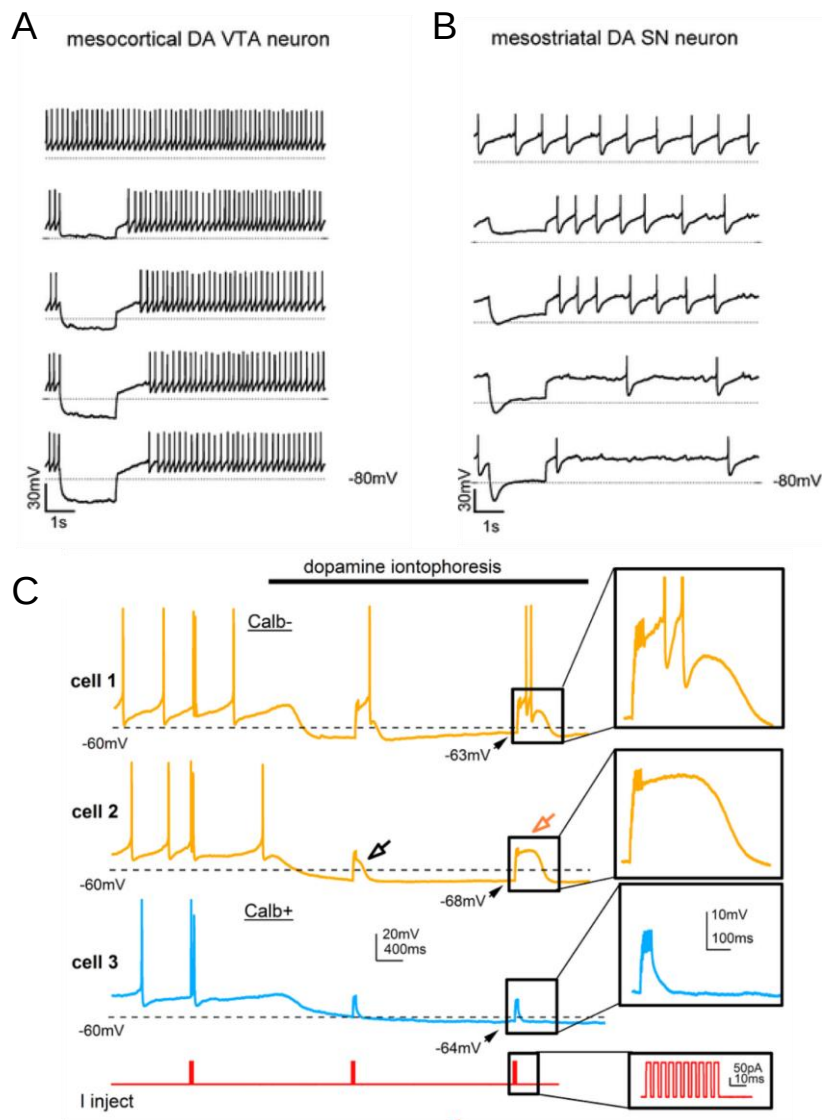


Figure 17 | Exemple de différences électrophysiologiques des neurones DA mésencéphalique. **A** : Enregistrement de potentiel suite à une injection de courant négatif, avec absence de « sag ». **B** : Enregistrement de potentiel suite à une injection de courant négatif, avec présence de « sag ». **C** : Effet d'une stimulation pendant l'application de dopamine sur des neurones DA exprimant ou non la calbindin (Calb). Dans les neurones DA Calb-, on note une plus large dépolarisation (cell 1 et cell 2) que dans les neurones Calb+ (cell 3) lorsqu'une stimulation est appliquée sous l'hyperpolarisation médiée par la DA sur les récepteurs D2. (A) et (B) sont adaptés de Lammel et al., 2008 ; (C) est tiré de Evans et al., 2017

7. Mécanismes compensatoires des neurones DA de la SNc au cours de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence des neurones DA de la région ventrolatérale. La perte de ces neurones entraîne une diminution de la DA dans le striatum. Les neurones survivant de la SNc compensent la déplétion striatale en DA par divers mécanismes, dont une augmentation de la fréquence de décharge, du métabolisme de la DA et le développement d'une hypersensibilité compensatoire à la DA. Cette hypersensibilité est également acquise par les MSNs du striatum (**Fig. 18A**) (Dunnett et al., 2005; Zigmond et al., 1990).

Le profil d'activité électrophysiologique des neurones DA de la SNc change considérablement quand les lésions sont très étendues. Une étude sur des rats traités avec de fortes concentrations de 6-OHDA a montré que les neurones survivants présentent une fréquence de décharge plus élevée et plus irrégulière lorsque le taux de déplétion de DA est supérieur à 96 % (Hollerman and Grace, 1990). De plus, une plus grande proportion de ces neurones présente un mode de décharge en bouffées pour augmenter le tonus dopaminergique (**Fig. 18B**) (Hollerman and Grace, 1990). A cela s'ajoute une augmentation de la résistance d'entrée, une diminution de la demi-durée du potentiel d'action ainsi qu'une surexpression de canaux dépolarisants (Branch et al., 2016). Ces compensations pour augmenter l'excitabilité des neurones DA survivants pour pallier la perte massive de DA ne sont pas optimales, car elles ne sont pas transitoires et donc elles mènent à un phénomène d'inhibition de l'activité spontanée par dépolarisation, empêchant la dé-activation des canaux Na_v nécessaire pour générer des potentiels d'action.

Cependant, les effets d'une déplétion en DA sur le profil électrophysiologique des neurones ont été remis en question. En effet, une étude sur un modèle de souris déficient en DA montre une absence de décharge en bouffées *in vivo* qui est restauré par administration de L-dopa (Paladini et al., 2003) tandis qu'une autre étude montre, dans le même modèle, que le profil électrophysiologique des neurones DA de la SNc n'est pas altéré (présence d'activité autonome régulière, irrégulier et activité en bouffées) (Robinson et al., 2004). Néanmoins, le développement d'une hypersensibilité des récepteurs D2 dans les neurones DA de la SNc et les MSNs du striatum (ainsi que les récepteurs D1) (Robinson et al., 2004). Le tonus dopaminergique permet donc de moduler l'excitabilité neuronale des neurones DA de la SNc. La DA contribue énormément à l'homéostasie de ces neurones.

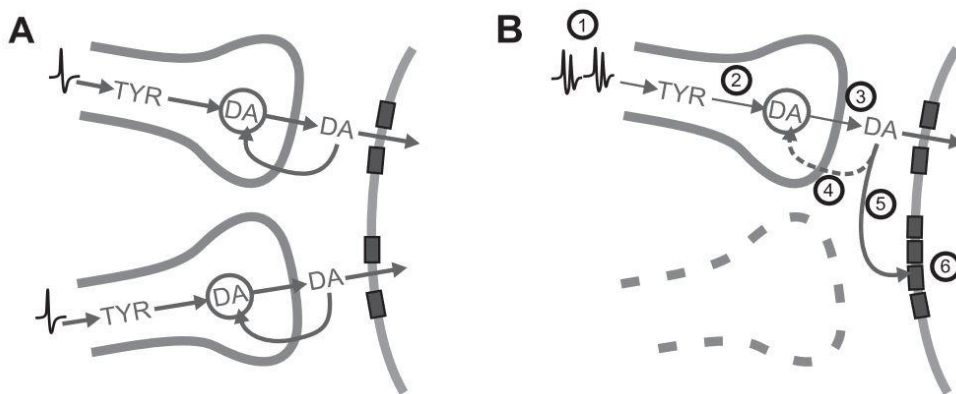


Figure 18 | Mécanismes hypothétiques de compensation pré- et post-synaptique lors de lésions partielles des neurones DA de la SNc. A : Illustration schématique de deux terminaisons DA intactes sur un MSN post-synaptique. B : Compensations suivant une lésion partielle, comprenant (1) une augmentation de la fréquence de décharge, (2) une augmentation de la synthèse de DA, (3) une augmentation de libération de DA dans la fente synaptique, (4) une diminution de la recapture de DA, (5) une diffusion de la DA vers les synapses lésées et (6) une hypersensibilité des récepteurs post-synaptiques (Dunnett et al., 2005).

8. Objectif du projet

L'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques joue un rôle très important dans le maintien du tonus dopaminergique afin d'assurer certaines fonctions motrices et comportementales. Dans certains cas, cette activité spontanée peut engendrer un stress métabolique pour les neurones DA de la SNc pour assurer l'homéostasie du Ca^{2+} , ce qui peut mener au développement de la maladie de Parkinson. L'étude de cette activité, en plus de l'aspect fondamental, a un intérêt thérapeutique dans les pathologies perturbant les différents aspects régulatoires de la DA.

Khaliq et Bean ont mesuré le flux net d'ion durant l'intervalle interspike à partir de trajectoires moyennes de voltage de neurones DA de l'ATV (Khaliq and Bean, 2008). Sur base de ces calculs, ils ont réussi à mettre en évidence un courant entrant entre 1 et 6 pA. Ce courant pourrait être la clé de la coordination du recrutement des canaux ioniques nécessaires à la genèse de l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques. Son origine n'a pas encore été déterminée, mais un courant de telle amplitude peut avoir trois substrats :

- 1) Une petite population de canaux voltage-dépendants, dont la conductance unitaire se situe entre 1 et 150 pS. Cependant, au vu des probabilités d'ouvertures variables, cette hypothèse ne concorde pas avec la régularité extrême de ce profil de décharge. En effet, si ce courant était porté par un petit nombre de canaux voltage-dépendants, l'activité autonome serait forcément instable.
- 2) Une annulation quasi-parfaite de courants entrants et sortants due à la coopérativité de certains canaux (dont Na_v , Ca_v , K_v 4.3 et HCN), responsable de la régularité de l'activité spontanée. Expérimentalement, le blocage de l'un ou plusieurs de ces canaux

ne permet pas d'éteindre totalement l'activité oscillatoire de ces neurones, à l'exception d'un blocage simultané des canaux Na_v et Ca_v . Nous vérifierons l'effet du blocage de certains de ces canaux au cours de ce travail.

- 3) Une grande population de canaux ioniques non-conventionnels de très faible conductance ($< 1 \text{ pS}$). Parmi ces canaux, nous avons investigué les courants dit de « gating-pore ». *Ils seront décrits dans les résultats relatifs à ces courants.* Cette hypothèse est en accord avec le fait que l'activité rythmique est régulière et stable. Nous testerons l'effet du guanidinium, ion très permeant à travers les gating pores, sur l'activité spontanée des neurones DA, ainsi qu'un bloqueur de ces pores, le 1-(2,4-xylyl)guanidine.

Grâce à ce projet, nous espérons pouvoir apporter des informations sur le mécanisme exact de la genèse de l'activité spontanée de ces neurones. Par ailleurs, nous espérons également que les résultats obtenus pourront s'étendre à diverses populations cellulaires présentant un profil de décharge semblable aux neurones DA mésencéphaliques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Approbation éthique

L'ensemble des expériences a été réalisé en respectant les directives institutionnelles (protocole 1210, Commission d'Éthique Animale, Université de Liège), nationales (Comité déontologique) et de l'Union Européenne (2010/63/UE) concernant l'expérimentation animale.

2. Edition de ARN messenger

Pour mettre en évidence la présence de courants de « gating pore » ou I_w (Jiang et al., 2018; Sokolov et al., 2007) de neurones DA, des rats Wistar adultes ont été anesthésiés et décapités suivant le protocole décrit plus en détails dans la partie 4.1 de ce chapitre. Après l'obtention de tranches de cerveau dans le plan coronal contenant la SNc, ces dernières ont été isolées par microdissection et placées dans de l'azote liquide pour les conserver. Le cortex a également été isolé de la même façon, afin d'avoir une population de neurones majoritairement non pacemaker.

Des expériences de validations ont été réalisées au préalable afin de vérifier la qualité des microdissections. Les tranches ont été fixées dans du paraformaldéhyde (PFA 4%), lavée trois fois avec du PBS et incubées avec un anticorps primaire monoclonal dirigé contre la TH (souris, #22941, ImmunoStar) pendant 24 heures, sous agitateur, à température ambiante. Après rinçages au PBS, les tranches ont de nouveau été incubées pendant 24 heures à 4°C avec un anticorps secondaire (chèvre anti-souris-Alexa 568, Life Technologies). Par la suite, les tranches ont été montées sur une lame de microscope avec le milieu de montage ProLong Diamond Antifade (Life Technologies) et la fluorescence a été observée avec un microscope

confocal Olympus (FV1000) en collaboration avec la plateforme GIGA-Imaging (**Fig. 19**).

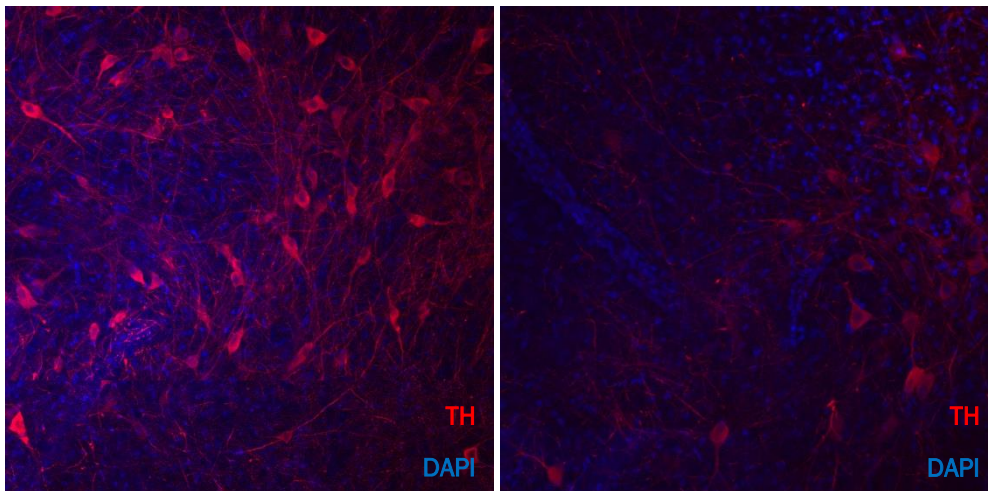


Figure 19 | Validation de la méthode de microdissection de la SNc. Les noyaux sont marqués en bleu et la tyrosine hydroxylase (TH) en rouge, validant l'identité dopaminergique des neurones.

Etant donné que les courants ω se situent au niveau du 4^e segment transmembranaire (S4) des différents domaines des canaux ioniques suite à une substitution d'une arginine en glycine (Sokolov et al., 2007), la partie codante de l'ARN messager pour le S4 des canaux ioniques voltage-dépendant suivants a été amplifiée par RT-PCR : $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.2$, $\text{K}_v4.3$, HCN3 et HCN4. Les amorces utilisées pour l'amplification sont reprises dans l'**annexe 1**. Les amplicons obtenus ont ensuite été séquencés en collaboration avec la plateforme GIGA Genomics. Les données ont été analysées avec le programme Integrative Genomics Viewer (IGV v2.4.14, Californie, Etats-Unis).

3. Génotypage des souris DAT^{-/-}

Des souris C57BL/6J, wild-type (WT / DAT^{+/+}) et dont le gène du DAT a été invalidé (DAT^{+/-} ou DAT^{-/-}) ont été fournies par le Pr. Marc G. Caron de l'école de médecine de l'université Duke (Durham, Caroline du Nord, Etats-Unis) (Giros et al., 1996; Jones et al., 1999). Bien qu'un modèle de rats DAT^{-/-} ait commencé à être décrit depuis 2018 (Adinolfi et al., 2019, 2018; Cinque et al., 2018; Leo et al., 2018), l'utilisation de souris a été préférée en raison d'une description plus exhaustive du modèle dans la littérature. Pour identifier les souris utilisées, une biopsie de la queue a été réalisée après décapitation pour une extraction de l'ADN et une amplification des gènes permettant de distinguer les DAT^{+/+} des DAT^{-/-}, à savoir le gène du DAT (DAT^{+/+} et DAT^{+/-}) et de la néomycine (DAT^{+/-} et DAT^{-/-}), exprimé suite aux manipulations géniques (**Fig. 20**). En effet, le gène du codant pour le DAT a été excisé et remplacé par un construit pD7H15/NEO, permettant l'expression de la néomycine dans les neurones supposés exprimés le DAT (Giros et al., 1996). Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR sont les suivantes : DAT : 5'tggagctcatcttgggtcaag3'; néomycine : : 5'tggctacccgtgatattgc3'; antisens pour les deux gènes : 5'tacaccatgccctgcacaca3'. Outre le génotypage, il est possible d'identifier la population DAT^{-/-} sur base de son phénotype comportemental. En effet, ces souris sont en hyperdopaminergie et présentent un comportement hyperactif, semblable à celui observé lors de la prise de cocaïne (Gainetdinov et al., 2001).

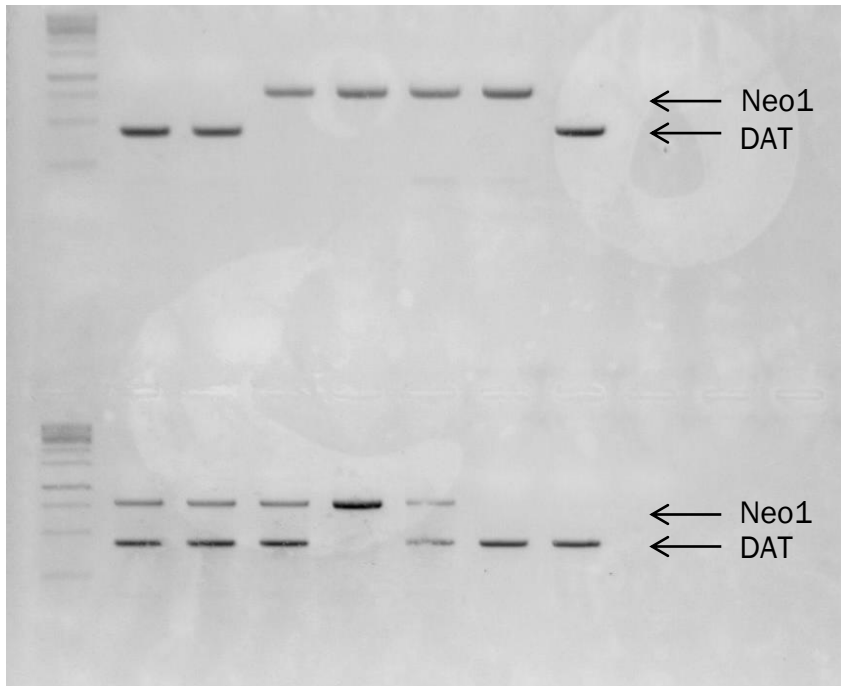


Figure 20 | Identification par génotypage des souris transgéniques. La bande unique de la néomycine (Neo1) correspond aux souris $DAT^{-/-}$, la bande unique du DAT correspond aux souris $DAT^{+/+}$ et la coïncidence des deux bandes correspond aux souris $DAT^{+/-}$.

4. Enregistrements extracellulaires

4.1. Modèles animaux et préparation des tranches de cerveaux

Les enregistrements extracellulaires ont été réalisés sur des tranches de cerveaux prélevés chez des rats Wistar âgés de 6 à 8 semaines, mâles et femelles, ainsi que des souris adultes C57BL/6J (DAT^{+/+} et DAT^{-/-}), ont également été utilisées. Ces animaux ont été anesthésiés avec de l'hydrate de chloral et oxygénés avec un mélange du carbogène (95 % O₂ / 5 % CO₂) avant d'être décapités. Le cerveau a ensuite été prélevé rapidement de la boîte crânienne sur une boîte de Petri contenant du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) de température comprise en 0°C et 4°C, pour réduire l'activité métabolique des neurones ainsi que le stress lié à la décapitation, et oxygéné avec du carbogène. Elle a la composition suivante (en mM) : 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂ et 25 D-glucose (pH : 7.3 - 7.4 en présence du carbogène ; osmolarité : ~ 320 mOsmol/l). La face supérieure du cerveau est collée sur un support qui sera fixé sur le vibratome pour réaliser des tranches de cerveaux de 300 µm d'épaisseur dans le plan horizontal. Ce plan anatomique est préféré au plan coronal car la SNc est localisée précisément grâce aux noyaux terminaux médians du tractus optique accessoire. Une fois que la tranche contenant la SNc est obtenue, elle est placée dans la chambre d'enregistrement et superfusée avec du LCRa à 34°C pendant 30 à 60 minutes avant de commencer l'expérience. Cette période d'incubation est nécessaire pour relancer l'activité métabolique des neurones et leur permettre de récupérer du stress lié à toute la procédure. Toutes ces étapes doivent être réalisées rapidement et délicatement afin de garantir

un certain niveau de survie neuronal et limiter les dégâts liés à l'hypoxie et la réalisation des tranches.

4.2. Identification des neurones dopaminergiques

Les enregistrements extracellulaires permettent d'étudier l'activité électrique des neurones sans modifier leur milieu intracellulaire. Cette technique est intéressante pour étudier l'effet de différents agents pharmacologiques sur l'activité pacemaker des neurones DA. Ces neurones ont été identifiés par leur fréquence de décharge lente (0.5 à 8 Hz) et régulière (moins de 10 % de variation dans la fréquence de décharge sur 5 minutes). L'ajout de dopamine (100 μ M) ou de BHT920 (50 nM), un agoniste des récepteurs D2, inhibe l'activité spontanée des neurones DA par l'activation des récepteurs D2 et a permis de confirmer l'identité dopaminergique des neurones.

5. Enregistrements en *patch-clamp*

5.1. Modèles animaux et préparation des tranches de cerveaux

Tout comme les enregistrements extracellulaires, des rats Wistar et des souris C57BL/6J (DAT^{+/+} et DAT^{-/-}) ont été utilisées, la seule différence étant que les animaux sont juvéniles (entre 16 et 25 jours postnatal). Des études ont montré que les neurones dopaminergiques de la SNc ont atteint leur maturité électrophysiologique à cet âge (Dufour et al., 2014b; Tepper et al., 1991, 1994). Dès lors, l'utilisation d'animaux juvéniles a été préféré, car on peut plus facilement visualiser les neurones DA dans la SNc. Ces animaux ont été oxygénés avant d'être anesthésiés avec de l'isoflurane et décapités. La méthode d'extraction est identique à celle utilisée pour les enregistrements extracellulaires. Une fois le cerveau récupéré, la zone

préfrontale est excisée et le cerveau est collé sur le support du vibratome (Leica VT-1200, Nussloch, Allemagne) via la zone excisée. Ainsi, on peut réaliser des tranches de 300 μm d'épaisseur dans le plan coronal en commençant du côté caudal. Le cervelet est également excisé pour accéder plus rapidement à la zone contenant la SNc. Les tranches sont placées dans une chambre de réserve contenant du LCRa et incubées à 34°C pendant 45 minutes. Les tranches sont ensuite stockées à température ambiante en attendant d'être utilisées pour les enregistrements.

5.2. Configuration des enregistrements

5.2.1. Cellule-attachée

Pour cette configuration, réalisée en collaboration avec le Pr. Jochen Roeper (Goethe Université de Francfort, Allemagne), des souris C57BL/6J WT ont été utilisées. Les tranches ont été placées dans la chambre d'enregistrement et ont été superfusées continuellement avec du LCRa oxygéné et maintenu à $\pm 35^\circ\text{C}$. Les pipettes d'enregistrements en borosilicate (GC150TF-10, Harvard Apparatus, Kent, Royaume-Uni) ont été étirées (DMZ Universal puller, Zeitz Instruments GmbH, Munich, Allemagne) pour avoir une résistance de 4-6 $\text{M}\Omega$. Les neurones ont été visualisés sur un microscope vertical (Axioskop 2, FSplus, Zeiss, Jena, Allemagne).

Dès que la tranche est placée dans la chambre d'enregistrement et le neurone identifié, la pipette est plongée dans la tranche pour atteindre la membrane du soma. Une fois le contact établi, une brève aspiration de la membrane est effectuée pour atteindre la configuration cellule-attachée et enregistrer des potentiels d'actions. Tout comme les enregistrements extracellulaires, cette approche offre l'avantage de ne pas changer la

composition physiologique du cytosol. Après les enregistrements, la neurobiotine a été diffusée dans le neurone en passant par la configuration cellule-entière et un marquage *posthoc* de la TH a été réalisé. Le co-marquage neurobiotine – TH confirme la nature dopaminergique du neurone enregistré.

5.2.2. Cellule-entière

Les tranches ont été placées dans la chambre d'enregistrement dans laquelle elles ont été superfusées continuellement avec du LCRa oxygéné et maintenues à $\pm 35^{\circ}\text{C}$ à l'aide d'un thermostat (*Temperaturcontroller V*, Luigs & Neumann, Allemagne). Les neurones ont été observés au moyen d'un microscope (Axio Examiner.A1, Zeiss, Allemagne), équipé d'un système optique à contraste différentiel de Dodt avec un filtre à infrarouge placé après la source de lumière (*infrared-Dodt gradient contrast* (IR-DGC)) et équipé d'une caméra (CCD) comprenant un dispositif à transfert de charge (C7500-51, Hammamatsu, Japon). Un objectif 10x (Zeiss, Allemagne) a permis de localiser la SNc et un objectif à immersion 40x (Zeiss, Allemagne) a permis de visualiser les neurones DA sur un moniteur noir et blanc (SSM-121, Sony, Japon). Les pipettes en borosilicate (Hilgenberg, Masfeld, Allemagne) utilisées pour les enregistrements ont été fabriquées à l'aide d'une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instruments, Novato, CA, Etats-Unis). Elles ont ensuite été remplies avec une solution de composition ionique semblable au cytosol, nommée solution intracellulaire. La plupart des enregistrements ont été réalisés avec une solution à base de potassium gluconate de composition suivante (en mM) : 125 K-gluconate, 20 KCl, 4 MgATP, 10 Na₂-phosphocréatine, 0.3 Na₂GTP, 10 HEPES, 0.5 EGTA (pH = 7.3 ; osmolarité : ~ 305 mOsmol/l).

Une fois la pipette prête, elle est montée sur un convertisseur I-V contenant le fil d'Ag/AgCl₂ par lequel les enregistrements seront réalisés. Ce fil est

immergé dans la solution intracellulaire et la résistance de la pipette est comprise entre 2 et 5 M Ω . Le convertisseur est attaché à un micromanipulateur relié à une table de commande (Remote control SM7 / Keypad SM7, Luigs & Neumann, Allemagne). Une pression positive d'environ 65 mbar est appliquée pour faciliter la traversée de la pipette à travers la tranche pour atteindre le neurone. Dès que la pipette touche le soma du neurone, la pression positive est relâchée et, par une faible pression négative, la membrane du soma est aspirée via la pointe de la pipette. La résistance augmente pour atteindre une valeur qui dépasse 1 G Ω , reflet du scellement de la pipette par la bicouche lipidique. C'est ce qu'on appelle le « *Gigaseal* ». De brèves fortes dépressions sont ensuite appliquées afin de rompre la membrane à l'intérieur de la pipette, permettant à la solution intracellulaire de dialyser le cytosol. On est donc en configuration « cellule entière » (ou « *whole-cell* »). Cette configuration est idéale pour mesurer l'ensemble des courants ioniques du neurone. Le neurone répond alors à la loi d'Ohm :

$$V_m = R_m \times I$$

où V_m est le potentiel membrane (mV), R_m la résistance membranaire (M Ω) et I le courant injecté (nA). Le patch-clamp permet de contrôler soit le potentiel (potentiel imposé ou « *voltage-clamp* ») pour enregistrer des courants, soit le courant (courant imposé ou « *current-clamp* ») pour monitorer des changements de potentiels et enregistrer des potentiels d'action. La R_m est un paramètre qui est intrinsèque à la cellule et dépend de la proportion de canaux de fuites exprimés au niveau de la membrane. On ne peut contrôler ce paramètre.

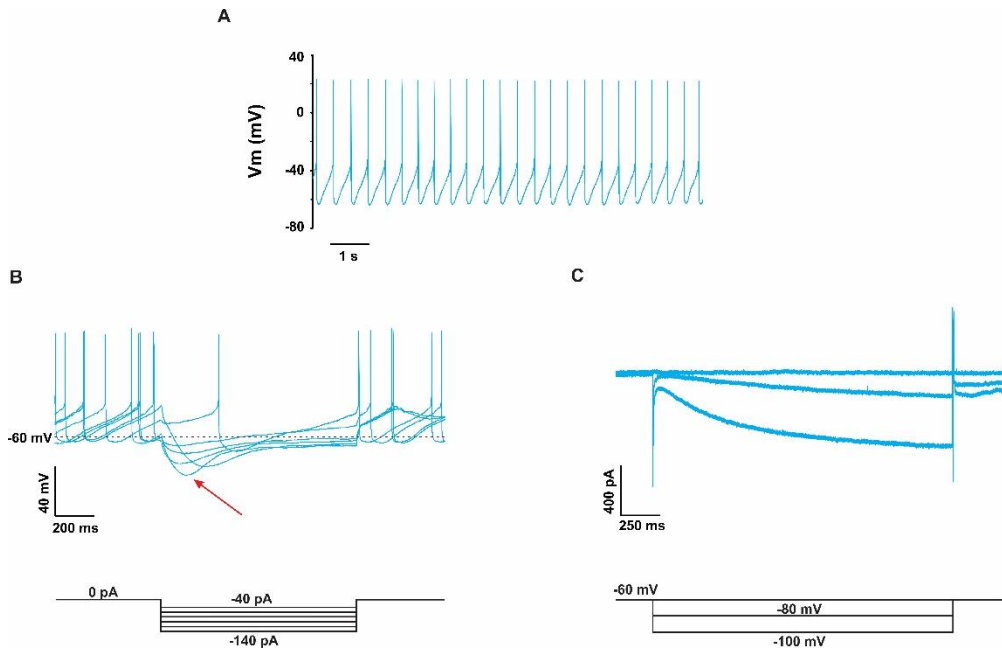


Figure 21 | Propriétés électrophysiologiques des neurones DA de la SNc. **A :** Enregistrement en courant imposé d'une activité spontanée. **B :** Enregistrement de l'évolution potentiel suite à une injection de courant négatif. La flèche en rouge montre le « sag », correspondant dans une dépolarisation de la membrane suite à l'ouverture de canaux HCN. Le protocole expérimental utilisé est représenté en dessous de l'enregistrement. **C :** Enregistrement du I_h en potentiel imposé. Le protocole expérimental utilisé est représenté en dessous de l'enregistrement.

Etant donné que la SNc n'est pas composée exclusivement de neurones DA, il est essentiel de pouvoir les identifier avant de commencer les enregistrements. Dès lors, on se base sur leurs propriétés électrophysiologiques pour les distinguer des autres neurones, à savoir : une lente fréquence stable de décharge de potentiels d'action (0.5 – 8 Hz), la durée des potentiels d'action et la présence de courants I_h , responsables du « sag » qu'on observe lorsque qu'on injecte du courant négatif (Neuhoff et al., 2002; Philippart et al., 2016; Seutin and Engel, 2010) (Fig. 21). De la dopamine peut être également appliquée pour valider l'identité dopaminergique des neurones, ainsi qu'un marquage *posthoc* de la TH. Cependant, ces deux contrôles n'ont pas été réalisés étant donné la force des contrôles électrophysiologiques.

5.3. Décharge en bouffées

Comme indiqué dans l'introduction, les neurones DA de la SNc sont capables de passer d'un mode de décharge en pacemaker vers un mode de décharge en bouffées. Cependant, ce dernier est observable *in vivo* mais il est absent *in vitro*. Dès lors, pour étudier les décharges en bouffées *in vitro*, il est nécessaire de l'induire par ajout de NMDA pour activer les récepteurs NMDA, d'apamine pour bloquer les canaux SK et injecter du courant négatif (Johnson et al., 1992; Kitai et al., 1999; Seutin et al., 1993).

5.4. Pacemaker-clamp

Pour étudier les courants qui sous-tendent un potentiel d'action neuronal, il existe une configuration appelée « potentiel d'action imposé » (ou « *action potentiel clamp* »). Pour utiliser cette configuration, il faut enregistrer un potentiel d'action de la population neuronale étudiée et s'en servir comme commande de voltage en potentiel imposé (Do and Bean, 2003; Taddese

and Bean, 2002; Yamada-Hanff and Bean, 2013). Dans le cas des neurones DA, on a enregistré une activité pacemaker (2-3 potentiels d'action) pour étudier la nature de la conductance responsable de cette activité (Bean, 2007; Khaliq and Bean, 2008; Puopolo et al., 2007).

Cette configuration a surtout été utilisée pour déterminer les propriétés de la conductance responsable du pacemaker ($g_{pacemaker}$), ainsi que la nature ionique de celle-ci. La composition du LCRa a donc été modifiée pour répondre à cette question. Pour vérifier si $g_{pacemaker}$ est perméable au Ca^{2+} , la composition du LCRa était la suivante (en mM) : 125 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 2.5 KCl, **0.1** $CaCl_2$, 1.25 NaH_2PO_4 , 1 $MgCl_2$ et 25 D-glucose (pH : 7.3 - 7.4 en présence du carbogène ; osmolarité : ~ 320 mOsmol/l). Pour vérifier si $g_{pacemaker}$ est perméable au Na^+ , la composition du LCRa était la suivante (en mM) : **125 CholineCl**, 25 $NaHCO_3$, 2.5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1.25 NaH_2PO_4 , 1 $MgCl_2$ et 25 D-glucose (pH : 7.3 - 7.4 en présence du carbogène ; osmolarité : ~ 320 mOsmol/l). Pour vérifier si $g_{pacemaker}$ est perméable au K^+ , le LCRa n'a pas été modifié. Seule la solution intracellulaire a été changée (en mM) : **125 Cs-gluconate**, **20 CsCl**, 4 MgATP, 10 Na_2 -phosphocréatine, 0.3 Na_2GTP , 10 HEPES, 0.5 EGTA (pH = 7.3 ; osmolarité : ~ 305 mOsmol/l). La solution intracellulaire a aussi été modifiée pour déterminer si $g_{pacemaker}$ était perméable au Cl^- (en mM) : **145 KCl**, 4 MgATP, 10 Na_2 -phosphocréatine, 0.3 Na_2GTP , 10 HEPES, 0.5 EGTA (pH = 7.3 ; osmolarité : ~ 305 mOsmol/l). La résistance des pipettes d'enregistrements était comprise entre 1.5 et 3 M Ω .

6. Agents pharmacologiques

Durant l'entièreté du projet, un cocktail de bloqueurs de récepteurs synaptiques a été utilisé afin d'isoler pharmacologiquement l'activité intrinsèque des neurones DA et d'éviter l'effet présynaptique des agents

pharmacologiques étudiées. Les récepteurs AMPA, NMDA, GABA_A (ionotropiques) et GABA_B (métabotropiques) ont été bloqués par, respectivement, du CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione ; 10 μ M), MK-801 (dizocilpine ; 1 μ M), gabazine (10 μ M) et CGP 55845 (acide (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinique hydrochloride ; 1 μ M). Par ailleurs, du sulpiride (1 μ M) a été appliqué pour bloquer l'activation des autorécepteurs D2 pour empêcher un rétrocontrôle négatif de la dopamine sur l'excitabilité des neurones DA. Les autres agents pharmacologiques utilisés au cours de ce projet sont repris dans le tableau 1.

7. Acquisition et analyse des données

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés avec un amplificateur MultiClamp 700B (Molecular Devices, Palo Alto, CA, Etats-Unis) connecté à un ordinateur via une interface Digidata 1550 (Molecular Devices) utilisant le logiciel pClamp 10.5 (Molecular Devices), ainsi qu'un amplificateur EPC-10 (HEKA electronics, Lambrecht, Allemagne) utilisant le logiciel PatchMaster (HEKA electronics) pour la série en cellule-attachée. Les traces ont été enregistrées à 50 kHz et filtrées à 10 kHz. Les traces présentes dans les figures ont été filtrées numériquement à 2 kHz. Les données ont été analysées avec le logiciel clampfit 10.5 de pClamp (Molecular Device) et Stimfit 0.13 (Christoph Schmidt-Hieber, UCL). La résistance d'entrée a été monitorée tout au long des enregistrements. Les cellules ayant une valeur de la résistance d'entrée supérieure à 15 M Ω ont été exclues des analyses des données et statistiques. Pour les enregistrements en *pacemaker-clamp*, les cellules ont été retirées des analyses quand la résistance d'entrée dépassait les 10 M Ω .

Nom et concentration(s)	Effets
1-(2,4-xylyl)guanidinium carbonate (0.2, 0.6, 2 et 6 mM)	Bloque les courants ω et la conductance pacemaker
1-(2,4-xylyl)guanidinium mésylate (0.02, 0.6, 0.2, 0.6 et 2 mM)	Bloque les courants ω et la conductance pacemaker
4-aminopyridine (4 mM)	Bloque les canaux K_v4
Acide flufénamique (100 μ M)	Bloque les canaux TRPM
Apamine (300 nM)	Bloque les canaux SK
$CdCl_2$ (200 μ M)	Bloque les canaux Ca_v
$CsCl$ (2.5 mM)	Bloque les canaux K_v et les courants I_h
GBR-12909 (10 μ M)	Bloque le DAT
$GdCl_3$ (100 μ M)	Bloque les canaux NALCN
GuaCl (10, 20 et 30 mM)	Amplifie les courants ω
Isradipine (5 μ M)	Bloque préférentiellement les canaux $Ca_v1.3$
Nifédipine (5 μ M)	Bloque les canaux Ca_v de type L
NMDA (30 μ M)	Agoniste des récepteurs NMDA
TEACl (20 mM)	Bloque la majorité des canaux K_v sauf les courants I_a
TTX (1 μ M)	Bloque les canaux Na_v
ZD 7288 (30 μ M)	Bloque les courants I_h
ω -Conotoxin GVIA (1 μ M)	Bloque les canaux Ca_v de type N

Tableau 1 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisées ainsi que de leur concentration et effets.

8. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, Etats-Unis). Les données obtenues sont pairées, à l'exception de la figure 41C et 43. Nous avons effectué des tests paramétriques (et non-paramétriques), dont des tests de Student (Wilcoxon), ANOVA-1 (Friedman) et ANOVA-2 ont été employés, suivis du test post hoc de Holm-Sidak (Dunn). Les valeurs expérimentales sont exprimées en moyenne $\pm$ l'erreur standard de la moyenne (« Standard Error of the Mean » ou SEM). Les données ayant une valeur p inférieure à 0.05 ont été considérées significativement différentes. Le degré de signification est annoté de la manière suivante dans les figures (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Les données individuelles sont représentées en clair tandis que les données moyennées sont en foncées. Le trait qui relie les données individuelles indiquent qu'elles sont pairées, tandis que le trait qui relie les données moyennées représentent la variance entre les différentes conditions.

RESULTATS

1. Rôle des canaux modulateurs de l'activité spontanée

1.1. Canaux Ca_v de type L et N, SK et I_h

Les canaux Ca_v de type L et N, SK et HCN ont largement été étudiés dans la génération et la régulation de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc (de Vrind et al., 2016; Deignan et al., 2012; Guzman et al., 2009; Neuhoﬀ et al., 2002; Philippart et al., 2016; Puopolo et al., 2007; Waroux et al., 2005; Wolfart and Roeper, 2002). Le blocage de l'un de ces canaux ne suﬃt pas à éteindre l'activité spontanée de ces neurones. Dès lors, nous avons voulu vérifier si cette activité persiste après le blocage de l'ensemble de ces canaux (Fig. 22A).

Ces données ont été obtenues par enregistrements extracellulaires à partir de tranches de cerveaux de rats Wistar adultes. La fréquence de décharge moyenne en condition contrôle est de 1.8 ± 0.1 Hz, 2.7 ± 0.1 Hz en condition nifédipine (5 μ M), ZD 7288 (30 μ M) et apamine (300 nm), 2.4 ± 0.2 Hz à l'ajout de la ω -conotoxine-GV1a (1 μ M) et 1.7 ± 0.2 Hz après lavage ($n = 7$ pour les 4 conditions). L'application de nifédipine, ZD 7288 et apamine a entraîné une augmentation significative de la fréquence de décharges (ANOVA-1, $p < 0.001$). L'ajout de la ω -conotoxine-GV1a n'augmente pas la fréquence de décharge de façon significative par rapport à la condition précédente (ANOVA-1, $p = 0.28$), mais elle est significativement plus élevée que la condition contrôle (ANOVA-1, $p = 0.02$). Dès lors, on peut conclure que la combinaison des canaux Ca_v de type L et N, SK et HCN n'est pas essentielle à la génération de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc.

1.2. Canal NALCN

Les canaux NALCN sont des canaux voltage-dépendant. Ils sont perméables au Na^+ , K^+ et Ca^{2+} et ne s'inactivent pas. Ils sont exprimés de façon ubiquitaire dans le cerveau (Lee et al., 1999) et sont responsables du potentiel de repos membranaire neuronal car ils génèrent la principale conductance de fuite sodique (Lu et al., 2007). Ils sont bloqués par du Gd^{3+} (Chua et al., 2020a) et ils sont insensibles à la TTX et au Cs^+ .

Au niveau de la SNr, le blocage de ces canaux par le Gd^{3+} éteint l'activité autonome rapide neurones GABAergiques (Lutas et al., 2016). En ce qui concerne les neurones DA de la SNc, un modèle de souris $\text{NALCN}^{-/-}$ montre que 70% des neurones sont silencieux, mais l'injection d'un petit courant permet de restaurer leur activité spontanée (Philippart and Khaliq, 2018). Cette étude montre également que les NALCN sont inhibés par l'activation des récepteurs D2 et GABA_B . Au vu de ces résultats, nous avons voulu vérifier si le blocage pharmacologique des NALCN par le Gd^{3+} affecte la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (**Fig. 22B**).

Ces données ont été obtenues par enregistrements extracellulaires sur des rats Wistar adultes. La fréquence de décharge moyenne en condition contrôle est de 2.2 ± 0.2 Hz, 2.3 ± 0.2 Hz en condition Gd^{3+} et de 2.1 ± 0.3 Hz après lavage ($n = 5$ pour les 3 conditions). De façon surprenante, il n'y a pas de différence significative de l'effet du blocage des Nalcn sur la fréquence de décharge des neurones DA (ANOVA-1, $p = 0.99$). Cette observation peut s'expliquer par le fait que les neurones DA enregistrés partagent les propriétés des 30% de neurones DA spontanément actifs dans le modèle de souris $\text{NALCN}^{-/-}$ (Philippart and Khaliq, 2018). Une cartographie de l'effet du blocage des NALCN par le Gd^{3+} au sein de la SNc permettrait de compléter ces observations.

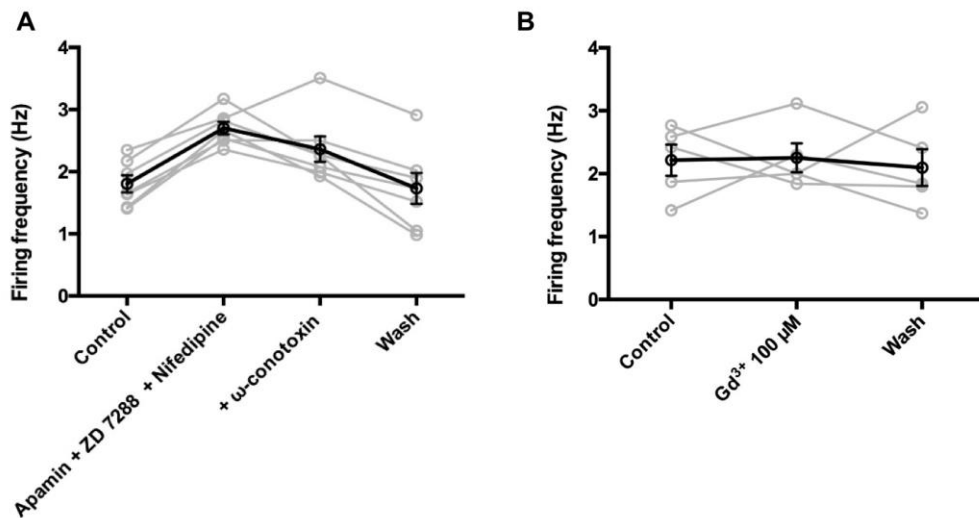


Figure 22 | Effet de blocage des modulateurs de l'activité spontanée des neurones DA. A : Effet du blocage des canaux Ca_v de type L et N, SK et I_h sur l'activité rythmique des neurones DA. La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représentée en noir et les données individuelles en gris ($n = 7$). De l'apamine (300 nM), ZD 7288 (30 μM) et de la nifédipine (5 μM) ont été superfusés dans du LCRA en présence de bloqueurs synaptiques. La ω -conotoxine-GV1a (1 μM) a été ajouté en plus des bloqueurs précédents avant que la tranche ne soit lavée du cocktail de bloqueurs. Bloquer ces canaux n'inhibe pas l'activité spontanée des neurones DA de la SNC. **B :** Effet du blocage des NALCN sur l'activité autonome des neurones DA. La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représentée en noir et les données individuelles en gris ($n = 5$). Le Gd^{3+} (100 μM) a été ajouté en plus des bloqueurs synaptiques. Le blocage des NALCN ne change pas la fréquence de décharge des neurones DA de la SNC.

2. Rôle des canaux TRPM dans l'activité spontanée

Les canaux dits « Transient Receptor Potential » ou TRP forment une superfamille divisée en 6 sous-familles : TRPC (canonical), TRPV (vanilloïde), TRPM (melastatine), TRPA (ankyrine), TRPP (polycystine) et TRPML (mucolipine) (Holzer and Izzo, 2014). Ces canaux à cations non sélectifs sont généralement activés suite aux changements de températures, une fixation d'un ligand ou une modulation par un récepteur couplé à une protéine G, mais leur activation est rarement dépendante du potentiel (Vay et al., 2012).

Au niveau des neurones DA de la SNc, ils sont surtout étudiés dans le contexte de la maladie de Parkinson : l'activation de certains ont l'air de contribuer à la dégénérescence des neurones DA (Chung et al., 2011; S. R. Kim et al., 2005; Sun et al., 2016), alors que d'autres sont essentiels à leur protection (Sun et al., 2017). Une étude montre que les canaux TRPM seraient nécessaires pour générer leur activité spontanée et en bouffée (Mrejeru et al., 2011). Cependant, pour mettre en évidence l'implication de ces canaux, de l'acide flufénamique (FFA) a été utilisé en configuration courant-imposé et ils ont mis en évidence l'expression des ARN messenger des canaux TRPM2 et TRPM4. Le problème avec le FFA est qu'il s'agit d'un bloqueur aspécifique qui agit sur une grande variété de canaux ioniques (Guinamard et al., 2013). Dès lors, nous avons voulu reproduire ces résultats et observer les effets du FFA sur les neurones DA de la SNc.

Dans un premier temps, nous avons mené des expériences d'enregistrement sur tranches de cerveau de rats Wistar adultes en superfusant du FFA (100 μ M) en présence de bloqueurs synaptiques (**Fig. 23**). Dans tous les neurones enregistrés ($n = 6$) nous avons observé une extinction significative (2.4 ± 0.2 Hz en contrôle, 0.0 ± 0.0 sous FFA 100

μM et 1.3 ± 0.4 Hz après lavage du FFA. ANOVA-1, $p = 0.0002$; **Fig. 23**) de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc. Par ailleurs, pendant l'application du FFA, nous avons observé une augmentation de l'amplitude et de la durée des potentiels d'action. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait qu'il y a une hyperpolarisation de la cellule, comme on peut l'observer lorsqu'on applique, sur ces neurones, de la DA qui active les récepteurs D2 (Waroux et al., 2005). Après le lavage du FFA, l'activité spontanée est récupérée rapidement, indiquant que le silence est bien dû à l'effet inhibiteur du FFA et non à une mort de la cellule.

Afin d'identifier le mécanisme d'inhibition par le FFA, nous avons effectué des enregistrements en patch-clamp sur des rats Wistar juvéniles. Nous avons appliqué du FFA ($100 \mu\text{M}$) sur des neurones DA de la SNc, toujours en présence de bloqueurs synaptiques pour d'abord vérifier s'il inhibe l'activité spontanée des neurones DA (**Fig. 24**). 100% des cellules enregistrées ont montré une extinction de leur activité pacemaker et cette activité a été récupérée après lavage du bloqueur. Sous FFA, le potentiel membranaire a une valeur avoisinant -60 mV. Il s'agit bien d'une inhibition par hyperpolarisation de la cellule car le potentiel moyen d'un neurone DA de la SNc (potentiel à mi-hauteur lors de l'intervalle entre deux potentiels d'action) est de -55 mV.

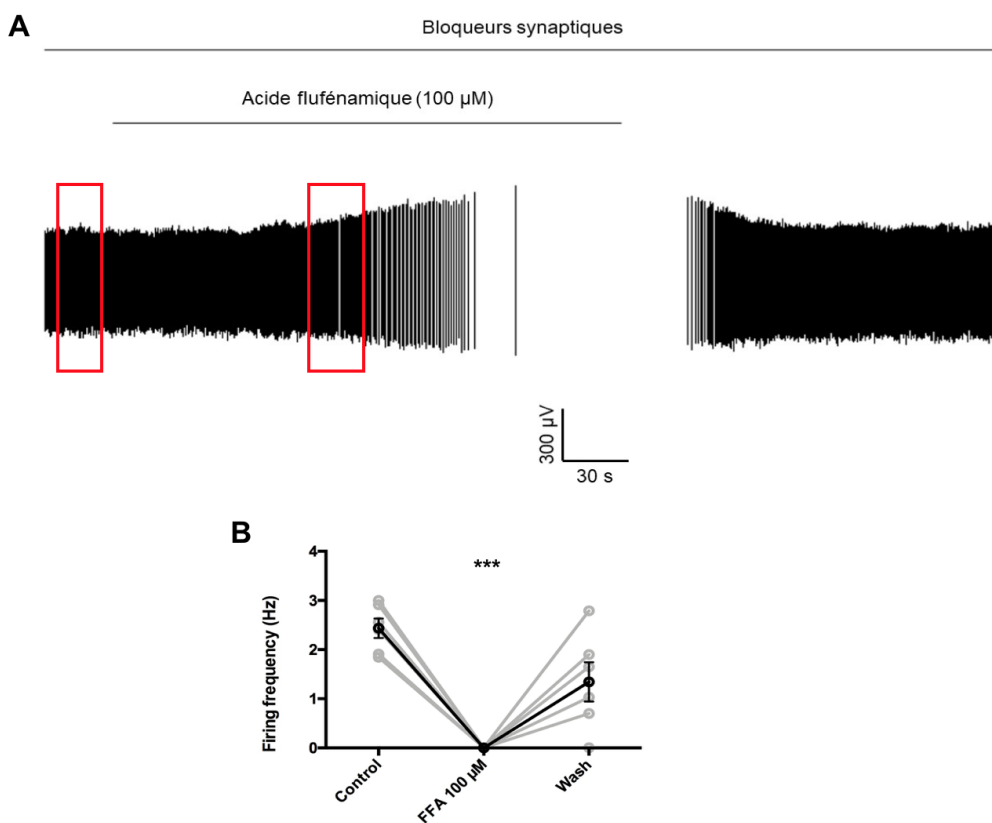


Figure 23 | Le FFA inhibe l'activité spontanée des neurones DA de la SNc. A : Trace d'un enregistrement extracellulaire d'une cellule. On remarque l'augmentation de l'amplitude des potentiels d'action, indiqué par les rectangles rouges. **B :** La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représenté en noir et les données individuelles en gris (n = 6).

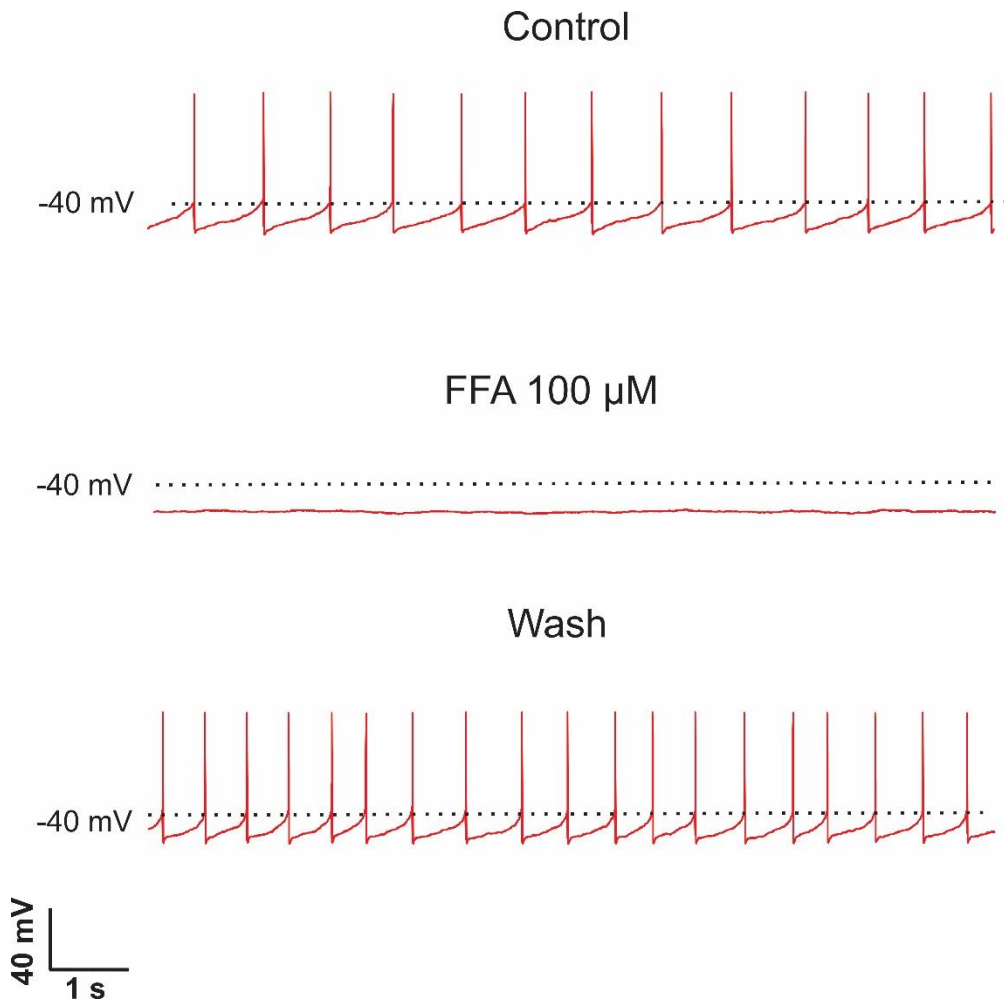


Figure 24 | L'inhibition de l'activité autonome par le FFA est le résultat d'une hyperpolarisation. Le panel du haut montre une activité spontanée en présence de bloqueurs synaptiques, celui du milieu montre le potentiel sous FFA (100 μ M) et celui du bas montre la reprise de l'activité autonome après lavage du FFA, tous avec 0 pA de courant injecté. Le potentiel sous FFA est à -60 mV, reflet d'une extinction de l'activité spontanée par hyperpolarisation.

Pour vérifier si cette hyperpolarisation est due au blocage des canaux TRPM2/4 ou à une ouverture de canaux hyperpolarisant, comme des canaux K^+ , nous avons calculé la conductance cellulaire entre -50 mV et -60 mV (**Fig. 25A-B**) Nous avons observé une augmentation significative de conductance (1.4 ± 0.1 nS à 0 min, 2.3 ± 0.1 nS à 2 min, 2.5 ± 0.2 nS à 4 min, 3.0 ± 0.3 nS à 6 min et 3.6 ± 0.3 nS à 8 min. ANOVA-1, $p = 0.012$ à 2 min, 0.012 à 4 min, 0.002 à 6 min et 0.009 à 8 min ; $n = 7$), ce qui indique une ouverture de canaux ioniques, mais aussi une augmentation du courant injecté à -50 mV (-30.24 ± 3.72 pA à 0 min, -18.13 ± 2.41 pA à 2 min, -10.79 ± 4.51 à 4 min, 7.81 ± 8.73 à 6 min et 24.84 ± 14.49 pA à 8 min. ANOVA 1, $p = 0.029$ à 2 min, 0.0024 à 4 min, 0.015 à 6 min et 0.032 à 8 min ; $n = 7$; **Fig. 25C**), reflétant une hyperpolarisation. Le FFA inhibe donc l'activité pacemaker des neurones DA par une ouverture de canaux hyperpolarisant. Il s'agit sans doute de canaux K^+ car le potentiel de réversion du Cl^- est à -45 mV au vu des solutions utilisées (LCRa en extracellulaire et une solution intracellulaire à base de K-gluconate). Par ailleurs, on ne peut pas confirmer si les canaux TRPM sont activés durant leur activité tonique. Dès lors, l'implication des canaux TRPM2/4 décrite dans la littérature (Mrejeru et al., 2011) s'expliquerait par le fait que le FFA hyperpolarise ces neurones. A l'heure actuelle, il est difficile de vérifier cette hypothèse car il n'existe pas de bloqueur spécifique des canaux TRPM2. Pour les TRPM4, le 9-phenantrol a été décrit comme étant un bloqueur spécifique (Grand et al., 2008) et il existe déjà des modèles de rat et souris TRPM4^{-/-} (Bovet-Carmona et al., 2018; Kecskés et al., 2015).

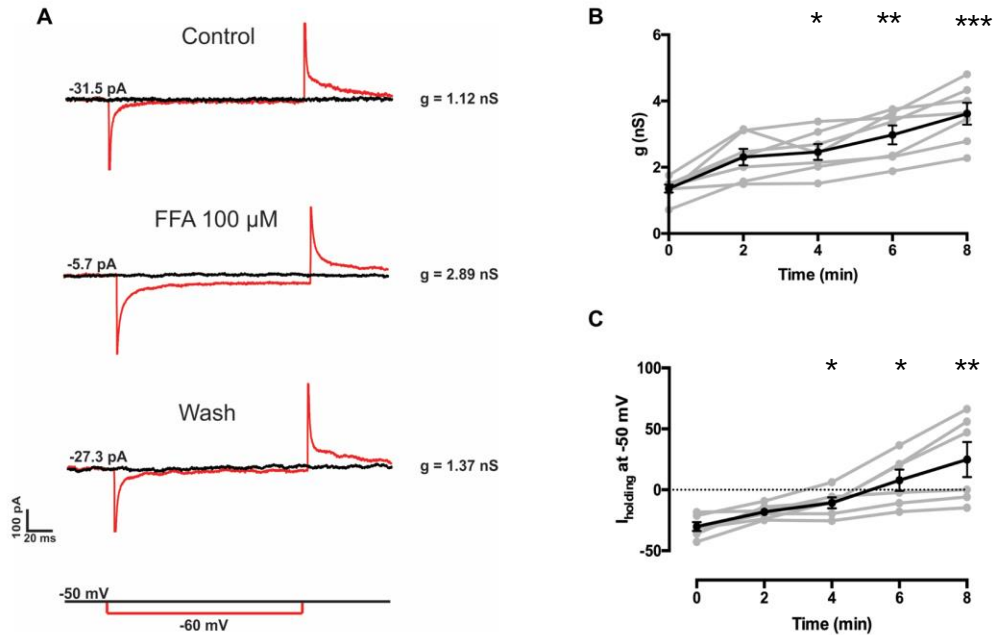


Figure 25 | Le FFA augmente la conductance cellulaire. **A** : Enregistrements en potentiel-imposé. Le protocole est décrit en bas du panel. La conductance g s'obtient par le rapport de la différence de courant entre -50 et -60 mV sur la différence des potentiels ($g \text{ (nS)} = \Delta I \text{ (pA)} / \Delta V \text{ (mV)}$). **B** : Evolution de la conductance cellulaire sous FFA $100 \mu\text{M}$ en fonction du temps. La conductance cellulaire moyenne $\pm \text{SEM}$ est représenté en noir et les données individuelles en gris ($n = 7$). **C** : Evolution du courant injecté à -50 mV sous FFA en fonction du temps. Le courant injecté moyen $\pm \text{SEM}$ est représenté en noir et les données individuelles en gris ($n = 7$). L'augmentation de conductance est due à une ouverture de canaux (K^+ par exemple) qui hyperpolarisent les neurones DA de la SNC.

3. Courants ω et activité spontanée

Nous avons exploré les hypothèses principales quant à l'origine de $g_{pacemaker}$, avec des résultats qui laissent toujours cette question sans réponse. Bien que l'origine de cette conductance reste controversée (Chan et al., 2007; Di Giovanni et al., 2009; Dougalis et al., 2017; Guzman et al., 2009; Mrejeru et al., 2011; Puopolo et al., 2007), on connaît quelques propriétés de $g_{pacemaker}$. Cette conductance est nécessaire pour générer une lente dépolarisation après un potentiel d'action pour en initier un autre. L'intensité du courant généré a été calculée de l'ordre de 1 à 6 pA (Khaliq and Bean, 2008). Un courant de telle amplitude est bien plus petit que l'amplitude des courants importants observés dans ces neurones, généralement de l'ordre de 100 pA à 10 nA, ce qui rend son étude difficile. En effet, la fréquence de décharge des neurones DA sur tranches est extrêmement régulière : le coefficient de variation de l'intervalle entre deux potentiels d'action (CVISI) dans des conditions contrôlées est de l'ordre de 0.05 (de Vrind et al., 2016) ce qui signifie que ce courant pacemaker (I_{pace}) doit être très stable et régulier. A -50 mV, la conductance Na^+ portée par un courant de 5 pA est de 50 pS. Vu que la conductance unitaire d'un canal Na_v varie de 10 à 40 pS (Sigworth and Neher, 1980), deux ou trois canaux Na_v seraient suffisants pour générer un courant d'une telle amplitude. Étant donné la nature stochastique de l'ouverture de ces protéines, ce courant serait instable et donc cette hypothèse est incompatible avec un CVISI aussi faible.

Une autre possibilité est que I_{pace} peut être généré par une plus grande quantité de canaux ioniques de très faible conductance. En effet, ce cas de figure serait plus robuste d'un point de vue physiologique pour assurer une activité spontanée reproductible d'une cellule à l'autre. Dès lors, nous avons investigué l'implication de tels courants dans l'activité électriques

des neurones DA de la SNc, en nous focalisant principalement sur les courants dit de « gating pore » ou courants ω (I_ω).

Les I_ω sont des courants issus d'un pore non canonique au niveau du S4 et ils ont une conductance estimée de 1 à 6 % de la conductance d'un pore conventionnel (Held et al., 2016). Ces pores ont d'abord été décrits dans canaux K^+ de type « Shaker » (Starace and Bezanilla, 2004a; Tombola et al., 2005a) et ensuite observés dans certaines pathologies comme la paralysie périodique hypokaliémique (Sokolov et al., 2010, 2007). L'existence de cette voie alternative pour les ions est causée par la substitution d'une arginine de S4 par un acide aminé non chargé comme une glycine. Les ions peuvent alors passer par ce pore au sein du senseur de voltage (Jiang et al., 2018). Ils peuvent être entrants comme sortants, en fonction de la position de l'arginine substituée. Les courants entrants apparaissent à des potentiels hyperpolarisés, quand le canal est à l'état « fermé » et l'une des 2 premières arginines est substituée tandis que les courants sortants apparaissent à des potentiels plus positifs, quand le canal est ouvert et/ou inactivé et l'une des deux dernières arginines est substituée (**Fig. 26**). La nature des ions qui sous-tendent I_ω est variable. Elle dépend principalement du canal porteur et la position de la substitution arginine-glycine (Held et al., 2016; Moreau et al., 2014). Cependant, il a été observé que les ions guanidinium (gua^+) sont les plus perméants. En effet, le pore généré par l'absence d'arginine devient un site parfait pour stocker un groupe guanidine qui mime l'arginine manquante (Tombola et al., 2005a). Le gua^+ amplifie les I_ω et des dérivés guanidine ont été testés pour bloquer ce courant, parmi lesquels on retrouve le 2-guanidinobenzimidazole (2GBI) et le 1-(2,4-xylyl)guanidine carbonate (XG) (Hong et al., 2013; Sokolov et al., 2010). Ces deux molécules sont les seules capables de bloquer I_ω en plus des ions métalliques tri- (Gd^{3+} , Y^{3+} ,

Yb^{3+} , Ti^{3+} , Lu^{3+}) et quadrivalents (Hf^{4+}). Le 2GIB a surtout été décrit dans le cadre de la pharmacologie des canaux protons voltage-dépendants (H_v) (Hong et al., 2013), donc nous nous sommes tournés vers le XG, en plus du gua^+ pour investiguer la présence de I_ω entrant dans les neurones DA de la SNc.

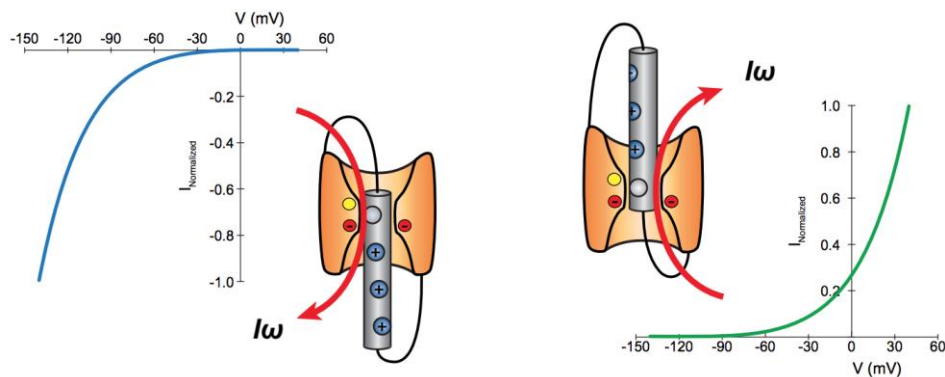


Figure 26 | Représentation des I_ω généré par un pore dans le 4^e segment transmembranaire des canaux voltage-dépendants. Sur le panel de gauche, il s'agit d'une représentation de la forme entrante, activée à des potentiels hyperpolarisés et le sur panel de droite, la forme sortant activée à des potentiels dépolarisés (adapté de Moreau et al., 2014).

3.1. Expériences avec guanidinium

3.1.1. Enregistrements extracellulaires

L'hypothèse initiale est que I_w pourrait sous-tendre l'activité spontanée des neurones DA de la SNc s'il y est présent. I_w devrait alors être entrant et le gua^+ devrait augmenter la fréquence de décharge des cellules. Nous avons donc commencé par investiguer l'effet du gua^+ sur ces neurones avec des enregistrements extracellulaires (**Fig. 27**). L'application de gua^+ s'est faite en substituant le Na^+ par cet ion dans le LCRa. Pour cette série, nous avons réalisé plusieurs LRCas. La composition est restée inchangée sauf pour le Na^+ substitué par le gua^+ de la façon suivante (en mM) : 125 Na^+ / 0 gua^+ , 115 Na^+ / 10 gua^+ , 105 Na^+ / 20 gua^+ , 95 Na^+ / 30 gua^+ .

En condition contrôle, sans les bloqueurs synaptiques, la fréquence de décharge est de 1.6 ± 0.1 Hz, sous bloqueurs synaptiques (« cocktail »), elle est de 2.5 ± 0.1 Hz et sous gua^+ 10 mM, elle est de 4.4 ± 0.3 (n = 16). Le gua^+ augmente de façon significative la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (ANOVA 1, $p < 0.0001$ pour cocktail vs gua^+ 10 mM ; **Fig. 27A**). Cependant, lorsque la concentration de gua^+ augmente, on observe une extinction de plus en plus importante du pacemaker (4/20 avec 10 mM, 12/20 avec 20 mM et 15/20 avec 30 mM de gua^+ ; **Fig. 27B**, **Annexe 2**). L'inhibition de l'activité spontanée ne s'est pas produite après un ralentissement de la fréquence de décharge comme observé avec l'application de FFA. Dès lors nous suspectons que cette inhibition est la conséquence d'une dépolarisation trop importante, empêchant le recrutement de canaux Na_v inactivés. Cette dépolarisation pourrait être due à une amplification de I_w grâce au gua^+ .

3.1.2. Enregistrements en *patch-clamp*

Afin de vérifier si l'extinction de l'activité spontanée était bien due à une forte dépolarisation de la cellule, nous avons effectué des expériences en patch-clamp en configuration courant-imposé. Nous avons principalement utilisé 30 mM de gua^+ pour augmenter la probabilité d'observer une inhibition de l'activité autonome des neurones DA de la SNc, en accord avec les résultats précédents (Fig. 27B).

Comme observé dans les enregistrements extracellulaires, le gua^+ inhibe l'activité rythmique des cellules (Fig. 28A). Par ailleurs, le potentiel membranaire durant l'inhibition est de l'ordre de -30 mV, indiquant qu'il s'agit d'un bloc par dépolarisation. Après le lavage du gua^+ 30 mM, l'activité spontanée est récupérée. Ces expériences ont été réalisées en présence de bloqueurs synaptiques.

Nous avons ensuite vérifié si l'effet observé était bien dû à l'action du gua^+ et non à une diminution de la concentration de Na^+ . Pour cela, nous avons substitué 30 mM de Na^+ par 30 mM de choline (Ch^+) pour conserver le nombre de charges positives dans la solution extracellulaire (Fig. 28B). En condition contrôle, la fréquence de décharge est de 1.3 ± 0.2 Hz, 0.7 ± 0.2 Hz sous Ch^+ et 2.5 ± 0.3 Hz sous gua^+ . La fréquence de décharge de la dernière condition a été mesurée sur 1 min avant le bloc par dépolarisation. Sous Ch^+ , la fréquence est diminuée de façon significative par rapport à la condition contrôle (ANOVA-1, $p = 0.048$, $n = 7$), ce qui peut s'expliquer par la diminution de la concentration de Na^+ . Sous gua^+ , la fréquence augmente de façon significative par rapport à la condition contrôle (ANOVA-1, $p = 0.0032$, $n = 7$).

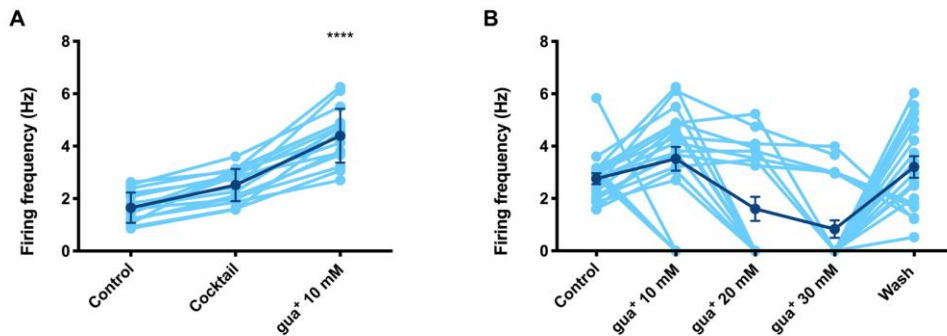


Figure 27 | Effet du gua⁺ sur l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc. La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représentée en bleu foncé et les données individuelles en bleu clair. **A :** Le gua⁺ augmente la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (n = 16). **B :** L'augmentation de la concentration de gua⁺ facilite l'inhibition de l'activité spontanée des neurones DA (n = 20).

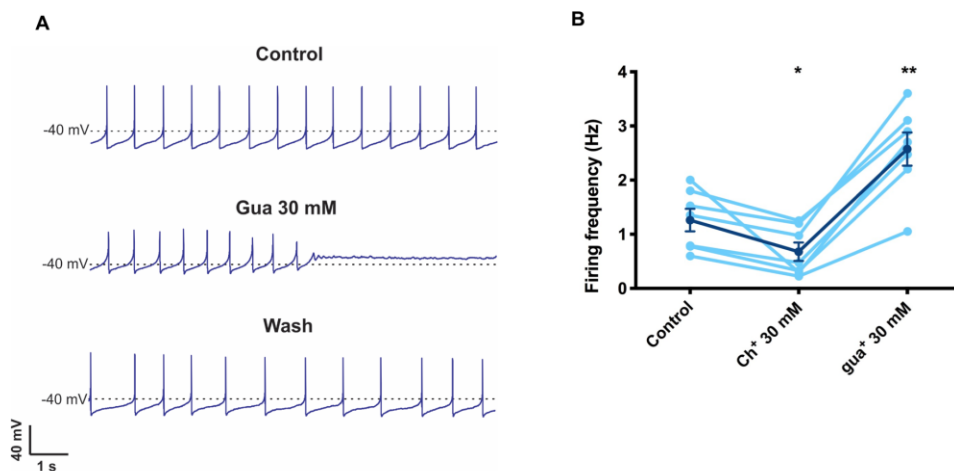


Figure 28 | Le gua⁺ augmente la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc. **A :** Le panel du haut montre une activité spontanée en présence de bloqueurs synaptiques, celui du milieu montre le potentiel sous gua⁺ (30 mM) et celui du bas montre la reprise de l'activité spontanée après lavage du gua⁺, tous avec 0 pA de courant injecté. **B :** La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représentée en bleu foncé et les données individuelles en bleu clair (n = 7). L'augmentation de fréquence est bien due au gua⁺ et non une diminution de la concentration de Na⁺.

Afin de confirmer que le gua^+ entre dans la cellule par une voie différente que le pore principal des canaux voltage-dépendant impliqué dans un potentiel d'action, nous avons monitoré le potentiel membranaire, en présence de TTX et de Cd^+ pour bloquer respectivement les canaux Na_v et les canaux Ca_v . Tout comme l'expérience précédente, nous avons également ajouté une condition Ch^+ comme contrôle négatif (**Fig. 29A**). Le potentiel membranaire en condition TTX + Cd^{2+} est à -53.4 ± 1.0 mV, sous Ch^+ il est à -56.4 ± 1.3 mV et sous gua^+ , il est à -43.7 ± 0.7 mV ($n = 8$ pour toutes les conditions ; **Fig. 29B**). Le gua^+ augmente de façon significative le potentiel membranaire (ANOVA-1, $p < 0.0001$ pour TTX+ Cd^{2+} vs gua^+ et $p = 0.0001$ pour Ch^+ vs gua^+). Nous avons également mesuré la conductance sous gua^+ entre -50 et -60 mV. Sous TTX et Cd^{2+} , la conductance est à 2.3 ± 0.2 nS, sous Ch^+ elle est à 2.2 ± 0.2 nS et sous gua^+ , elle est à 3.7 ± 0.4 nS ($n = 8$ pour toutes les conditions ; **Fig. 29C**). Le gua^+ augmente la conductance cellulaire de façon significative (ANOVA-1, $p = 0.002$ pour TTX+ Cd^{2+} vs gua^+ et $p = 0.0012$ pour Ch^+ vs gua^+).

Pour sous-tendre une activité spontanée, I_ω devrait être entrant. Dans cette configuration, I_ω est plus intense à des potentiels plus hyperpolarisés (**Fig. 26**). Le gua^+ étant plus perméant devrait alors potentialiser l'amplitude de ces courants. Dès lors, nous avons effectué des enregistrements en potentiel-imposé en appliquant un protocole de saut de potentiel allant de -60 mV à -120 mV par échelle de -10 mV (**Fig. 30**). Du ZD 7288 a été appliqué pour neutraliser I_h .

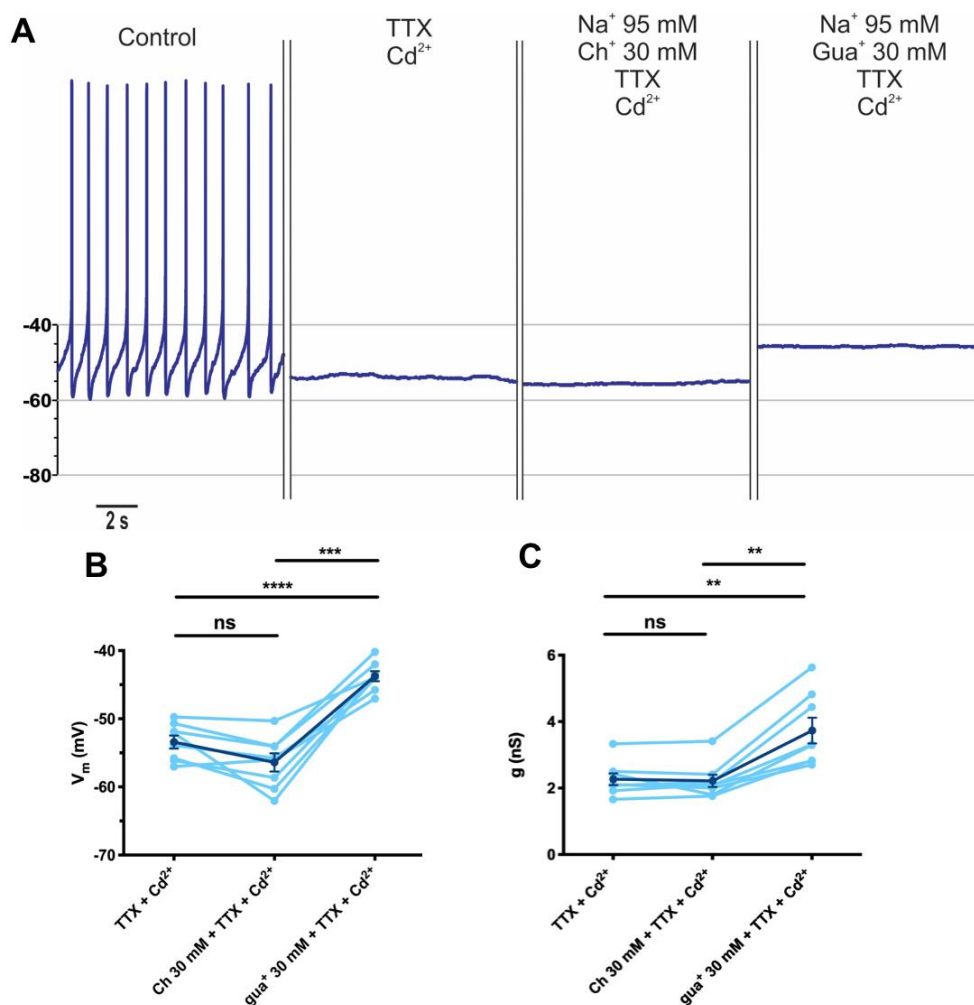


Figure 29 | Le gua^+ dépolarise le potentiel membranaire des neurones DA de la SNc. **A** : Traces expérimentales en courant-imposé à 0 pA de courant injecté. Les bloqueurs synaptiques ont été ajoutés dans les 4 conditions. **B** : Le potentiel membranaire moyen $\pm$ SEM est représenté en bleu foncé et les données individuelles en bleu clair ($n = 8$). **C** : La conductance cellulaire moyenne $\pm$ SEM est représentée en bleu foncé et les données individuelles en bleu clair ($n = 8$). Le gua^+ induit une dépolarisation en passant par un pore différent de celui des canaux Na_v et Ca_v .

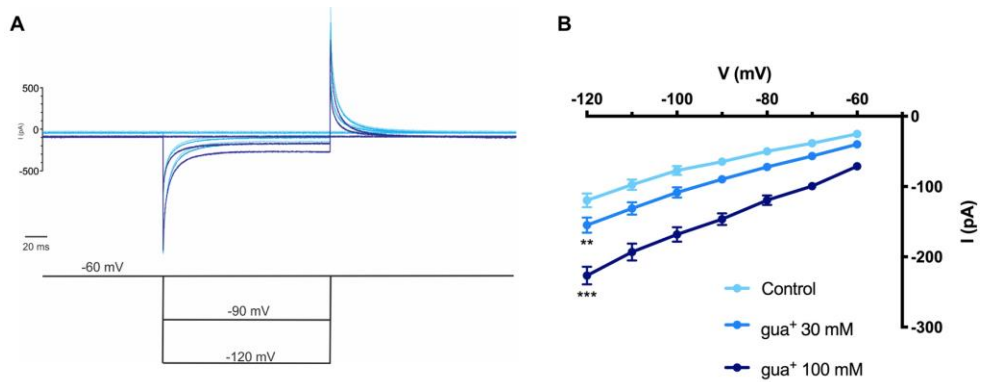


Figure 30 | Effet du gua^+ sur la courbe de relation courant-potential des neurones DA de la SNc. A : Traces expérimentales de courants en potentiel-imposé. Seules les traces à -60, -90 et -120 mV sont représentées. En bleu clair est la condition contrôle, en bleu standard correspond la condition gua^+ 30 mM et en bleu foncé est la condition gua^+ 100 mM. **B :** Courbe courant-voltage des courants amplifiés par le gua^+ à 30 et 100 mM. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ SEM ($n = 7$).

À -120 mV, l'intensité du courant est de -119.7 ± 9.8 pA en contrôle, sous 30 mM de gua^+ elle est de -155.0 ± 10.9 pA et sous 100 mM de gua^+ , elle est de -226.5 ± 12.7 pA ($n = 7$ pour toutes les conditions). L'ajout de gua^+ augmente de façon significative l'intensité des courants à -120 mV (ANOVA-1, $p = 0.0013$ pour contrôle vs gua^+ 30 mM et $p < 0.0001$ pour contrôle vs gua^+ 100 mM ; **Fig. 30B**). Par ailleurs, une plus grande concentration de gua^+ augmente de manière significative l'intensité des courants à -120 mV (ANOVA-1, $p = 0.0002$ pour gua^+ 30 mM vs gua^+ 100 mM ; **Fig. 30B**).

Ces données semblent être en accord avec l'hypothèse de la présence de I_ω dans les neurones DA de la SNc et que ces courants pourraient intervenir dans l'activité pacemaker de ces neurones. Nous avons donc testé la spécificité du gua^+ sur trois autres populations de neurones : les neurones sérotonergiques du raphé dorsal, les neurones GABAergiques de la SNr et les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Nous avons choisi ces populations de neurones car ils présentent des propriétés de décharge différentes : les neurones sérotonergiques ont un pacemaker lent comme les neurones DA, les GABAergiques de la SNr ont un pacemaker rapide et les neurones pyramidaux de CA1 ne sont pas spontanément actifs. Notre hypothèse étant que I_ω est responsable du pacemaker lent, nous nous attendions à ce que le gua^+ dépolarise uniquement les neurones sérotonergiques. Cependant, nous avons observé une dépolarisation massive des trois populations de neurones, similaire à celle observée dans les neurones DA.

Nous pouvons donc conclure que le gua^+ n'est pas approprié pour étudier la présence de I_ω dans un système physiologique complexe tel un neurone. Dans le cas d'un système d'expression avec une très faible densité de canaux ioniques (HEK-293 par exemple), le gua^+ est plus approprié pour

étudier de nouvelles mutations au sein du S4 de différents canaux ioniques (Bayless-Edwards et al., 2018; Monteleone et al., 2017; Sokolov et al., 2010; Tombola et al., 2005a). Par ailleurs, il a été montré que le gua^+ a un effet excitateur et augmente de manière générale la libération de neurotransmetteurs de diverses fibres neuronales (Matthews and Wickelgren, 1977). Le gua^+ pourrait dépolariser les cellules en générant un courant à travers un canal ayant une perméabilité non-sélective.

3.2. Expériences avec XG

3.2.1. Effet du XG sur l'activité spontanée des neurones DA

Bien que les résultats obtenus dans la partie précédente ne nous permettent pas de mettre en évidence la présence ou non de I_ω dans les neurones DA, ni de leur implication dans la génération de leur activité spontanée, nous avons essayé de les bloquer avec du XG (**Fig. 31A**), l'un des seuls bloqueurs pharmacologiques décrits qui cible ces courants (Sokolov et al., 2010).

Comme la série précédente, nous avons commencé par tester l'effet du XG sur l'activité spontanée des neurones DA de la SNc avec des enregistrements extracellulaires. Nous avons appliqué 5 mM de XG, en accord avec la littérature (Sokolov et al., 2010), et nous avons observé une inhibition de l'activité pacemaker, sans modification de la durée ni de l'amplitude des potentiels d'action (**Fig. 31B**). Nous avons ensuite testé des concentrations croissantes de XG, en plus des bloqueurs synaptiques, pour obtenir une courbe concentration réponse et déterminer une IC_{50} (**Fig. 31C-D**). Le XG a une IC_{50} de 485 μM pour les neurones DA de la SNc, ce qui coïncide avec la pharmacologie des I_ω (Sokolov et al., 2010). Le coefficient de Hill a une valeur de 1.3, indiquant que l'effet inhibiteur du

XG est due à une interaction avec une seule cible ($n = 6$ pour chaque condition). Cependant, les différentes concentrations n'ont pas été appliquées l'une à la suite de l'autre en raison des contraintes liées à la mise en solution du XG. En effet, à $\text{pH} = 7.4$, le XG sous forme carbonate (**Fig. 31A**) n'est pas soluble. Il faut amener le LCRa à pH acide (~ 2.0), sans ajout du NaHCO_3 au préalable, le mettre en solution et remonter au pH initial sans le tampon carbonate ($\text{pH} = 4.9 - 5.2$) pour l'y ajouter et être à pH physiologique. Dès lors, nous avons réalisé cette procédure sans ajouter le XG-carbonate (condition « control », **Fig. 31C**) pour vérifier si elle pouvait modifier la fréquence de décharge et nous avons observé que la fréquence restait stable tout au long de l'enregistrement. Pour pallier à cette contrainte, nous avons synthétisé, en collaboration avec le professeur Jean-François Liégeois du laboratoire de chimie pharmaceutique (CIRM) de l'ULiège, du XG combiné à un sel alternatif, le mésylate. Le XG-mésylate se dissout facilement à pH physiologique et nous avons pu réaliser une courbe concentration-réponse en appliquant des concentrations successivement croissantes sur les neurones DA de la SNC (**Fig. 31D**). Le XG-mésylate a une IC_{50} de $427 \mu\text{M}$ et un coefficient de Hill de 1.3 ($n = 6$). La forme mésylate n'a pas d'effet significativement différent de la forme carbonate (F test des sommes des carrés, $p = 0.72$). Nous avons également testé le XG sur les neurones DA de l'ATV (**Fig. 31D**). Le XG-mésylate a une IC_{50} de $332 \mu\text{M}$ sur les neurones DA de l'ATV et un coefficient de Hill 1.052 ($n = 6$). Les IC_{50} dans la SNC et l'ATV ne sont pas différentes d'un point de vue statistique (F test des sommes des carrés, $p > 0.05$).

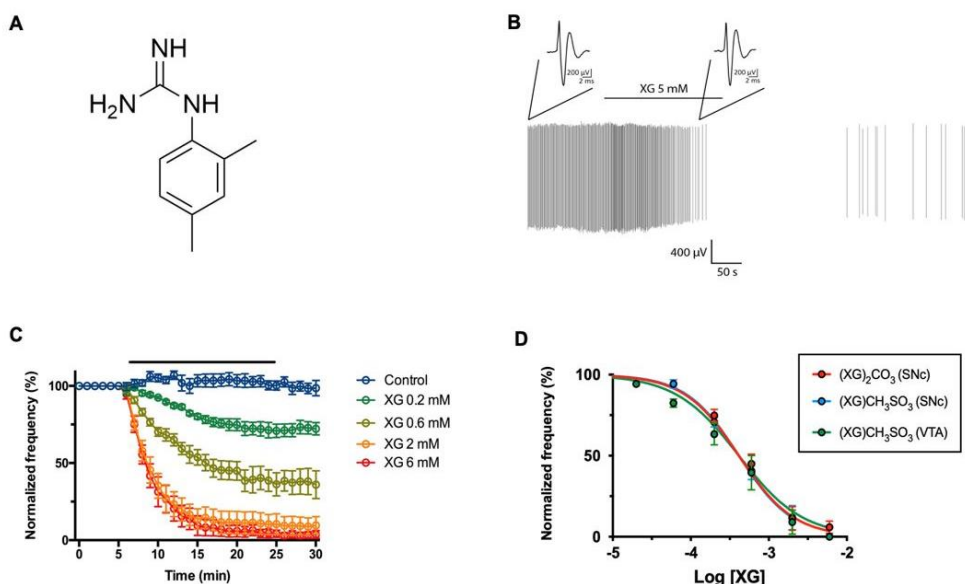


Figure 31 | Le XG inhibe l'activité pacemaker des neurones DA mésencéphaliques. **A** : Structure du XG. **B** : Trace d'un enregistrement extracellulaire reflétant l'activité spontanée d'un neurone DA. On remarque qu'il n'y a pas de modification des potentiels d'action avant et pendant l'application de XG. **C** : Graphique de l'évolution de la fréquence de décharge normalisée (en %) en fonction de la concentration de XG appliqué. Chaque point représente une moyenne $\pm$ SEM sur une minute. La fréquence normalisée correspond au rapport de la fréquence en t minute sur la fréquence avant l'application du XG. Le trait noir correspond à l'application de la condition. La condition contrôle (en bleu) correspond à l'application du LCRA sans XG (n = 6 pour toutes les conditions). **D** : Courbes concentration-réponse de la fréquence de décharge normalisée (en %) en fonction des concentrations de XG, la forme du sel et de la région. La forme carbonate dans la SNc est représentée en rouge, la forme mésylate dans la SNc est représentée en bleu et la forme mésylate dans l'ATV est représentée en vert. Chaque point correspond à une moyenne $\pm$ SEM (n = 6 pour les trois conditions).

Nous avons également réalisé des expériences en configuration cellule-attachée sur des souris, en collaboration avec le Professeur Jochen Roeper du « Institute of Neurophysiology » de l'université Goethe de Francfort, en Allemagne, afin de vérifier si l'inhibition par le XG dépendait de l'espèce. La méthode d'identification des neurones DA est décrite dans la partie méthode (**Fig. 32B**). Nous avons utilisé le XG à une concentration de 2 mM en raison de son IC_{50} dans les neurones DA (**Fig. 28C, D**). En configuration cellule-attachée, le XG diminue de la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc de 1.5 ± 0.2 Hz (1.9 ± 0.2 Hz en contrôle vs 0.5 ± 0.2 Hz sous 2 mM XG, $n = 12$, $p < 0.001$, Wilcoxon test), montrant que l'effet n'est pas spécifique à l'espèce (**Fig. 32A, C-D**). De plus, comme les neurones DA de la SNc constituent une population hétérogène, le degré d'inhibition a été associé à la localisation précise dans la SNc. Les données montrent que l'effet du XG est homogène au sein des neurones DA (**Fig. 32C**).

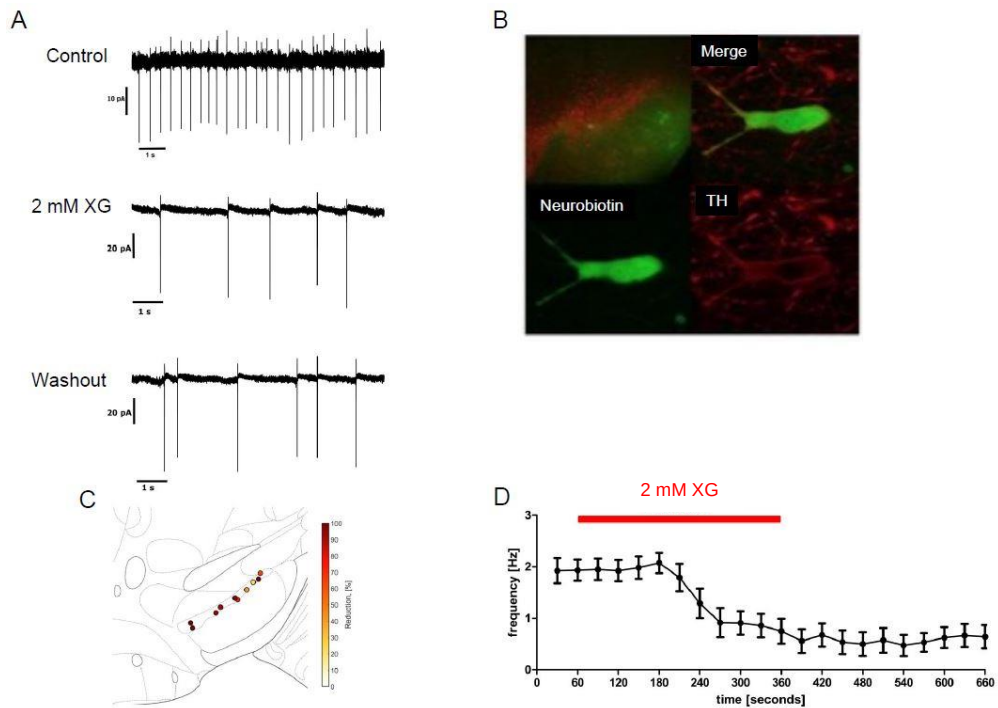


Figure 32 | Le XG inhibe l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc chez la souris en configuration cellule-attachée. **A** : Traces expérimentales de courants en potentiel-imposé. Les courants rapides observés correspondent à des potentiels d'action. **B** : Identification des neurones DA. En rouge sont représentés les neurones positifs à la TH, donc DA dans la SNc et en vert correspond le neurone dialysé avec de la neurobiotine. La co incidence des marquages confirme la nature DA des neurones. **C** : Localisation des neurones DA enregistrés dans la SNc. Le dégradé de couleur correspond au pourcentage d'inhibition. **D** : Evolution de la fréquence de décharge en fonction de l'application de XG. Chaque point correspond à une moyenne $\pm$ SEM (n = 12).

Nous avons ensuite réalisé des expériences pour évaluer l'effet du XG sur leur activité intrinsèque en configuration cellule-entière courant-imposé. Comme observé dans les autres expériences, il y a bien une diminution de la fréquence de décharge de ces cellules suite à une application extracellulaire de 2 mM XG (1.9 ± 0.2 Hz en contrôle vs 0.0 ± 0.0 Hz sous XG, $n = 8$, Wilcoxon test, $p < 0.01$; **Fig. 33, 34A**). Par ailleurs, l'application intracellulaire de 2 mM XG par l'intermédiaire de la solution intracellulaire entraîne également une diminution de la fréquence de décharge des neurones DA (1.9 ± 0.3 Hz en contrôle vs 0.0 ± 0.0 Hz sous XG, $n = 6$, Wilcoxon test, $p = 0.03$; **Fig. 34B**). Nous avons aussi vérifié la spécificité du XG en l'appliquant sur des neurones à pacemaker rapide comme les neurones GABAergiques de la SNr (**Fig. 36A**). La fréquence de décharge en contrôle est à 8.2 ± 1.1 Hz et sous XG, elle est à 8.5 ± 1.1 Hz ($n = 7$; **Fig. 36B**). Il n'y a pas de différence significative de fréquence de décharge dans les deux conditions, indiquant que le XG semble être spécifique des neurones à pacemaker lent (t-test, $p = 0.21$).

Le potentiel membranaire sous XG est de -55 à -50 mV, similaire au potentiel moyen de l'ISI, ce qui indique que l'inhibition de l'activité spontanée n'est pas due à une forte hyperpolarisation de la cellule. Nous avons confirmé cette observation en imposant le potentiel membrane à -50 mV, suivi d'un step hyperpolarisant à -60 mV. La conductance cellulaire ne varie pas avant et pendant l'application du XG, suivi d'un washout de la molécule (2.0 ± 0.2 nS en contrôle, 2.0 ± 0.2 nS sous 2 mM XG et 2.1 ± 0.2 nS en wash, $n = 8$ pour chaque condition, $p = 0.17$, ANOVA-1 ; **Fig. 35**).

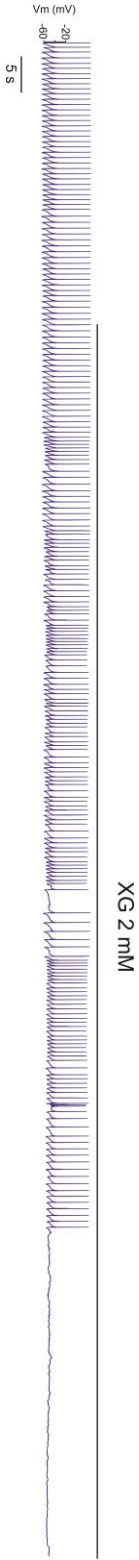


Figure 33 | Effet du XG sur l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc chez le rat en courant-imposé. On remarque que le potentiel membrane au moment de l'inhibition n'est pas hyperpolarisé, indiquant l'absence d'activation de courants sortants. On remarque également l'absence d'oscillations calciques.

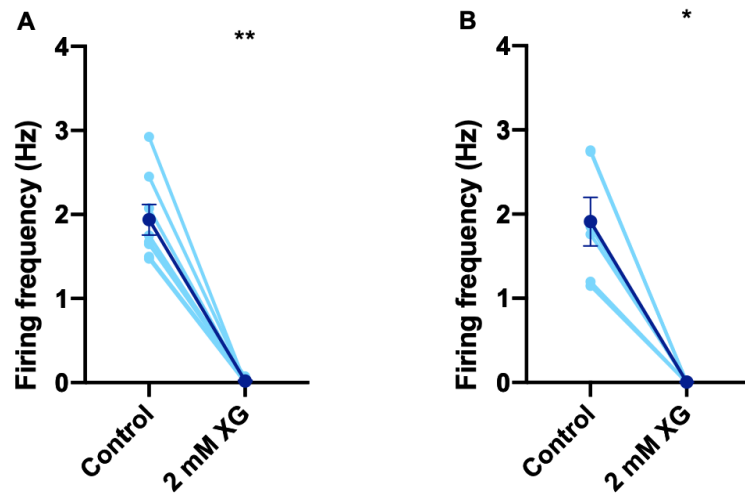


Figure 34 | L'application extracellulaire ou intracellulaire du XG inhibe l'activité autonome des neurones DA de la SNc. A : Fréquence de décharge avant et pendant l'application extracellulaire de 2mM XG. La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représentée en bleu foncé et les données individuelles en bleu clair (n = 8). **B :** Fréquence de décharge avant et pendant l'application intracellulaire de 2mM XG. La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représentée en bleu foncé et les données individuelles en bleu clair (n = 6).

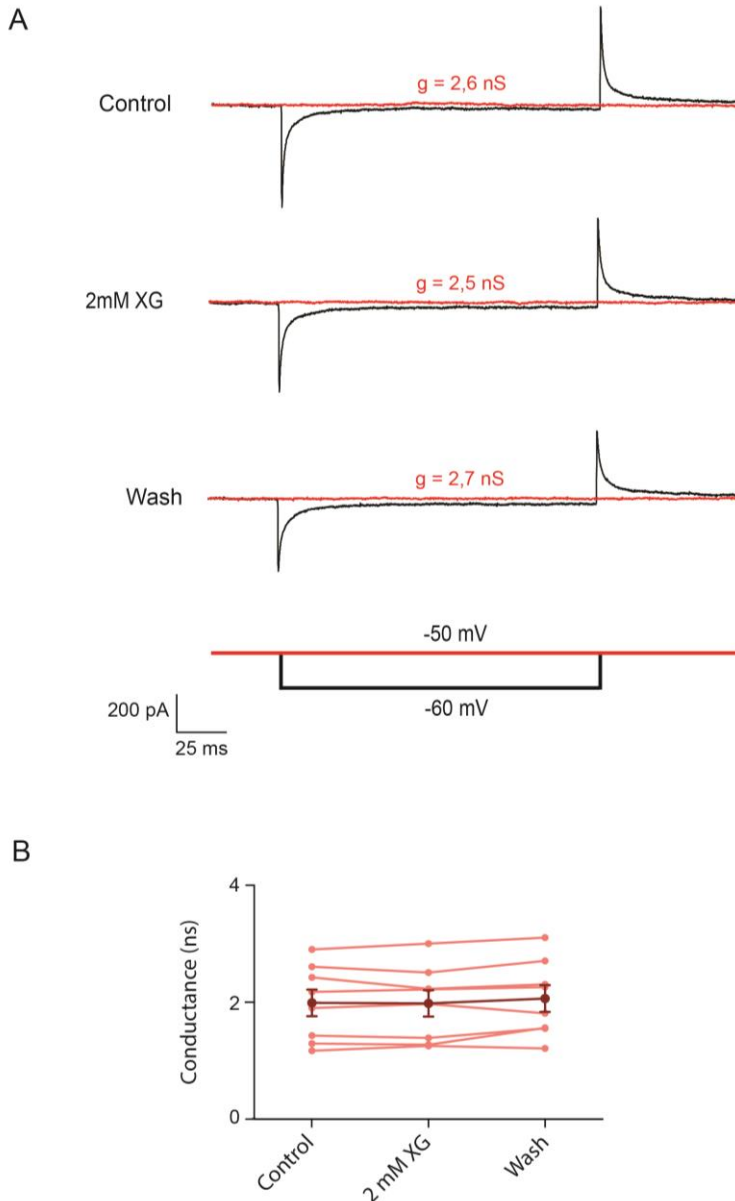


Figure 35 | Le XG n'augmente pas la conductance cellulaire. A : Enregistrements en potentiel-imposé. Le protocole est décrit en bas du panel. La conductance g s'obtient par le rapport de la différence de courant entre -50 et -60 mV sur la différence des potentiels ($g \text{ (nS)} = \Delta I \text{ (pA)} / \Delta V \text{ (mV)}$). **B :** Evolution de la conductance cellulaire sous XG 2 mM. La conductance cellulaire moyenne $\pm$ SEM est représenté en rouge foncé et les données individuelles en rouge clair ($n = 8$).

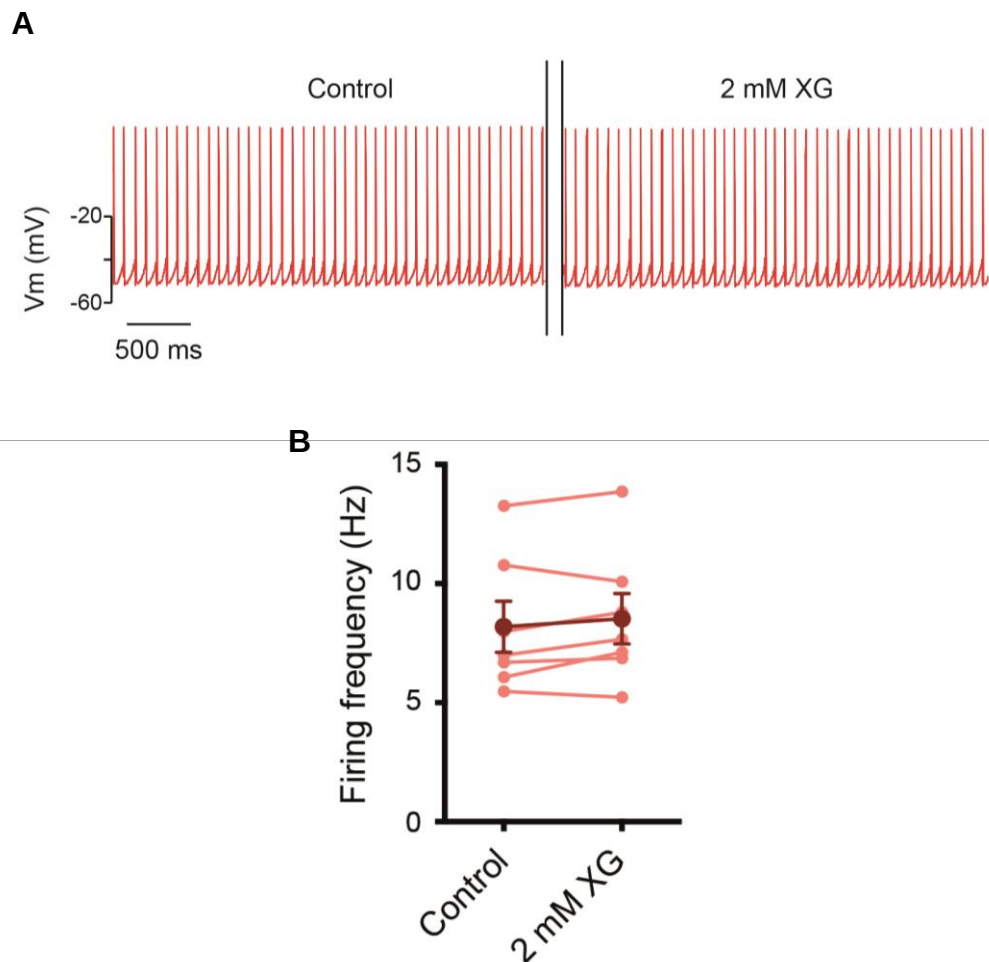


Figure 36 | Le XG n'affecte pas l'activité spontanée des neurones GABAergiques de la SNr. A : Traces expérimentales de potentiels en courant-imposé. **B :** Fréquence de décharge avec et pendant l'application de XG. La fréquence moyenne $\pm$ SEM est représentée en rouge foncé et les données individuelles en rouge clair ($n = 7$).

L'injection continue d'un courant entre 10 et 30 pA a permis de restaurer de manière artificielle une activité autonome dans les neurones DA de la SNc (**Fig. 37A**). Cette observation indique que l'inhibition de l'activité spontanée n'est pas due à un blocage des canaux Na_v par le XG, comme on pourrait l'observer en bloquant ces canaux par la TTX. Afin de vérifier l'effet sur les canaux voltage-dépendants intervenant dans un potentiel d'action, nous avons monitoré trois paramètres : le seuil de déclenchement (*threshold*), la pente de dépolarisation (*max slope*) et la durée du potentiel d'action à mi-hauteur (*half-width*) (**Fig. 37B**). Les deux premiers paramètres permettent d'avoir une vue sur le recrutement et la densité de canaux Na_v pour la dépolarisation et le dernier dépend du nombre et des types de canaux voltage-dépendants activés (Na_v , K_v et Ca_v). Pour cela, un protocole de pulses de courants allant de 0 à 50 pA pendant 2 s par échelle de 10 pA a été appliqué. L'application de 2 mM XG n'a pas influencé la valeur du seuil de déclenchement ($p = 0.88$), de la durée à mi-hauteur ($p = 0.30$) ou de la pente de dépolarisation ($p = 0.40$) des potentiels d'action aux différents sauts de courant ($n = 5$ toutes les conditions, ANOVA-2 ; **Fig. 37B, Tableau 2**). Pour l'analyse statistique, seules les valeurs à partir de 20 pA ont été considérées car, aux valeurs 0 pA et 10 pA, on n'observe pas toujours des potentiels d'action sous XG.

Nous avons également appliqué un protocole de sauts de 20 pA allant de 0 pA à 160 pA pendant 2 s afin de réaliser une courbe de fréquence de décharge en fonction du courant injecté (**Fig. 37C**). Pour chaque cellule, nous avons considéré les trois premiers potentiels d'action pour déterminer la fréquence et nous avons fait une régression linéaire pour déterminer la pente qui correspond au gain (**Fig. 34D**). Le gain permet de refléter l'excitabilité des neurones. Une augmentation de gain reflète une augmentation de l'excitabilité neuronale alors qu'une diminution du gain

reflète l'inverse. Nous n'avons pas observé de changement significatif dans le gain, indiquant que le XG n'affecte pas l'excitabilité neuronale (gain (68.6 ± 13.7 Hz/nA en condition contrôle vs 84.8 ± 11.6 Hz/nA sous 2 mM XG, $n = 6$, $p = 0.23$, t-test ; **Fig. 37D**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus de l'analyse des potentiels d'action. De plus, l'extrapolation des régressions linéaires obtenues a permis de déterminer l'intensité du courant minimal pour générer une activité pacemaker (**Fig. 37E**). En condition contrôle, le courant minimal est de -19.4 ± 7.6 pA alors que sous XG, le courant minimal est de 4.5 ± 2.3 pA ($n = 6$ pour les deux conditions, $p = 0.03$, t-test ; **Fig. 37E**). Dès lors, le XG bloque un courant d'une amplitude égale à -23.9 ± 8.2 pA. Ces résultats démontrent que l'inhibition de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc n'est pas due à une modulation des canaux ioniques voltage-dépendants impliqués dans la genèse des potentiels d'action, mais plutôt un blocage d'un petit courant essentiel à cette activité.

Enfin, nous avons voulu vérifier si le XG pouvait également affecter l'activité en bouffées des neurones DA de la SNc (**Fig. 38**). Pour évaluer l'effet du XG sur cette activité, nous avons évoqué des bouffées par ajout de NMDA (30 μ M), apamine (300 nM) et injection d'un courant négatif entre -80 pA et -120 pA (Destreel et al., 2019; Kitai et al., 1999; Seutin et al., 1993). L'intensité de courant varie d'une cellule à l'autre pour obtenir en moyenne cinq potentiels d'action par bouffées en condition basale et la même intensité a été maintenue tout au long de l'enregistrement. L'application de 2 mM XG n'a pas modifié le nombre de potentiels d'action par bouffées (4.7 ± 0.4 en contrôle vs 4.7 ± 0.3 sous XG, $n = 6$, $p = 0.9$, t-test ; **Fig. 38**).

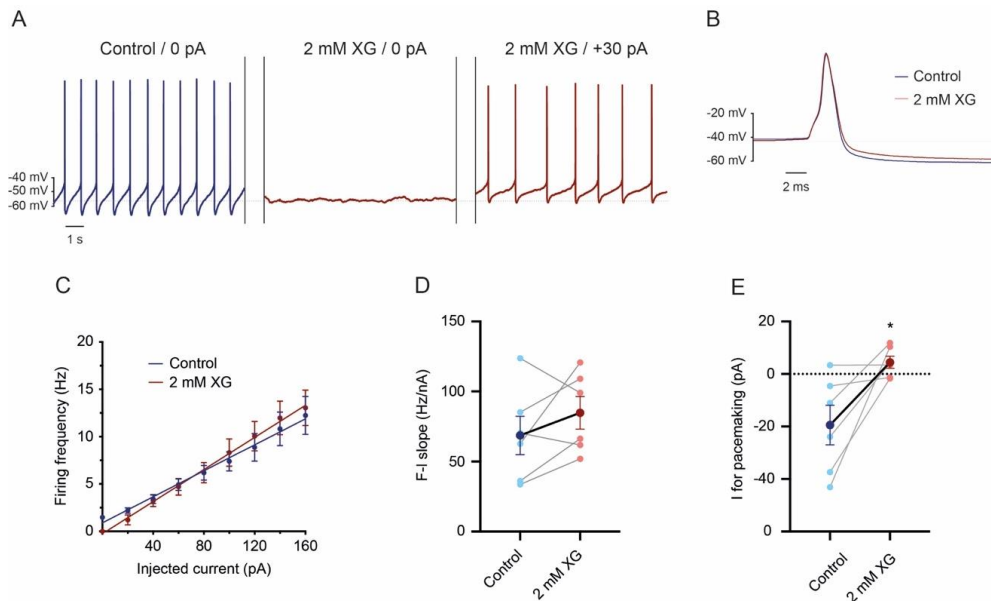


Figure 37 | Le XG ne module pas les canaux voltage-dépendants, mais bloque un courant de faible amplitude. **A** : Traces expérimentales en configuration courant-contrôlé. L'application d'un petit courant positif permet de restaurer l'activité spontanée. **B** : Superposition d'un potentiel d'action en condition contrôle (bleu) et sous XG (rouge) à + 30 pA injecté. **C** : Courbe de fréquence de décharge en fonction du courant injecté en condition contrôle (bleu) et sous XG (rouge) (n = 6). **D** : Pente des régressions linéaires individuelles des courbes de fréquence en fonction du courant (gain). Le gain moyen $\pm$ SEM est représenté en foncé et les valeurs individuelles en clair (n = 6). **E** : Valeur de l'intensité du courant minimal pour générer une activité spontanée. Les valeurs moyennes $\pm$ SEM sont représentées en foncé et les valeurs individuelles en clair (n = 6).

	0 pA		10 pA		20 pA		30 pA		40 pA		50 pA	
	Control	XG	Control	XG	Control	XG	Control	XG	Control	XG	Control	XG
Half-width (ms)	2.00 ± 0.25 n = 5	-	1.98 ± 0.15 n = 5	1.98 ± 0.19 n = 4	1.96 ± 0.15 n = 5	2.17 ± 0.17 n = 5	2.13 ± 0.2 n = 5	2.23 ± 0.17 n = 5	2.24 ± 0.16 n = 5	2.33 ± 0.13 n = 5	2.14 ± 0.21 n = 5	2.32 ± 0.16 n = 5
Max slope (ms)	83.44 ± 10.47 n = 5	-	79.04 ± 8.33 n = 5	92.12 ± 11.38 n = 4	74.40 ± 7.49 n = 5	78.67 ± 11.87 n = 5	69.79 ± 7.04 n = 5	74.34 ± 10.88 n = 5	60.00 ± 7.38 n = 5	68.97 ± 9.82 n = 5	65.31 ± 5.16 n = 5	58.17 ± 7.33 n = 5
Threshold (mV)	-35.13 ± 1.90 n = 5	-	-33.86 ± 2.34 n = 5	-35.64 ± 2.71 n = 4	-34.05 ± 1.98 n = 5	-33.32 ± 2.54 n = 5	-32.65 ± 2.13 n = 5	-32.46 ± 2.91 n = 5	-31.57 ± 2.43 n = 5	-32.53 ± 1.83 n = 5	-32.62 ± 1.81 n = 5	-39.68 ± 2.01 n = 5

Tableau 21 Valeurs des paramètres des potentiels d'action, en contrôle et sous XG, à diverses intensités de courant. Une ANOVA-2 a été réalisée à partir de 20 pA car à cette valeur, nous avons pu observer des potentiels d'action dans toutes les cellules enregistrées sous XG.

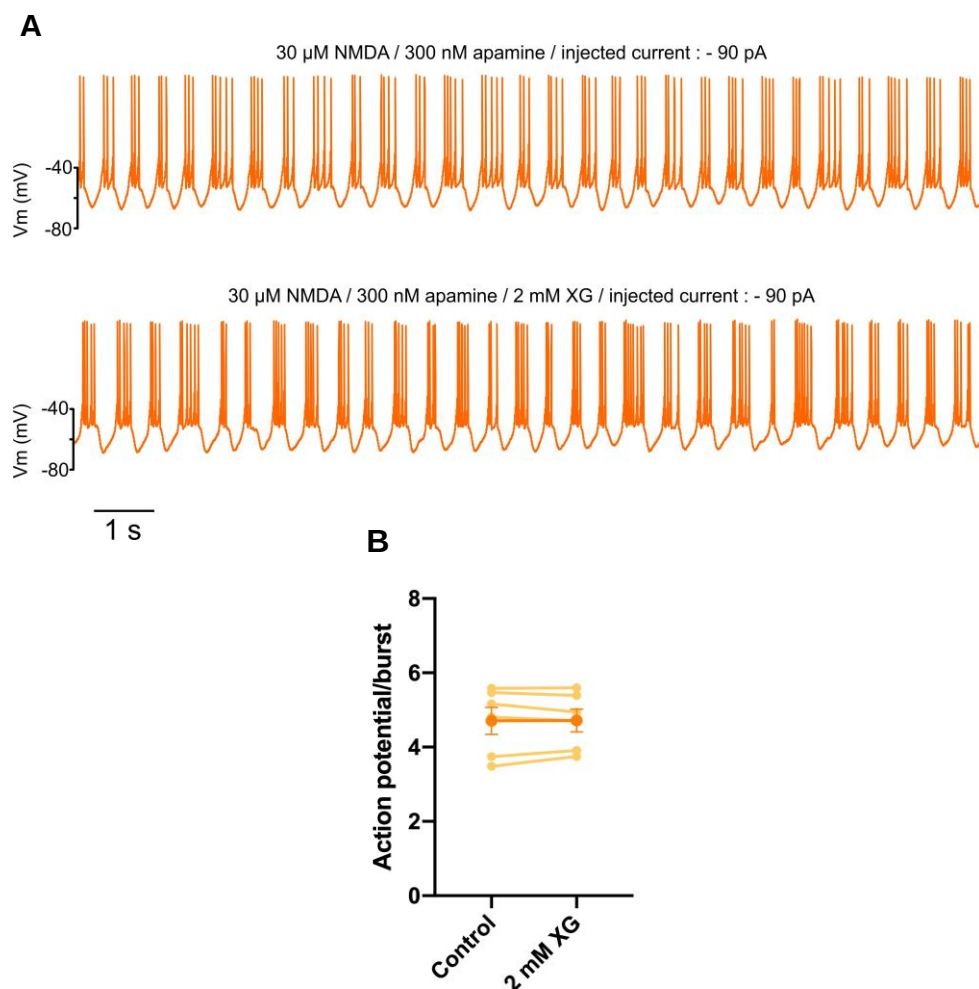


Figure 38 | Le XG n'affecte pas l'activité de décharge en bouffées des neurones DA de la SNc. A : Traces expérimentales du mode de décharge en bouffées induit par application de NMDA (30 μ M) et apamine (300 nM) et injection de courant négatif en condition contrôle (haut) et sous XG (2 mM, bas). **B :** Nombre de potentiels d'action. Les valeurs moyennes $\pm$ SEM sont représentées en orange foncé et les valeurs individuelles en orange clair (n = 6).

Ces résultats sont cohérents car le mécanisme de génération de décharge en bouffées est différent de celui à l'origine de l'activité spontanée régulière. Dès lors, l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie montre que le XG est capable d'inhiber sélectivement l'activité autonome régulière des neurones DA de la SNc en bloquant un courant de très faible amplitude.

3.2.2. Rôle de la conductance sensible au XG dans la modulation de l'activité spontanée

Dans les neurones DA de la SNc, il a été montré que l'activité pacemaker est due à une combinaison de différentes conductances, étant donné que le blocage de canaux Na_v ou Ca_v uniquement est insuffisant pour complètement bloquer toute activité spontanée (Drion et al., 2011; Guzman et al., 2009; Kang and Kitai, 1993). Dans nos enregistrements en courant-contrôlé, nous avons remarqué qu'il n'y avait pas de phénomènes oscillatoires comme on peut l'observer en appliquant de la TTX pour bloquer les canaux Na_v (**Fig. 10**). Dès lors, nous avons vérifié si les pores sensibles au XG peuvent faciliter différents phénomènes oscillatoires dans les neurones DA de la SNc. Dans un premier temps, nous avons appliqué de la TTX (1 μM) pour isoler les oscillations (**Fig. 39A**). L'application de nifédipine (5 μM) a permis d'inhiber ces oscillations, indiquant qu'elles sont médiées par des canaux Ca_v de type L (**Fig. 39A**), en accord avec qui a été montré dans la littérature (Guzman et al., 2009; Sun et al., 2017). L'application de 2 mM XG entraîne une inhibition de ces oscillations ($n = 6$; **Fig. 39B**). Nous avons ensuite vérifié si le XG était toujours capable d'inhiber l'activité rythmique en l'absence des oscillations médiées par les canaux Ca_v de type L. Nous avons commencé par appliquer de la nifédipine (5 μM) afin de les bloquer et nous n'avons pas observé de changement dans la fréquence de décharge (2.0 ± 0.2 Hz en contrôle vs 1.8 ± 0.2 Hz

sous nifédipine, $n = 6$, $p = 0.25$, Friedman test ; **Fig. 39C, D**). Ces résultats sont en accord avec la littérature (Drion et al., 2011; Guzman et al., 2009). L'application de 2 mM de XG entraîne également une inhibition quasi-complète de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc (0.1 ± 0.0 Hz sous nifédipine + 2 mM XG vs nifédipine seule, $p = 0.0433$, Friedman test ; **Fig. 39C, D**). Ces résultats suggèrent fortement que le courant sensible au XG est indispensable au recrutement de différents types de canaux ioniques dépolarisant qui sous-tendent les phénomènes oscillatoires dans les neurones DA de la SNc.

Comme évoqué dans l'introduction, $g_{pacemaker}$ pourrait être la résultante d'une annulation quasi-parfaite des courants entrants et sortants impliqués dans le maintien de la régularité de l'activité spontanée des neurones DA. Pour rappel, cette régularité est médiée par une coopérativité des canaux $K_v4.3$, $Ca_v1.3$, Na_v et HCN. Nous avons déjà montré que le blocage simultané des Ca_v de type L et N, SK et HCN n'entraîne pas une diminution de l'activité spontanée (**Fig. 23A**). Ces résultats tendent à réfuter cette hypothèse. Dès lors, nous avons vérifié d'une part si bloquer les canaux $K_v4.3$ avec les $Ca_v1.3$ et HCN pouvait impacter la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc et si le XG était encore capable d'inhiber leur activité intrinsèque. L'application des bloqueurs respectifs de ces canaux, à savoir du 4-aminopyridine (4-AP, 4 mM), isradipine (5 μ M) et ZD 7288 (30 μ M) n'altère pas la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (1.53 ± 0.15 Hz en contrôle vs 2.54 ± 0.64 Hz sous 4 mM 4-AP, 5 μ M isradipine and 30 μ M ZD 7288, $n = 6$ pour chaque condition, $p = 0.10$, ANOVA-1 ; **Fig. 40A, B**). L'ajout de 2 mM XG à l'ensemble des bloqueurs entraîne une diminution de la fréquence de décharge ces neurones (0.02 ± 0.01 Hz sous XG avec les bloqueurs vs les bloqueurs seuls, $n = 6$, $p = 0.02$, ANOVA-1 ; **Fig. 40A, B**).

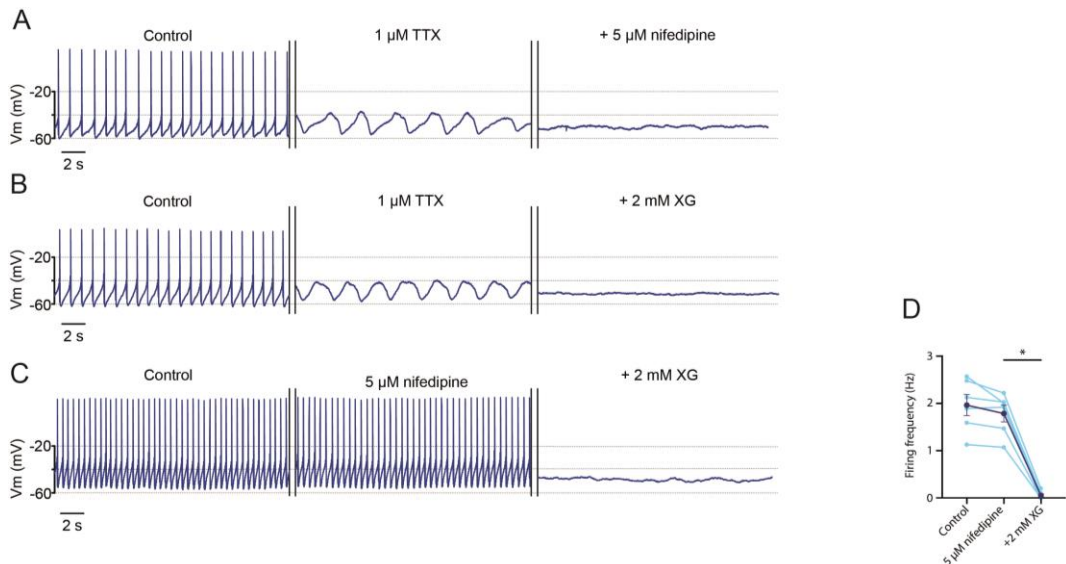


Figure 39 | Effet du XG sur les oscillations calciques des neurones DA de la SNc.

A : Traces expérimentales de l'activité spontanée en contrôle (gauche), sous TTX (1 μ M, milieu) et sous nifédipine (5 μ M, droite). Les oscillations du potentiel membranaire sous TTX disparaissent après ajout de nifédipine, indiquant que ces oscillations sont médiées par des canaux Ca_v de type L ($n = 6$). **B :** Traces expérimentales de l'activité spontanée en contrôle (gauche), sous TTX (1 μ M, milieu) et sous XG (5 μ M, droite). Les oscillations du potentiel membranaire sous TTX disparaissent après ajout de XG ($n = 6$). **C :** Traces expérimentales de l'activité spontanée en contrôle (gauche), sous nifédipine (5 μ M, milieu) et sous XG (2 μ M, droite). Même en l'absence de ces oscillations sensibles à la nifédipine, le XG est capable d'inhiber l'activité spontanée des neurones DA de la SNc. **D :** Evolution de la fréquence de décharge après ajout de nifédipine (5 μ M) et XG (2 mM). Les valeurs moyennes $\pm$ SEM sont représentées en bleu foncé et les valeurs individuelles en bleu clair ($n = 6$). La nifédipine n'influence pas la fréquence de décharge alors que le XG, même sous nifédipine, est capable d'inhiber l'activité spontanée des neurones DA de la SNc.

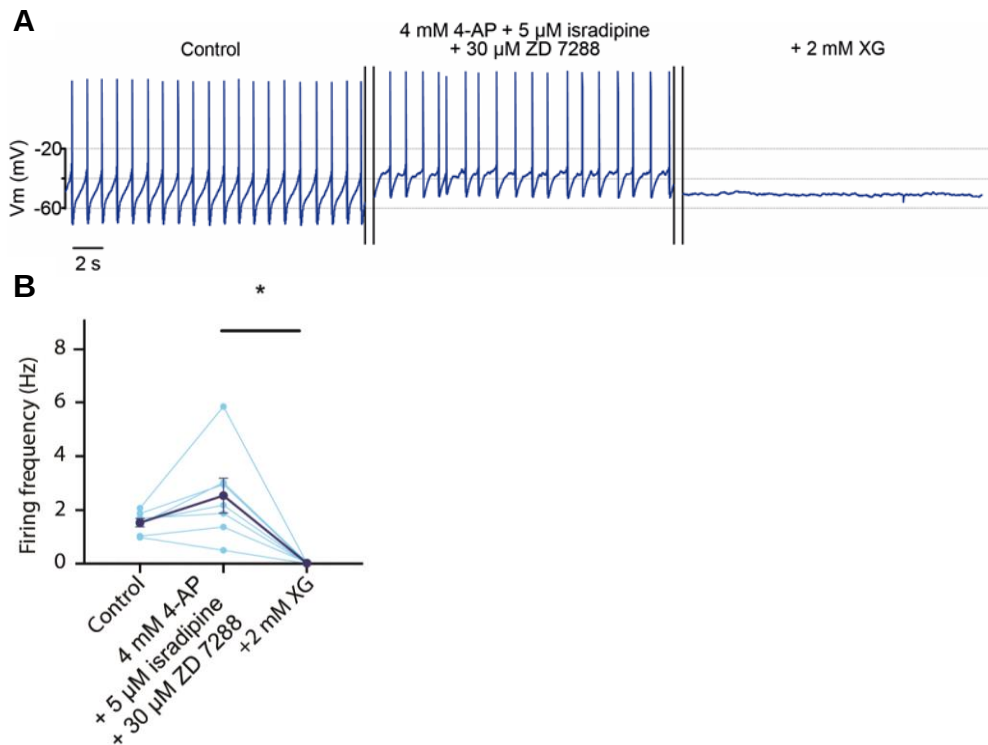


Figure 40 | Effet du XG sur l'activité spontanée des neurones DA de la SNc en l'absence de coopérativité des canaux $K_v4.3$, $Cav1.3$ et HCN. **A :** Traces expérimentales de l'activité spontanée en contrôle (gauche), sous 4-AP (4 mM), isradipine (5 μ M) et ZD 7288 (30 μ M, milieu) et sous XG (2 mM, droite). Le blocage des canaux $K_v4.3$, $Cav1.3$ et HCN n'influence pas la fréquence de décharge, tandis que le blocage des pores sensibles au XG inhibe l'activité intrinsèque de ces neurones. **B :** Evolution de la fréquence de décharge après ajout de 4-AP (4 mM), isradipine (5 μ M), ZD 7288 (30 μ M) et XG (2 mM). Les valeurs moyennes $\pm$ SEM sont représentées en bleu foncé et les valeurs individuelles en bleu clair ($n = 6$). Les canaux impliqués dans les phénomènes de coopérativité étant bloqués, I_{pace} est sans doute médié par les pores sensibles au XG.

Ces résultats indiquent que ce sont les pores sensibles au XG qui sont les médiateurs de l'activité pacemaker dans les neurones DA de la SNc, plutôt que la coopérativité entre des canaux $K_v4.3$, $Ca_v1.3$ et HCN.

Enfin, nous nous sommes à nouveau intéressés aux canaux NALCN. Nos expériences en Gd^{3+} ont montré que le blocage de ces canaux n'affectent pas l'activité spontanée des neurones DA, bien qu'un modèle de souris NALCN^{-/-} indique que 70% des neurones DA de la SNc voient leur activité intrinsèque inhibée (Philippart and Khaliq, 2018). Comme le Gd^{3+} n'est pas un bloqueur sélectif des canaux NALCN (Boone et al., 2014), nous avons vérifié si le XG interagit avec ces canaux. En collaboration avec le Professeur Stephan Alexander Pless du « Department of Drug Design and Pharmacology » de l'Université de Copenhague, Danemark, nous avons fait exprimer, de façon hétérologue, le complexe NALCN (NALCN, UNC80, UNC79 et FAM155A) dans des oocytes de *Xenopus laevis*. Nous avons ensuite réalisé des enregistrements en potentiel-imposé avec deux électrodes. Le détail de ces méthodes sont décrits dans cette publication (Chua et al., 2020a). Cependant, nous avons seulement observé une faible diminution des courants NALCN sous XG (37 ± 3.9 % d'inhibition à -100 mV sous 3 mM XG, $n = 6$) alors que 10 μM Gd^{3+} inhibe fortement ces courants (74 ± 9.3 % d'inhibition à -100 mV, $n = 6$; **Fig. 41**). Dès lors, l'effet du XG sur l'activité spontanée des neurones DA n'est probablement pas dû à une inhibition des canaux NALCN.

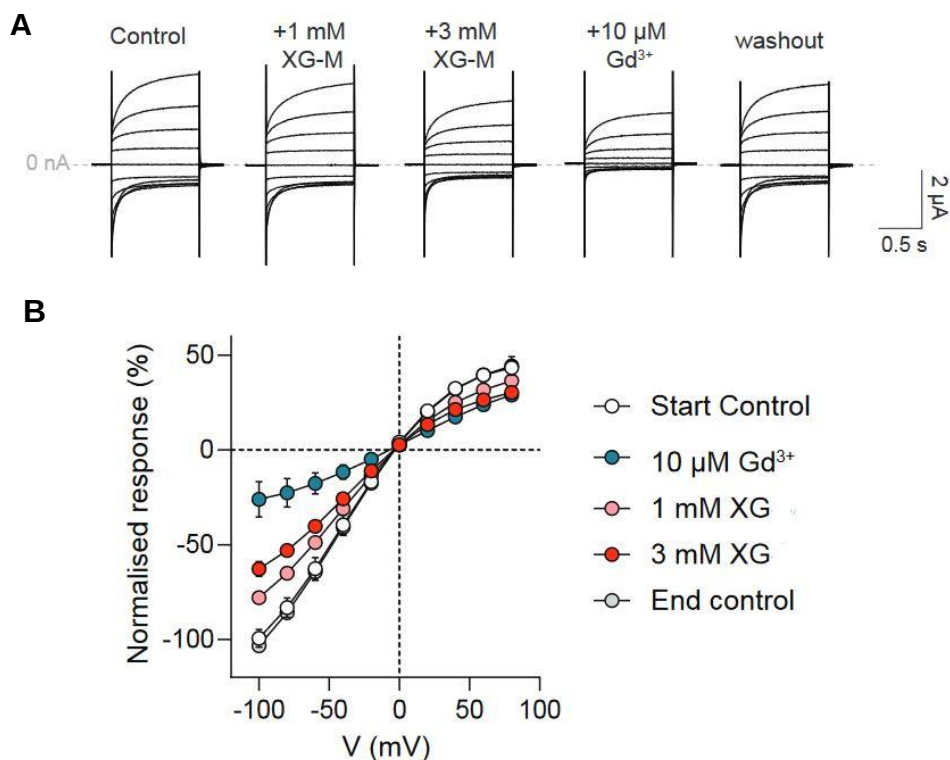


Figure 41 | Effet du XG les courants NALCN. **A :** Traces expérimentales des courants NALCN en condition contrôle, sous XG (1 et 3 mM), Gd^{3+} (10 μM) et après washout des composés. **B :** Courants relatifs en fonction du potentiel ($n = 6$). Le XG réduit très peu les courants NALCN, contrairement au Gd^{3+} , indiquant que l'inhibition de l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc par le XG n'est pas médié par un blocage de ces canaux.

3.3. Mise en évidence de pores ω

Jusqu'à présent, nous avons démontré que le XG inhibe de façon sélective des canaux, pour le moment non identifiés, essentiels pour la genèse de l'activité autonome des neurones DA de la SNc. Etant donné que le XG bloque des pores ω sans affecter le pore α de canaux Na_v mutants (Sokolov et al., 2010), nous avons émis l'hypothèse que les neurones DA de la SNc expriment une catégorie de canaux ioniques à définir qui présentent des pores ω physiologiques et sensibles au XG nécessaire pour leur activité spontanée. A ce jour, de tels pores physiologiques n'ont été décrits que pour les canaux K_v3 chez les invertébrés, mais aucune étude n'a démontré leurs impacts sur l'excitabilité neuronale (Klassen et al., 2008). Pour rappel, les pores ω sont générés à la suite d'une mutation d'une arginine dans un S4 en un acide aminé neutre (Sokolov et al., 2007; Tombola et al., 2005a), ce qui peut créer un petit courant entrant à des potentiels hyperpolarisés ou un courant sortant à des potentiels dépolarisés (Held et al., 2016; Jiang et al., 2018) (**Fig. 26**). Dans le contexte de l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc, I_ω entrant est plus plausible pour maintenir une telle activité. Dès lors, nous avons tenté de mettre en évidence I_ω et d'identifier de potentiels candidats moléculaires codant pour de tels courants dans ces neurones.

Tout d'abord, nous avons réalisé des enregistrements en potentiel-imposé afin d'isoler un courant sensible au XG (I_{XG}). Comme il a été montré que I_ω entrant était prédominant à un potentiel hyperpolarisé (entre -150 et -100 mV) (Moreau et al., 2014; Sokolov et al., 2010). Dès lors, nous avons appliqué un protocole de rampe de voltage, qui consiste à augmenter de manière graduelle le potentiel membranaire, allant de -100 à 0 mV à une vitesse de 25 mV/s. Nous avons ajouté de la TTX (1 μM), TEA (20 mM), Cd^{2+} (200 μM) et Cs^+ (2.5 μM) pour bloquer respectivement les canaux Na_v ,

K^+ (une majorité de K_v et des canaux comme SK), Ca_v et I_h , en plus des bloqueurs synaptiques. Nous avons préféré le Cs^+ pour bloquer I_h au ZD 7288, car les enregistrements étaient plus stables lors de l'application de XG. La soustraction du courant en contrôle par le courant sous XG permet de révéler le courant sensible au XG. Nous n'avons pas observé de courant sensible au XG à des potentiels hyperpolarisés similaires à I_ω ($n = 5$, **Fig. 42**). Cependant, nous avons observé un petit courant entrant sensible au XG aux alentours de -55 mV jusqu'à des valeurs de potentiels moins négatifs. Ce courant apparaît dans un intervalle de potentiel correspondant à celui du ISI, suggérant que I_{XG} pourrait correspondre au I_{pace} (Khaliq and Bean, 2010). En plus, l'allure de I_{XG} ne coïncide pas avec un courant semblable à I_ω . En effet, l'amplitude de I_ω diminue en s'approchant du seuil de déclenchement des potentiels d'action car l'activation de canaux voltage-dépendants présentant des pores ω ferment ces pores (Held et al., 2016).

En parallèle, nous avons cherché à mettre en évidence des variants de S4 de divers canaux ioniques. Cependant, les pores ω ont principalement été décrits dans un contexte de canalopathies, avec des mutations au niveau de l'ADN. Dans les neurones DA, aucune étude n'a montré la présence de tels courants lors de travaux de caractérisation d'une famille de canaux ioniques (Khaliq and Bean, 2008; Neuhoff et al., 2002; Philippart et al., 2016; Seutin and Engel, 2010). Dès lors, nous pensons qu'un variant au niveau génomique est peu probable. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'ARN messager, qui peut être édité par une enzyme appelée « *type -2 adenosine deaminase acting on RNA enzyme* » ou ADAR2. Cette enzyme est capable de convertir une adénosine en ionosine par déamination et l'ionosine sera lue par un ARN de transfert comme une guanosine (Keegan et al., 2001). Un tel mécanisme est présent dans les

neurones DA de la SNc et modifie les propriétés biophysiques des canaux $\text{Ca}_v1.3$ en agissant sur le domaine IQ de ces canaux, responsable de l'inactivation par le Ca^{2+} (Huang et al., 2012). Parmi les six codons de l'arginine (CGU, CGG, CGC, CGA, AGA et AGG), deux peuvent être édités pour donner une glycine (AGA $\rightarrow$ GGA ou GGG et AGG $\rightarrow$ GGG). Nous avons isolé la SNc et réalisé un séquençage de divers ARN messenger codant pour la partie S4 de plusieurs canaux ioniques pour mettre en évidence une éventuelle édition des S4 dans les neurones DA de la SNc ($n = 2$; **Tableau 3**). Comme contrôle négatif, nous avons séquençé les mêmes ARN messenger des neurones du cortex, non pacemaker et comme contrôle positif, nous avons séquençé l'ARN messenger du domaine IQ des canaux $\text{Ca}_v1.3$. Même si certains canaux présentent des variants au niveau ARN messenger, le fait de trouver le même pourcentage dans la SNc et le cortex indique que ces résultats ne sont pas spécifiques et donc, les canaux étudiés ne présentent pas d'indice de la présence de I_ω responsable de l'activité pacemaker des neurones DA de la SNc. Cette approche n'est pas optimale car les microdissections de la SNc contiennent également des neurones non-DA. Une approche plus appropriée est le « patch-seq », qui consiste à réaliser des enregistrements électrophysiologiques d'un neurone, suivi d'un prélèvement du cytoplasme avec l'électrode d'enregistrements, et réaliser un séquençage de l'ARN messenger (ou *RNAseq*) (Cadwell et al., 2015).

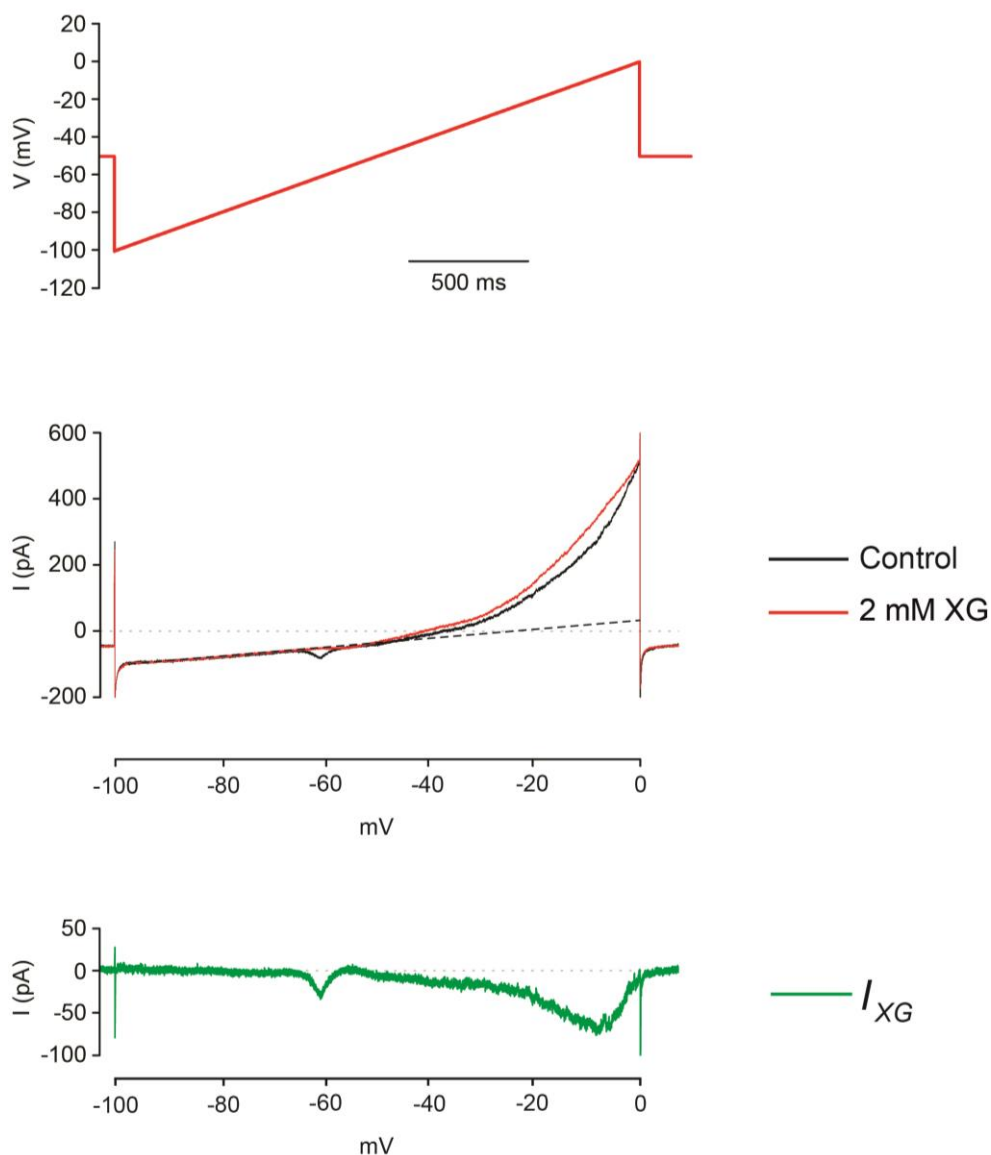


Figure 42 | Mise en évidence d'un courant sensible au XG. Dans le panel du haut est représenté le protocole de rampe de voltage utilisé. Au milieu sont montrées les réponses en courant en condition contrôle (noir) et sous XG (rouge) ($n = 5$). Le trait oblique discontinu permet d'obtenir la résistance d'entrée, qui est de 935 M Ω . En bas est montré le courant sensible au XG par soustraction du contrôle par la trace sous XG. On remarque l'absence de courant entrant à des potentiels hyperpolarisés et un courant entre -45 et 0 mV.

		0		1		2		3		4		5	
		SNC	Correx	SNC	Correx	SNC	Correx	SNC	Correx	SNC	Correx	SNC	Correx
SCM1A	SA.1	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	-	-
	SA.2	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	K (100 %)	
	SA.3	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-	
	SA.4	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	
SCM2A	SA.1	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	K (100 %)	
	SA.2	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	R (100 %)	-	-	
	SA.3	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-	
	SA.4	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (98 %)/G (2 %)	R (98 %)/G (2 %)	R (100 %)	-	K (100 %)	
SCM8A	SA.1	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	-	
	SA.2	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	
	SA.3	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-	
	SA.4	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	
CACM1B	SA.1	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	-	
	SA.2	K (100 %)	-	R (100 %)	n.a.	R (100 %)	n.a.	R (100 %)	n.a.	n.a.	-	n.a.	
	SA.3	-	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	
	SA.4	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-	
CACM1C	SA.1	K (100 %)	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	R (100 %)	
	SA.2	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-	
	SA.3	K (100 %)	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-	
	SA.4	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	
CACM1D	SA.1	K (100 %)	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-	
	SA.2	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
	SA.3	n.a.	n.a.	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	n.a.	n.a.	-	-	
	SA.4	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	-	-	
HCN3	SA	K (100 %)	-	R (98 %)/G (2 %)	R (98 %)/G (2 %)	R (93 %)/R (7 %)	R (95 %)/R (5 %)	R (96 %)/K (4 %)/G (0 %)	R (96 %)/R (4 %)/G (0 %)	K (99 %)/R (1 %)	-	-	
	SA	K (100 %)	-	R (98 %)/G (2 %)	R (98 %)/G (2 %)	R (93 %)/R (7 %)	R (95 %)/R (5 %)	R (96 %)/K (4 %)/G (0 %)	R (96 %)/R (4 %)/G (0 %)	K (99 %)/R (1 %)	-	-	
HCN4	SA	K (100 %)	-	R (97 %)/G (3 %)	R (97 %)/G (3 %)	R (93 %)/R (7 %)	R (95 %)/R (5 %)	R (96 %)/K (4 %)/G (0 %)	R (96 %)/R (4 %)/G (0 %)	K (99 %)/R (1 %)	-	-	
	SA	K (100 %)	-	R (97 %)/G (3 %)	R (97 %)/G (3 %)	R (93 %)/R (7 %)	R (95 %)/R (5 %)	R (96 %)/K (4 %)/G (0 %)	R (96 %)/R (4 %)/G (0 %)	K (99 %)/R (1 %)	-	-	
CACM1DQ	I / M	68 % / 32 %	81 % / 19 %										
	Q / R	97 % / 3 %	99 % / 1 %										
	Y / C	78 % / 23 %	87 % / 13 %										

Tableau 3 | Pourcentage distribution des acides aminés senseurs de voltage. Le pourcentage d'édition du domaine IQ correspond à ce qui est observé dans la littérature (Huang et al., 2012).

4. Caractérisation de la conductance sensible au XG

4.1. Isolation de I_{XG} dans l'activité spontanée

Bien que les résultats tendent à montrer qu'il n'y a pas de I_w dans les neurones DA de la SNc, nous avons réussi à isoler un courant sensible au XG (I_{XG} ; **Fig. 42**). Ce courant de très faible amplitude pourrait correspondre à $g_{pacemaker}$ décrit par Khaliq et Bean car il est activé pendant le ISI (Khaliq and Bean, 2008). Dès lors, nous avons voulu isoler I_{XG} au niveau de l'activité spontanée des neurones DA en réalisant des enregistrements en « pacemaker-clamp ». Ces enregistrements consistent à utiliser l'activité spontanée des cellules comme commande de voltage pour enregistrer les courants qui en découlent. Nous avons effectué ces enregistrements en présence de TTX, TEA et Cd^+ (en plus des bloqueurs synaptiques). Nous avons observé, en condition physiologique, un I_{XG} entrant qui s'active aux alentours de -40 mV avec une amplitude max à -30 mV de -23.9 ± 6.1 pA ($n = 6$; **Fig. 43**).

4.2. Nature ionique de I_{XG}

Au vu des solutions utilisées, ce courant entrant peut être d'origine Na^+ ou/et Ca^{2+} . Dès lors, nous avons cherché à caractériser la nature ionique de I_{XG} en substituant l'ion étudié. La composition exacte des solutions utilisées est décrite dans les méthodes.

Dans un premier temps, nous avons réduit la concentration de Ca^{2+} externe à 0.1 mM et nous avons quantifié l'amplitude de I_{XG} ($n = 6$; **Fig. 44A, B**). Nous n'avons pas observé de changement significatif dans l'amplitude du courant par rapport à la condition physiologique à -30 mV (-23.9 ± 6.1 pA en physiologique vs -20.7 ± 2.6 en Ca^{2+} réduit, ANOVA-1, $p = 0.83$; **Fig. 44C**). Dès lors, I_{XG} n'a pas de composante Ca^{2+} .

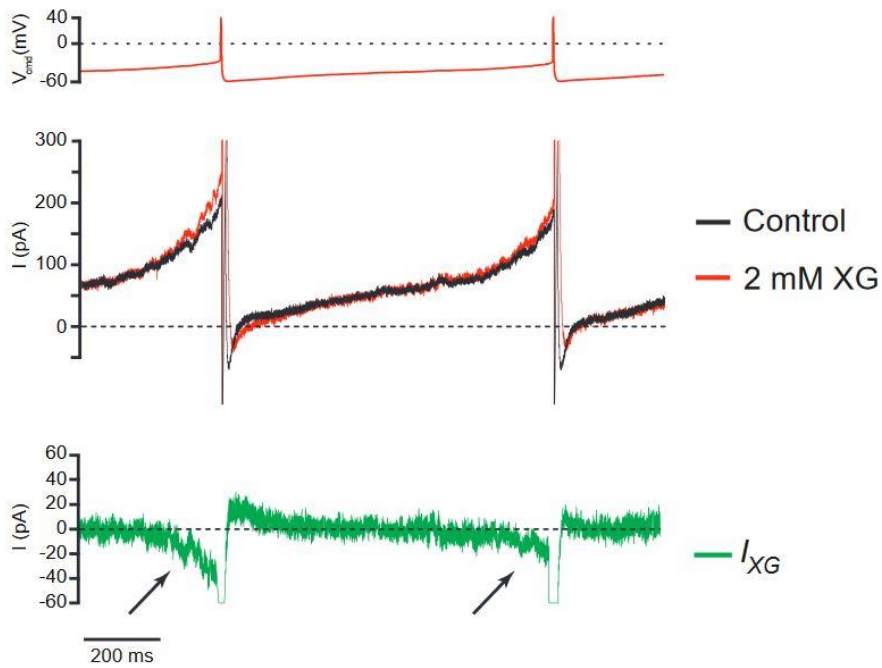
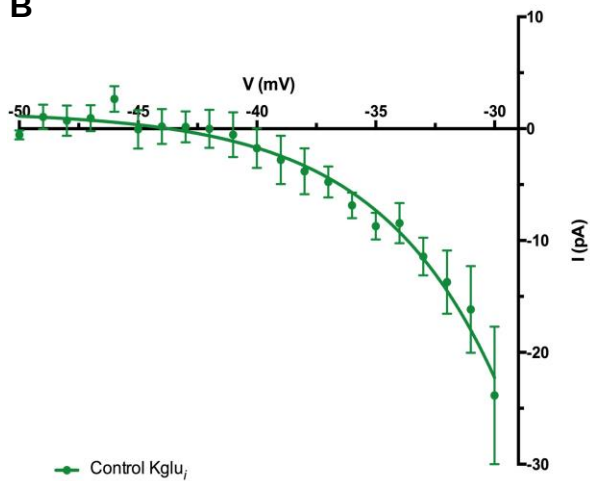
A**B**

Figure 43 | Isolation de I_{XG} en pacemaker-clamp. A : Dans le panel du haut est représentée la commande de voltage utilisée, au milieu sont montrées les réponses en courant en condition contrôle (noir) et sous XG (rouge) et en bas est montré le courant sensible au XG par soustraction du contrôle par la trace sous XG. **B :** Courbe courant-voltage de I_{XG} ($n = 6$).

Pour confirmer la nature sodique de I_{XG} , le Na^+ a été substitué par la choline pour maintenir le nombre de charges positives constant. Par ailleurs, de l'atropine 10 μM a été ajouté pour éviter une activation non spécifique des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine ($n = 6$; **Fig. 44A, B**). De manière surprenante, la substitution du Na^+ a changé la nature du courant : en effet, I_{XG} devient sortant (30.5 ± 3.0 pA en choline vs -23.9 ± 6.1 pA en physiologique à -30 mV, ANOVA-1, $p < 0.0001$; **Fig. 44C**). Vu que le coefficient de Hill a une valeur proche de 1 dans les expériences d'enregistrements extracellulaires (**Fig. 31D**), ce courant sortant serait généré par le même canal qui sous-tend le courant entrant. En plus d'être perméable au Na^+ , le canal responsable de I_{XG} serait perméable à, au moins, un autre ion.

Nous avons commencé par vérifier si le K^+ était responsable de la composante sortante de I_{XG} en le remplaçant par du Cs^+ , toujours en condition choline en extracellulaire ($n = 5$). Le courant sortant persiste toujours et son amplitude n'est pas significativement différente de celle observée précédemment (28.8 ± 2.6 pA en Cs^+ vs 30.5 ± 3.0 pA en choline à -30 mV, ANOVA-1, $p = 0.83$; **Fig. 44C**). Le K^+ n'est donc pas l'ion qui sous-tend ce courant sortant.

Au vu des solutions utilisées, le Cl^- a été envisagé car, sur base de l'équation de Nernst, son potentiel de réversion est aux alentours de -45 mV. Ce qui veut dire qu'à des potentiels supérieurs à cette valeur, les courants Cl^- sont sortants. Nous avons donc augmenté sa concentration intracellulaire pour amener son potentiel de réversion à 0 mV ($n = 5$; **Fig. 44A, B**). Dans ces conditions, les courants Cl^- sont entrants dans l'ISI. Nous avons observé un changement du sens du courant, passant de sortant (-62.1 ± 6.5 pA en Cl^-_{in} élevé en choline vs 30.5 ± 3.0 pA en Cl^-_{in} bas en

choline à -30 mV, ANOVA-1, $p < 0.0001$; **Fig. 44C**). Dès lors, I_{XG} est de nature sodique et chlore.

Nous avons également enregistré en condition Cl^-_{in} élevé en présence de Na^+ afin d'observer si l'amplitude de I_{XG} est augmentée ($n = 6$; **Fig. 44A, B**). De façon surprenante, nous avons observé une réduction significative de I_{XG} par rapport à la condition précédente (-34.4 ± 2.0 pA en Cl^-_{in} élevé en présence de Na^+ vs -62.1 ± 6.5 pA en Cl^-_{in} élevé en choline à -30 mV, ANOVA-1, $p = 0.0004$; **Fig. 44C**), semblable à ce qui a été observé en condition physiologique (-34.4 ± 2.0 pA en Cl^-_{in} élevé en présence de Na^+ vs -23.9 ± 6.1 pA en physiologique, ANOVA-1, $p = 0.21$; **Fig. 44C**). Ces résultats indiquent une compétition du Na^+ et du Cl^- au niveau d'un seul pore dans cette condition, coïncident avec la valeur du coefficient de Hill calculé (**Fig. 31D**). Dès lors, les ions Na^+ et Cl^- génèrent un courant de pacemaking en traversant le même pore.

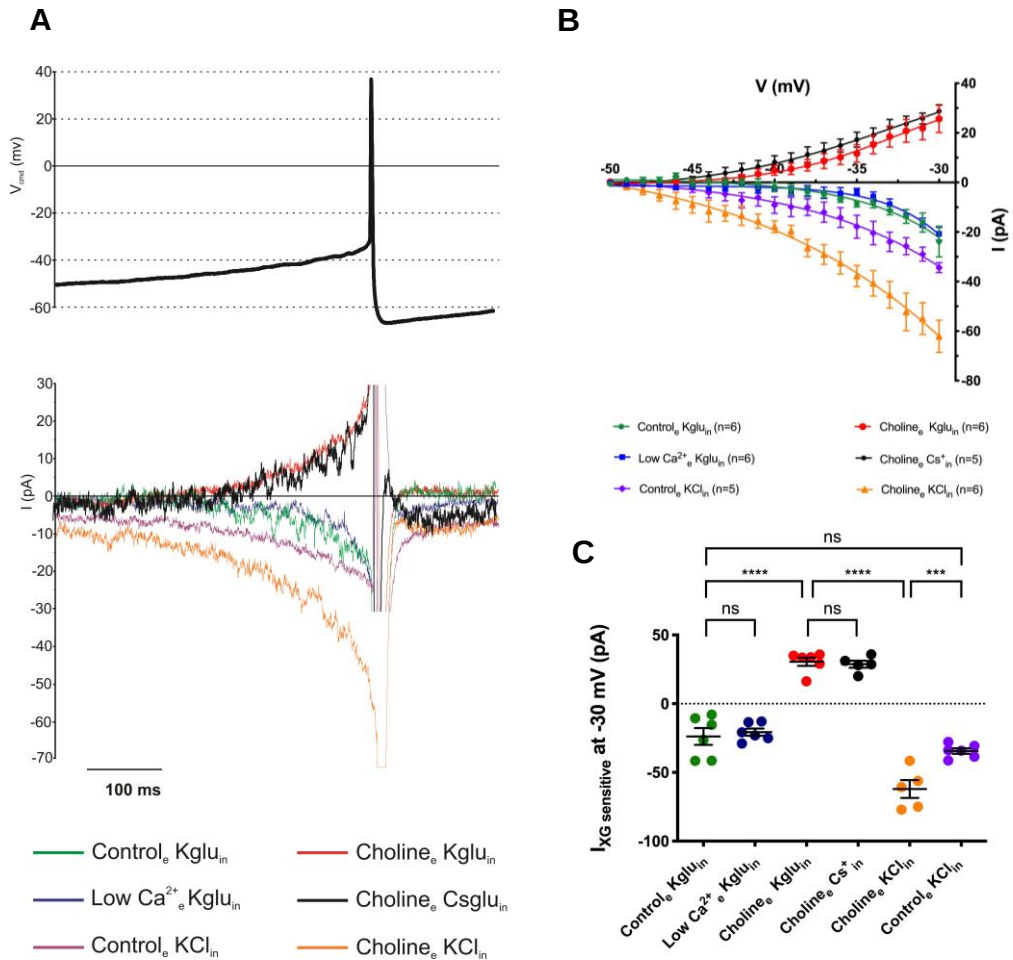


Figure 44 | I_{XG} est généré par un pore perméable au Na^+ et Cl^- . A : Dans le panel du haut est représentée la commande de voltage utilisée et dans celui du bas est montré I_{XG} dans les différentes conditions B : Courbes courant-voltage de I_{XG} dans différentes conditions ioniques. C : Valeurs moyennes ($\pm$ SEM) de l'amplitude de I_{XG} à -30 mV. En couleur sont représentés les données individuelles. Le canal qui sous-tend I_{XG} est perméable au Na^+ et au Cl^- .

5. Rôle du transporteur de la dopamine dans la génération de l'activité spontanée

Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que le XG bloque un pore crucial à la genèse de l'activité spontanée et perméable au Na^+ et Cl^- . Cette double perméabilité est notamment retrouvée dans une catégorie de transporteurs, les « *Solute Carrier 6* » (SLC6). Ces transporteurs utilisent le gradient électrochimique du Na^+ pour le passage de substrats à travers la membrane plasmique (Pramod et al., 2013). Une partie de ces transporteurs utilisent également le Cl^- , ce qui leur a valu le nom de transporteurs dépendants du Na^+/Cl^- . Les SLC6 sont divisés en 4 sous-familles en fonction de la nature chimique de leur substrat : GABA, acide aminé neurotransmetteur, acide aminé nutritif/orphelin et monoamine (Hahn and Blakely, 2007; Pramod et al., 2013).

Au vu de la spécificité du XG sur les neurones DA mésencéphaliques, nous nous sommes intéressés à un transporteur de cette catégorie, le SLC6A3, ou le DAT. Au niveau du système nerveux, le DAT est exclusivement exprimé dans les neurones DA mésencéphaliques (Blanchard et al., 1994; Shimada et al., 1992), dans les compartiments pérисynaptiques (Nirenberg et al., 1997). Ce transporteur est notamment connu pour être la cible de drogues d'abus tels que la cocaïne et l'amphétamine (Jones et al., 1998; Ritz et al., 1987).

D'un point de vue fonctionnel, le DAT est un transporteur électrogénique car, pour la recapture d'une molécule de DA chargée positivement, il y a recapture de 2 Na^+ et 1 Cl^- (Gu et al., 1994), donc la charge nette, positive, génère un courant entrant (Sonders et al., 1997). L'activité du DAT permet donc d'augmenter l'excitabilité des neurones DA par dépolarisation de ces derniers (Carvelli et al., 2004; Ingram et al., 2002). En plus du courant

généralisé par le transport de la DA, le DAT est capable de générer des courants de fuite indépendants du phénomène de recapture (Sonders et al., 1997). Le blocage par la cocaïne ne permettant pas d'inhiber l'activité spontanée, ce courant de fuite peut être toujours activé et sous-tendre l'activité autonome dans les neurones DA (Ingram et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que, chez des souris n'exprimant pas le DAT, il y avait une plus grande proportion de neurones DA ne présentant pas d'activité spontanée et une minorité de neurones DA possédant une activité spontanée plus irrégulière (Jones et al., 1999). Le DAT nous semble donc être une cible potentielle du XG. Afin de mettre en évidence une telle interaction, deux approches ont été envisagées.

5.1. Recapture de la dopamine

Tout d'abord, nous avons effectué des enregistrements extracellulaires sur des tranches de cerveaux de rat, dans la SNc. Nous y avons appliqué du GBR12909 (10 μ M), un bloqueur sélectif du transport de la DA et nous n'avons pas observé de changement de fréquence de décharge en présence des bloqueurs synaptiques (y compris le sulpiride) (2.77 ± 0.31 Hz en contrôle vs 2.21 ± 0.23 Hz sous GBR12909 10 μ M, $n = 6$, $p = 0.19$, t-test ; **Fig. 45A**). Ensuite, nous avons appliqué du XG (2 mM) et nous avons observé une inhibition de la décharge spontanée des neurones (de 2.28 ± 0.18 Hz sous 10 μ M GBR12909 à 0.01 ± 0.01 Hz sous 2 mM XG, $n = 6$, $p = 0.03$, Wilcoxon test ; **Fig. 45B**). Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'activité spontanée par le XG se fait par un mécanisme indépendant de la recapture de la DA.

5.2. Expériences sur souris DAT^{-/-}

Afin de confirmer les résultats ci-dessus et de vérifier si le courant de fuite généré par le DAT n'est pas responsable de l'activité autonome, nous avons eu recours à des souris DAT^{-/-}. Nous avons réalisé des enregistrements extracellulaires sur des souris WT (DAT^{+/+}) et DAT^{-/-} dans la SNc. Les neurones DA des souris étaient spontanément actifs (**Fig. 46A**). Leur fréquence de décharge est similaire aux neurones DA des souris WT (2.4 ± 0.2 Hz chez les DAT^{+/+}, $n = 6$ vs 2.3 ± 0.3 Hz chez les DAT^{-/-}, $n = 5$; **Fig. 46A, B**), ainsi que leur régularité ($4.2 \pm 0.7\%$ chez les DAT^{+/+}, $n = 6$ vs $2.6 \pm 0.5\%$ chez les DAT^{-/-}, $n = 5$, $p = 0.1$, t-test ; **Fig. 46C**). De plus, le XG (2 mM) inhibe l'activité spontanée des neurones DA de façon similaire ($p = 0.52$ pour le facteur génétique, ANOVA-2 ; **Fig. 46B**). L'ensemble des résultats obtenus dans ces séries d'expériences montre que le XG n'interagit pas avec le DAT et que ce dernier n'est pas responsable de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc.

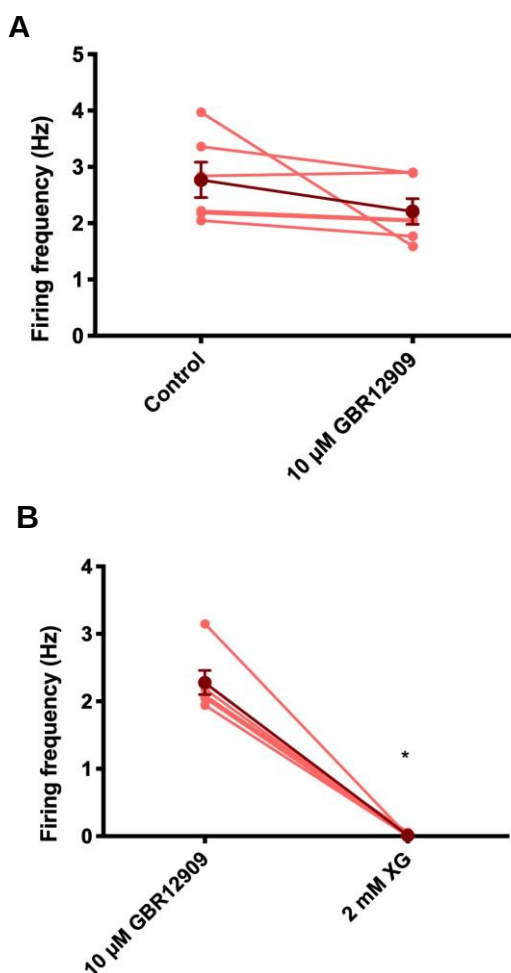


Figure 45 | Effet du blocage du DAT sur l'activité spontanée des neurones DA de la SNc. A : Evolution de la fréquence de décharge après GBR12909 (10 µM). Les valeurs moyennes ± SEM sont représentées en rouge foncé et les valeurs individuelles en rouge clair (n = 6). L'inhibition du transport de la DA n'a pas d'influence sur la fréquence de décharge. **B :** Evolution de la fréquence de décharge sous GBR12909 (10 µM) après ajout de XG (2 mM). Les valeurs moyennes ± SEM sont représentées en rouge foncé et les valeurs individuelles en rouge clair (n = 6). Le XG est toujours capable d'inhiber l'activité spontanée des neurones DA même quand le DAT est bloqué.

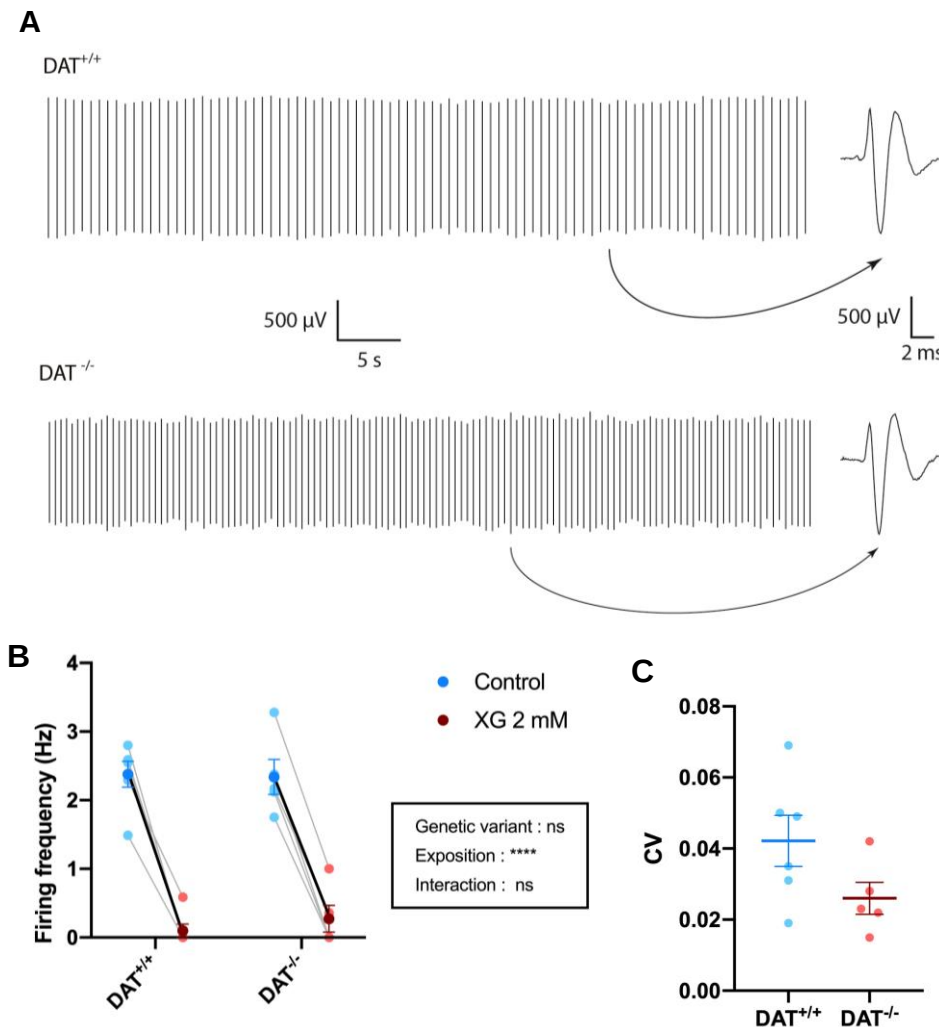


Figure 46 | L'absence du DAT n'affecte pas la stabilité de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc. **A :** Trace d'un enregistrement extracellulaire reflétant l'activité spontanée d'un neurone DA chez une souris DAT^{+/+} (haut) et une souris DAT^{-/-} (bas). **B :** Evolution de la fréquence de décharge après XG (2 mM) chez des souris DAT^{+/+} et DAT^{-/-}. Les valeurs moyennes $\pm$ SEM sont représentées en foncé et les valeurs individuelles en clair ($n = 6$ pour DAT^{+/+} et $n = 5$ pour DAT^{-/-}). L'absence du DAT n'influence pas la fréquence de décharge, ni la sensibilité au XG. **C :** Coefficient de variation de l'activité spontanée des neurones DA chez des souris DAT^{+/+} ($n = 6$) et DAT^{-/-} ($n = 5$).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Importance de la conductance sensible au XG dans l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques

Les neurones DA mésencéphaliques constituent une population hétérogène en termes de propriétés électrophysiologiques et moléculaires. D'un point de vue électrophysiologique, ces neurones présentent des densités variables de canaux ioniques, tels que les canaux $K_v4.3$, Ca_v et HCN, avec des durées de potentiels d'action variables en fonction des projections de ces neurones (Evans et al., 2017; Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008; Neuhoff et al., 2002; Philippart et al., 2016; Puopolo et al., 2007; Tarfa et al., 2017). Par ailleurs, chez la souris, les neurones DA de l'ATV ayant des projections mésopréfrontales présentent des propriétés uniques comme l'absence de I_h et d'activation des récepteurs D2 en présence d'agonistes de ces récepteurs ainsi qu'une fréquence de décharge plus élevée (10 - 15 Hz) que dans les autres neurones DA (3 - 6 Hz) (Lammel et al., 2008). Chez le rat, ce sont les neurones DA de l'ATV projetant vers l'amygdale qui présentent de telles propriétés (Margolis et al., 2008). En ce qui concerne l'activité pacemaker lente des neurones DA (0.5 – 5 Hz), plusieurs études ont mis en évidence l'importance de certains canaux ioniques voltage-dépendants dans sa genèse. Certains ont suggéré que les canaux Ca_v de type L sous-tendent l'activité spontanée des neurones DA de la SNc (Mercuri et al., 1994; Nedergaard et al., 1993; Puopolo et al., 2007; Putzier et al., 2009). Pourtant, en utilisant d'autres dihydropyridines que la nimodipine, d'autres n'ont pas observé le même phénomène (Chan et al., 2007; Drion et al., 2011; Guzman et al., 2009). Nous n'avons également pas observé de modification de la fréquence de

décharge sous nifédipine (**Fig.22A, 39C**). De plus, la nature ionique de l'ISI diffère entre les neurones DA de la SNc et de l'ATV, malgré le fait que le profil de décharge reste identique parmi ces neurones.

Dans ce projet, nous avons réussi à identifier une molécule capable de bloquer l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques. Les valeurs des IC_{50} du XG sont identiques pour la SNc et l'ATV (**Fig. 31D**) et son effet sur l'activité autonome semble être identique chez le rat et la souris (**Fig. 31-33**). A 2 mM, nous avons observé une inhibition de l'activité spontanée dans la quasi-totalité des neurones enregistrés. Cette inhibition n'est pas due à une activation de courants hyperpolarisants (**Fig. 35**), comme on pourrait l'observer avec l'activation des récepteurs D2, ni à une modulation des canaux ioniques voltage-dépendants impliqués dans les potentiels d'action (**Fig. 36, Tableau 2**). En présence de bloqueurs de régulateur de l'activité spontanée, le XG est toujours capable d'inhiber l'activité spontanée des neurones DA (**Fig. 39, 40**). De plus, nous avons effectué nos enregistrements en présence de bloqueurs synaptiques pour isoler pharmacologiquement l'activité intrinsèque des neurones DA et exclure un effet présynaptique du XG. L'inhibition de l'activité spontanée par le XG est donc la conséquence d'un blocage d'une conductance intrinsèque. Sur base de ces observations, nous pensons que le pore bloqué par le XG est crucial à la mise en place de l'activité spontanée, qu'il est commun au sein des neurones DA mésencéphaliques et que le courant généré par ce pore correspond à I_{pace} , décrit par Khaliq et Bean (Khaliq and Bean, 2008). Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier si le XG affecte l'activité spontanée des neurones DA atypiques de l'ATV ayant une fréquence de décharge plus élevée (Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008) afin de vérifier si le mécanisme de cette activité de ses neurones est similaire aux autres neurones DA mésencéphaliques.

A première vue, cette conductance est spécifique aux neurones DA mésencéphaliques. En effet, nous avons testé le XG sur des neurones à activité pacemaker rapide comme les neurones GABAergiques de la SNr et nous n'avons pas observé de changement dans leur fréquence de décharge (**Fig. 36**). Cette observation est en accord avec la littérature car l'activité autonome des neurones GABAergiques est médié par les canaux NALCN (Lutas et al., 2016). De plus, nous avons observé que le XG inhibe moins fortement que le Gd^{3+} , qui est un bloqueur de ces canaux (Chua et al., 2020a) (**Fig. 41**).

Par ailleurs, la conductance sensible au XG semble être impliquée uniquement dans l'activité rythmique régulière des neurones DA, au vu de l'absence d'effet lorsqu'on change le mode de décharge vers les bouffées (**Fig. 38**). A notre connaissance, le XG est le seul composé capable d'agir de façon si sélective sur ce profil de décharge sans affecter les bouffées. Etant donné que la décharge en bouffées est principalement médiée par les récepteurs NMDA (Destreel et al., 2019; Johnson et al., 1992), bloquer ces derniers permet d'empêcher leur apparition sans que l'activité spontanée régulière ne soit affectée. Vu que ce projet est une étude *in vitro*, il serait donc intéressant d'investiguer l'effet du XG *in vivo* en réalisant des enregistrements extracellulaires avec application locale par iontophorèse comme il a déjà été fait pour étudier les bouffées (Drion et al., 2010; Waroux et al., 2005), ou en réalisant du patch-clamp *in vivo* (Otomo et al., 2020). Ainsi, on pourrait isoler les décharges en bouffées et évaluer le rôle physiologique des différents modes de décharge au niveau comportemental chez l'animal et comment les GB compensent la perte aiguë de l'activité spontanée.

Sur le plan développemental, génétique et électrophysiologique, les neurones DA mésencéphaliques présentent une grande hétérogénéité

mais leurs progéniteurs proviennent d'un noyau commun contrôlé par l'expression de *Otx2* (Wang et al., 2020). Plusieurs ont démontré que l'excision de ce gène entraîne une absence de neurones exprimant la TH dans le mésencéphale (Omodei et al., 2008; Puellas et al., 2004; Vernay et al., 2005). La première séparation apparaît lorsque l'expression *Otx2* diminue, permettant l'expression de *Sox6* et d'avoir un groupe de neurones DA formant l'ATV et un formant la SNc (Panman et al., 2014). Au niveau du profil électrophysiologique, la densité des canaux ioniques dans les neurones DA évoluent au cours du développement (Dufour et al., 2014b) et en fonction leur position au sein du mésencéphale et de leur projections (Amendola et al., 2012; Evans et al., 2020, 2017; Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008; Neuhoff et al., 2002; Otomo et al., 2020; Philippart et al., 2016; Tarfa et al., 2017). Toutefois, on voit apparaître une activité autonome irrégulière dans les neurones DA de la SNc au 1^{er} jour postnatal P1 qui devient de plus en plus régulière (Dufour et al., 2014a). Au vu de l'hétérogénéité des neurones DA mésencéphaliques et une homogénéité dans nos résultats, on peut supposer que la conductance sensible au XG est exprimée très tôt au cours du développement au sein même du pôle de progéniteurs DA. Pour répondre à cette question, on peut envisager une approche électrophysiologique combinée à de la transcriptomique, comme le patch-seq (Cadwell et al., 2015), où l'on enregistrerait l'activité spontanée des neurones DA à divers stade de leur maturation tout en vérifiant la sensibilité au XG, et on regarderait le transcriptome de neurones individuels. De cette manière, on pourrait identifier la cible du XG.

2. Modélisation de la physiologie des neurones DA

Nos premiers résultats de caractérisation de la conductance sensible au XG permettront de réaliser un premier modèle de cette conductance qui

pourra être intégré dans modèle réaliste de l'activité pacemaker des neurones DA. Nous pourrions alors confirmer nos données expérimentales et vérifier si la conductance sensible au XG est vraiment essentielle à cette activité dans les neurones DA par « dynamic-clamp » (Sharp et al., 1993) et *in silico*. Une caractérisation expérimentale plus extensive, comme déterminer la conductance unitaire et la densité de ces pores, sera nécessaire pour raffiner le modèle. Récemment, un modèle a été proposé en tenant compte de la morphologie des neurones DA de la SNc, de la densité et des caractéristiques des conductances Na^+ , K^+ (« delayed rectifier » et I_A), HCN, Ca^{2+} (de type L) dans les différents compartiments des neurones DA et de la géométrie de ces compartiments (Moubarak et al., 2019). L'absence de paramètres du modèle de conductance SK est liée au fait que la densité de canaux SK au sein des neurones DA n'a pas été déterminé. Cette étude démontre que la morphologie intervient très peu dans la variabilité de la fréquence de décharge au sein des neurones DA de la SNc, bien qu'une autre étude démontre la longueur du segment initial de l'axone contrôle la fréquence de décharge de ces neurones *in vivo* (Meza et al., 2018). Il n'est pas exclu que cette différence puisse être due aux animaux utilisés (rats vs souris) ou à la méthodologie (*in vitro* vs *in vivo*). Comme nous avons observé un effet similaire du XG, quels que soient les animaux et les méthodes expérimentales, la modélisation de la conductance XG et sa densité sur les différents compartiments des neurones DA pourraient accorder les deux modèles proposés.

3. Influence des courants ω dans l'excitabilité cellulaire

L'hypothèse principale de ce projet était que les neurones DA exprimeraient I_ω et que ce courant correspondrait à I_{pace} . Nous avons utilisé le gua^+ , très perméant aux pores ω (Held et al., 2016), dans un premier temps pour vérifier notre hypothèse mais les résultats ont montré un effet

non spécifique. Nous nous sommes alors tournés vers le XG pour bloquer ces pores (Sokolov et al., 2010) et vérifier notre hypothèse.

I_ω a principalement été décrit dans un contexte de canalopathie. Au vu de la particularité de la mutation, les canaux générant I_ω ont principalement été étudiés dans des systèmes d'expression hétérologues (Daniel et al., 2019; Mason et al., 2019; Monteleone et al., 2017; Perozo et al., 1994; Sokolov et al., 2005, 2010; Tombola et al., 2005a). Bien que beaucoup aient montré un lien entre I_ω et l'état clinique des patients, il existe peu d'études corrélant directement entre ces courants et la physiologie cellulaire.

Au niveau des myocytes, il a été montré que le variant R222W dans les canaux $\text{Na}_v1.4$ humains entraîne un déplacement du potentiel de repos des fibres musculaires vers des états plus dépolarisés, facilitant ainsi la génération de potentiels d'action (Bayless-Edwards et al., 2018). L'amplitude des potentiels d'action est également réduite, avec un élargissement de ces derniers. En effet, l'activation soutenue de I_ω réduit la disponibilité de canaux Na_v recrutables.

Dans le cerveau, il a été démontré le variant R853Q des canaux $\text{Na}_v1.2$ humains génère un courant entrant perméable au K^+ et qu'il était lié à l'apparition d'épilepsie (Mason et al., 2019; Sokolov et al., 2005). Jusqu'à présent, I_ω n'a pas été observé dans des neurones, mais il n'est pas impossible que sa présence puisse produire des effets similaires à ce qui a été observé dans les fibres musculaires. Un déplacement du potentiel de repos vers un état plus dépolarisé permet d'ailleurs la mise en place d'une activité spontanée. Cela a d'ailleurs été démontré dans le contexte de l'épilepsie néonatale bénigne familiale (Miceli et al., 2012). Cette forme d'épilepsie est le résultat de mutations dans les gènes codants pour les

canaux $K_v7.2$ (Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998) et $K_v7.3$ (Charlier et al., 1998) qui sous-tendent les courants K^+ de type M. Dans les neurones DA, ces courants contrôlent sélectivement les décharges en bouffées (Drion et al., 2010).

Pourtant, les données que nous avons récoltées tendent à démontrer l'absence I_ω étant donné que nous n'avons pas observé de courants entrants sensibles au XG à des valeurs de potentiels très hyperpolarisés (**Fig. 42**) et le séquençage des ARN messager des différents S4 de canaux voltage-dépendants n'ont pas montré de variant R/X spécifique dans la SNc (**Tableau 3**). Cependant, un séquençage extensif de S4 d'autres canaux voltage-dépendants pourraient peut-être mettre en évidence des pores ω car ils ont été observés dans d'autres canaux tels que les canaux K^+ de type « shaker » (Starace and Bezanilla, 2004a; Tombola et al., 2005a). De plus, aucune étude n'a mis en évidence une double perméabilité $Na^+ - Cl^-$. Seule une double perméabilité $K^+ - Cl^-$ a pu être mise en évidence dans des pores ω présents dans des variants de canaux $K_v1.2$, avec une perméabilité plus grande pour le K^+ que celle du Cl^- (Khalili-Araghi et al., 2012). Il n'est donc pas exclu que le pore sensible au XG perméable au Na^+ et Cl^- dans les neurones DA soit un pore ω .

Par ailleurs, il existe des pores non canoniques ayant des propriétés semblables à celles des pores ω , dont les canaux H^+ voltage-dépendants (Hong et al., 2013). Ces canaux ne présentent pas de pore α et donc, le passage des courants se fait par le domaine senseur de voltage. On retrouve également les canaux TRPM3 qui jouent le rôle de nocicepteurs (Held et al., 2016; Vriens et al., 2014). Ces canaux sont perméables au gua^+ et peuvent être inhibés par des dérivés de la guanidine. Dès lors, il n'est pas impossible que ces pores soient également bloqués par le XG et que l'inhibition de l'activité spontanée des neurones DA

mésencéphaliques par le XG soit le résultat d'un blocage de pores non canoniques. Notons que les canaux H^+ voltage-dépendants sont exprimés dans les cellules gliales (L. J. Wu et al., 2012) et seuls les canaux TRPM2 et TRPM4 sont exprimés dans les neurones DA de la SNc (Mrejeru et al., 2011).

4. Comparaison de l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques avec d'autres cellules pacemaker.

Les neurones DA ne sont pas les seules cellules pacemaker dans le système nerveux central. Avec l'avènement de la technique « *action potential clamp* », il a été possible d'identifier directement les canaux ioniques activés au sein d'un potentiel d'action. Dans les cellules à activité spontanée, cette technique a permis de mettre en évidence les courants qui sous-tendent le ISI et donc, la mise en place d'une activité spontanée. C'est ainsi que certains ont pu démontrer que les canaux Ca_v de type L sont responsables de l'activité pacemaker dans les neurones DA de la SNc (Puopolo et al., 2007) tandis que celle des neurones DA de l'ATV est médiée par des canaux Na sensible et insensible à la TTX (Khaliq and Bean, 2010).

Le mécanisme de l'activité spontanée de ces derniers est similaire à celui d'autres populations neuronales dont l'activité autonome dépend principalement de courants Na^+ persistants, sensibles à la TTX. Parmi ces neurones, on retrouve les neurones du noyau suprachiasmatique (Jackson et al., 2004; Pennartz et al., 1997), les neurones tubéromamillaires (Taddese and Bean, 2002), les neurones GABAergiques de la SNr (Atherton and Bevan, 2005), les interneurones cholinergiques du striatum (Bennett et al., 2000) et même les neurones DA périglomérulaires du bulbe olfactif (Puopolo et al., 2005). En configuration potentiel-imposé, le courant Na^+

macroscopique rapide évoqué par un saut dépolarisant est très souvent dénommé courant Na^+ transitoire tandis que le courant Na^+ résiduel tout au long du saut dépolarisant est appelé courant Na^+ persistant (Lewis and Raman, 2014). Ce petit courant persistant sensible à la TTX est activé à partir de -60 mV et son amplitude maximale se situe aux alentours des -45 mV, au seuil du déclenchement des potentiels d'action dans ces neurones. Il correspond tout à fait à I_{pace} . Les neurones DA de la SNc expriment aussi ce courant persistant sensible à la TTX (Ding et al., 2011; Puopolo et al., 2007; Seutin and Engel, 2010), mais leur densité serait plus faible dans cette région en comparaison avec les autres neurones décrits, dont l'activité autonome repose principalement sur ce courant (Puopolo et al., 2007). Le blocage de ces courants par le riluzole montre une inhibition de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc par hyperpolarisation (Ding et al., 2011). Cependant, il a été démontré que le riluzole est un activateur des récepteurs GABA_A (He et al., 2002) et des canaux SK (Cao et al., 2002). On pourrait penser que la conductance bloquée par le XG correspond à ce courant persistant, mais lorsque nous avons caractérisé la nature ionique de cette conductance, nous avons effectué nos enregistrements en présence de TTX (**Fig.42-44**). Dès lors, nous pensons que le courant Na^+ persistant sensible à la TTX n'est pas la cible du XG.

Dans d'autres neurones pacemaker, comme les neurones du NTS et les neurones de Purkinje du cervelet, l'activité spontanée dépend principalement des courants Na^+ , dit « résurgents », médiés par les canaux Na_v (Do and Bean, 2003; Raman and Bean, 1997). Ces courants apparaissent à la suite d'un saut repolarisant à partir de potentiels positifs et une inactivation plus lente que les courants Na^+ transitoires. Dans ces neurones, ce courant résurgent apparaît lors de la phase de repolarisation du potentiel d'action, permettant ainsi de dépolariser à nouveau ces

cellules et générer un second potentiel d'action. Le principe moléculaire de ces courants reste encore flou, mais il semblerait que la sous-unité $\beta 4$ des canaux Na_v soit requise (Lewis and Raman, 2014). Les neurones DA de la SNc expriment cette sous-unité (Ding et al., 2011), mais ces courants sont soit de très faible amplitude (Ding et al., 2011) ou absent (Seutin and Engel, 2010) et donc, il est très peu probable que des courants Na^+ résurgents soient responsables de leur activité spontanée.

Une population cellulaire a également été étudiée pour son activité pacemaker : les cellules du nœud sinusal, permettant la contraction périodique du myocarde. Leur activité spontanée repose principalement sur l'homéostasie du Ca^{2+} via les canaux Ca_v de type L et T, les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et les réserves intracellulaires (Robinson et al., 2020). En comparaison avec les neurones DA de la SNc, le rôle des canaux Ca_v de type L reste controversé, même si de plus en plus d'études tendent à montrer que le blocage de ces derniers n'affecte pas l'activité spontanée de ces neurones (Chan et al., 2007; Drion et al., 2011; Guzman et al., 2009; Sun et al., 2017) (**Fig. 39, 40**). En ce qui concerne les canaux Ca_v de type T, il y a une nette différence de densité au sein des neurones DA de la SNc, corrélée avec l'expression de la calbindin (Evans et al., 2017). Au vu de leur courbe d'activation se situant à des potentiels plus hyperpolarisés, ces canaux sont plutôt impliqués dans les phénomènes de rebonds : lorsqu'il y a une levée d'une inhibition par hyperpolarisation des neurones DA via les récepteurs D2 (Evans et al., 2017) ou les récepteurs GABA_A et GABA_B (Evans et al., 2020), il résulte une activation massive des canaux Ca_v de type T pour restaurer leur activité rythmique régulière. En ce qui concerne les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, nous avons testé un bloqueur spécifique de ces protéines, le ORM-10103 (Jost et al., 2013). Cependant, nous n'avons pas observé de changement significatif dans la fréquence de

décharge des neurones DA de la SNc. Pour ce qui est des réserves intracellulaires calciques, elles ont été étudiées dans le cadre de la maladie de Parkinson car l'homéostasie du Ca^{2+} dans les neurones DA entraîne un stress métabolique par la surproduction d'ATP pour activer les pompes, dont l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Catoni et al., 2019; Duda et al., 2016). Une étude a montré que la libération du Ca^{2+} des réserves active des canaux TRPC1 qui inhibent les canaux Ca_v de type L, réduisant la fréquence de décharge des neurones DA de la SNc (Sun et al., 2017).

Finalement, même s'il existe une population non négligeable de cellules ayant une activité intrinsèque, les mécanismes qui sous-tendent leur activité spontanée diffèrent d'une population à l'autre. Notre étude démontre qu'il existe un mécanisme commun au sein des neurones DA mésencéphaliques dans lequel la conductance sensible au XG joue un rôle prépondérant. Même si nous avons pu observer une certaine spécificité du XG envers les neurones DA par l'absence d'effet sur l'activité autonome des neurones GABAergiques de la SNr, il serait intéressant d'investiguer l'effet du XG sur ces différentes populations pacemakers, avec un intérêt sur les cellules du nœud sinusal.

5. Conclusion

Nous avons exploré plusieurs hypothèses afin d'identifier I_{pace} dans les neurones DA mésencéphaliques et nous avons réussi à identifier un bloqueur prometteur, le XG, pour identifier la conductance responsable de leur activité spontanée. Toutefois, nos données tendent à démontrer que les propriétés de I_{XG} ne sont pas similaires à celles de I_{ω} , bien que la présence de pores non canoniques dans les neurones DA reste possible. Nous avons réussi à caractériser la perméabilité ionique du pore sensible au XG et nous avons trouvé que I_{XG} est de nature Na^+ et Cl^- . Cette double perméabilité pourrait être critique pour assurer une activité spontanée

régulière, avec la conductance Na^+ qui augmente l'excitabilité cellulaire et permet le recrutement des canaux voltage-dépendants nécessaires à la genèse des potentiels d'action, et la conductance Cl^- joue le rôle de shunt pour limiter l'effet excitateur de la conductance Na^+ . Cette autorégulation est le genre de propriétés qu'on attend d'un I_{pace} . En lumière avec nos résultats, nous pensons que I_{XG} correspond au petit courant qui sous-tend le ISI décrit par Khaliq et Bean (Khaliq and Bean, 2008). L'identification moléculaire de la cible du XG sera une étape clé dans la compréhension de l'activité autonome des neurones DA mésencéphaliques dans un contexte physiologique et physiopathologique. Cela ouvrira également les portes du développement d'un bloqueur ayant une affinité plus grande pour cette conductance et augmenter la spécificité dans le cadre de son étude dans d'autres cellules à activité spontanée lente, car à 2 mM, il n'est pas exclu que le XG puisse avoir des effets non sélectifs. En conclusion, ce projet apporte des preuves de l'implication d'une nouvelle conductance dans la génération de l'activité spontanée des neurones DA mésencéphaliques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdi A, Mallet N, Mohamed FY, Sharott A, Dodson PD, Nakamura KC, Suri S, Avery S V., Larvin JT, Garas FN, Garas SN, Vinciati F, Morin S, Bezard E, Baufreton J, Magill PJ. 2015. Prototypic and arky pallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *J Neurosci* **35**:6667–6688. doi:10.1523/JNEUROSCI.4662-14.2015
- Adinolfi A, Carbone C, Leo D, Gainetdinov RR, Laviola G, Adriani W. 2018. Novelty-related behavior of young and adult dopamine transporter knockout rats: Implication for cognitive and emotional phenotypic patterns. *Genes, Brain Behav* **17**. doi:10.1111/gbb.12463
- Adinolfi A, Zelli S, Leo D, Carbone C, Mus L, Illiano P, Alleva E, Gainetdinov RR, Adriani W. 2019. Behavioral characterization of DAT-KO rats and evidence of asocial-like phenotypes in DAT-HET rats: The potential involvement of norepinephrine system. *Behav Brain Res* **359**:516–527. doi:10.1016/j.bbr.2018.11.028
- Aghajanian GK, Bunney BS. 1974. Central dopaminergic neurons: Neurophysiological identification and responses to drugs. *Biochem Pharmacol* **23**:523–528. doi:10.1016/0006-2952(74)90074-4
- Airaksinen MS, Eilers J, Garaschuk O, Thoenen H, Konnerth A, Meyer M. 1997. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1488–1493. doi:10.1073/pnas.94.4.1488
- Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **12**:366–375. doi:10.1016/0166-2236(89)90074-X

- Alexander Garrett E., Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* **13**:266–271. doi:10.1016/0166-2236(90)90107-L
- Alexander G. E., Crutcher MD. 1990. Preparation for movement: Neural representations of intended direction in three motor areas of the monkey. *J Neurophysiol* **64**:133–150. doi:10.1152/jn.1990.64.1.133
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. 1986. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annu Rev Neurosci* **9**:357–381. doi:10.1146/annurev.ne.09.030186.002041
- Amendola J, Woodhouse A, Martin-Eauclaire MF, Goillard JM. 2012. Ca²⁺/cAMP-sensitive covariation of I_A and I_H voltage dependences tunes rebound firing in dopaminergic neurons. *J Neurosci* **32**:2166–2181. doi:10.1523/JNEUROSCI.5297-11.2012
- Arenas E, Denham M, Villaescusa JC. 2015. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Dev* **142**:1918–1936. doi:10.1242/dev.097394
- Atherton JF, Bevan MD. 2005. Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J Neurosci* **25**:8272–8281. doi:10.1523/JNEUROSCI.1475-05.2005
- Bartels AL, Leenders KL. 2009. Parkinson's disease: The syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex* **45**:915–921. doi:10.1016/j.cortex.2008.11.010
- Bayer HM, Glimcher PW. 2005. Midbrain dopamine neurons encode a

- quantitative reward prediction error signal. *Neuron* **47**:129–141. doi:10.1016/j.neuron.2005.05.020
- Bayless-Edwards L, Winston V, Lehmann-Horn F, Arinze P, Groome JR, Jurkat-Rott K. 2018. Nav1.4 DI-S4 periodic paralysis mutation R222W enhances inactivation and promotes leak current to attenuate action potentials and depolarize muscle fibers. *Sci Rep* **8**:1–13. doi:10.1038/s41598-018-28594-5
- Bean BP. 2007. Neurophysiology: Stressful pacemaking. *Nature* **447**:1059–1060. doi:10.1038/4471059a
- Belin D, Everitt BJ. 2008. Cocaine Seeking Habits Depend upon Dopamine-Dependent Serial Connectivity Linking the Ventral with the Dorsal Striatum. *Neuron* **57**:432–441. doi:10.1016/j.neuron.2007.12.019
- Benarroch EE. 2008. Subthalamic nucleus and its connections: Anatomic substrate for the network effects of deep brain stimulation. *Neurology* **70**:1991–1995. doi:10.1212/01.wnl.0000313022.39329.65
- Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ. 2000. Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* **20**:8493–8503. doi:10.1523/jneurosci.20-22-08493.2000
- Berke JD. 2018. What does dopamine mean? *Nat Neurosci.* doi:10.1038/s41593-018-0152-y
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* **279**:403–406. doi:10.1126/science.279.5349.403

- Blanchard V, Raisman-Vozari R, Vyas S, Michel PP, Javoy-Agid F, Uhl G, Agid Y. 1994. Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Mol Brain Res* **22**:29–38. doi:10.1016/0169-328X(94)90029-9
- Blythe SN, Atherton JF, Bevan MD. 2007. Synaptic Activation of Dendritic AMPA and NMDA Receptors Generates Transient High-Frequency Firing in Substantia Nigra Dopamine Neurons In Vitro. *J Neurophysiol* **97**:2837–2850. doi:10.1152/jn.01157.2006
- Bolam JP, Pissadaki EK. 2012. Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. *Mov Disord* **27**:1478–1483. doi:10.1002/mds.25135
- Boone AN, Senatore A, Chemin J, Monteil A, Spafford JD. 2014. Gd3+ and calcium sensitive, sodium leak currents are features of weak membrane-glass seals in patch clamp recordings. *PLoS One* **9**. doi:10.1371/journal.pone.0098808
- Bovet-Carmona M, Menigoz A, Pinto S, Tambuyzer T, Krautwald K, Voets T, Aerts JM, Angenstein F, Vennekens R, Balschun D. 2018. Disentangling the role of TRPM4 in hippocampus-dependent plasticity and learning: an electrophysiological, behavioral and fMRI approach. *Brain Struct Funct* **223**:3557–3576. doi:10.1007/s00429-018-1706-1
- Branch SY, Chen C, Sharma R, Lechleiter JD, Li S, Beckstead MJ. 2016. Dopaminergic neurons exhibit an age-dependent decline in electrophysiological parameters in the MitoPark mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **36**:4026–4037. doi:10.1523/JNEUROSCI.1395-15.2016

- Brown RG, Pluck G. 2000. Negative symptoms: The “pathology” of motivation and goal-directed behaviour. *Trends Neurosci* **23**:412–417. doi:10.1016/S0166-2236(00)01626-X
- Bunney BS, Aghajanian GK, Roth RH. 1973a. Comparison of effects of L-Dopa, amphetamine and apomorphine on firing rate of rat dopaminergic neurones. *Nat New Biol* **245**:123–125. doi:10.1038/newbio245123a0
- Bunney BS, Walters JR, Roth RH, Aghajanian GK. 1973b. Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* **185**:560–571.
- Cadwell CR, Palasantza A, Jiang X, Berens P, Deng Q, Yilmaz M, Reimer J, Shen S, Bethge M, Tolias KF, Sandberg R, Tolias AS. 2015. Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. *Nat Biotechnol* **34**. doi:10.1038/nbt.3445
- Canales JJ, Graybiel AM. 2000. A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat Neurosci* **3**:377–383. doi:10.1038/73949
- Cao YJ, Dreixler JC, Couey JJ, Houamed KM. 2002. Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole. *Eur J Pharmacol* **449**:47–54. doi:10.1016/S0014-2999(02)01987-8
- Capper-Loup C, Canales JJ, Kadaba N, Graybiel AM. 2002. Concurrent activation of dopamine D1 and D2 receptors is required to evoke neural and behavioral phenotypes of cocaine sensitization. *J Neurosci* **22**:6218–6227. doi:10.1523/jneurosci.22-14-06218.2002
- Cardozo DL, Bean BP. 1995. Voltage-dependent calcium channels in rat

- midbrain dopamine neurons: Modulation by dopamine and GABA(B) receptors. *J Neurophysiol* **74**:1137–1148. doi:10.1152/jn.1995.74.3.1137
- Carvelli L, McDonald PW, Blakely RD, Defelice LJ. 2004. Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. *Proc Natl Acad Sci* **101**:16046–16051. doi:10.1073/pnas.0403299101
- Catoni C, Cali T, Brini M. 2019. Calcium, dopamine and neuronal calcium sensor 1: Their contribution to Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci* **12**:55. doi:10.3389/fnmol.2019.00055
- Chakravarthy VS, Joseph D, Bapi RS. 2010. What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biol Cybern* **103**:237–253. doi:10.1007/s00422-010-0401-y
- Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ. 2009. Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **32**:249–56. doi:10.1016/j.tins.2009.01.006
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* **447**:1081–1086. doi:10.1038/nature05865
- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M. 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* **18**:53–55. doi:10.1038/ng0198-53
- Chaudhuri KR. 2016. Progression and biomarkers for Parkinson disease: Merging motor with nonmotor symptoms. *Neurology* **87**:128–129. doi:10.1212/WNL.0000000000002664

- Cheramy A, Leviel V, Glowinski J. 1981. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* **289**:537–542. doi:10.1038/289537a0
- Chua HC, Wulf M, Weidling C, Rasmussen LP, Pless SA. 2020a. The NALCN channel complex is voltage sensitive and directly modulated by extracellular calcium. *Sci Adv* **6**:1–10. doi:10.1126/sciadv.aaz3154
- Chua HC, Wulf M, Weidling C, Rasmussen LP, Pless SA. 2020b. The NALCN channel complex is voltage sensitive and directly modulated by extracellular calcium. *Sci Adv* **6**. doi:10.1126/sciadv.aaz3154
- Chung KKH, Freestone PS, Lipski J. 2011. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol* **106**:2865–2875. doi:10.1152/jn.00994.2010
- Church WH, Justice JB, Neill DB. 1987. Detecting behaviorally relevant changes in extracellular dopamine with microdialysis. *Brain Res* **412**:397–399. doi:10.1016/0006-8993(87)91150-4
- Cinque S, Zoratto F, Poleggi A, Leo D, Cerniglia L, Cimino S, Tambelli R, Alleva E, Gainetdinov RR, Laviola G, Adriani W. 2018. Behavioral phenotyping of dopamine transporter knockout rats: Compulsive traits, motor stereotypies, and anhedonia. *Front Psychiatry* **9**:1–13. doi:10.3389/fpsyt.2018.00043
- Cragg SJ, Baufreton J, Xue Y, Bolam JP, Bevan MD. 2004. Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. *Eur J Neurosci* **20**:1788–1802. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03629.x
- Crittenden JR, Graybiel AM. 2011. Basal ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Front Neuroanat* **5**:59. doi:10.3389/fnana.2011.00059

- Crittenden JR, Tillberg PW, Riad MH, Shima Y, Gerfen CR, Curry J, Housman DE, Nelson SB, Boyden ES, Graybiel AM. 2016. Striosome-dendron bouquets highlight a unique striatonigral circuit targeting dopamine-containing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:11318–11323. doi:10.1073/pnas.1613337113
- Da Silva JA, Tecuapetla F, Paixão V, Costa RM. 2018. Dopamine neuron activity before action initiation gates and invigorates future movements. *Nature* **554**:244–248. doi:10.1038/nature25457
- Daniel LL, Yang T, Kroncke B, Hall L, Stroud D, Roden DM. 2019. SCN5A variant R222Q generated abnormal changes in cardiac sodium current and action potentials in murine myocytes and Purkinje cells. *Heart Rhythm* **16**:1676–1685. doi:10.1016/j.hrthm.2019.05.017
- De Lafuente V, Romo R. 2011. Dopamine neurons code subjective sensory experience and uncertainty of perceptual decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:19767–19771. doi:10.1073/pnas.1117636108
- de Vrind V, Scuvée-Moreau J, Drion G, Hmaied C, Philippart F, Engel D, Seutin V. 2016. Interactions between calcium channels and SK channels in midbrain dopamine neurons and their impact on pacemaker regularity: contrasting roles of N- and I-type channels. *Eur J Pharmacol* **788**:274–279. doi:10.1016/j.ejphar.2016.06.046
- Deignan J, Luján R, Bond C, Riegel A, Watanabe M, Williams JT, Maylie J, Adelman JP. 2012. SK2 and SK3 expression differentially affect firing frequency and precision in dopamine neurons. *Neuroscience* **217**:67–76. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.053
- DeLong MR. 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* **13**:281–285. doi:10.1016/0166-

2236(90)90110-V

- Destreel G, Seutin V, Engel D. 2019. Subsaturation of the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site allows the regulation of bursting activity in juvenile rat nigral dopamine neurons. *Eur J Neurosci* **50**:3454–3471. doi:10.1111/ejn.14491
- Di Chiara G, Imperato A. 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5274–5278. doi:10.1073/pnas.85.14.5274
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Esposito E. 2009. Birth, life and death of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *J Neural Transm* **369**. doi:10.1007/978-3-211-92660-4
- Ding S, Wei W, Zhou Fu-Ming, Zhou F.-M. 2011. Molecular and functional differences in voltage-activated sodium currents between GABA projection neurons and dopamine neurons in the substantia nigra. *J Neurophysiol* **106**:3019–3034. doi:10.1152/jn.00305.2011.-GABA
- Do MTH, Bean BP. 2003. Subthreshold Sodium Currents and Pacemaking of Subthalamic Neurons: Modulation by Slow Inactivation. *Neuron* **39**:109–120. doi:10.1016/S0896-6273(03)00360-X
- Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, Amano N, Nomura M, Umekage M, Morizane A, Takahashi J. 2020. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat Commun* **11**:1–14. doi:10.1038/s41467-020-17165-w
- Dougalis AG, Matthews GAC, Liss B, Ungless MA. 2017. Ionic currents influencing spontaneous firing and pacemaker frequency in dopamine

- neurons of the ventrolateral periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus (vlPAG/DRN): A voltage-clamp and computational modelling study. *J Comput Neurosci* **42**:275–305. doi:10.1007/s10827-017-0641-0
- Drion G, Bonjean M, Waroux O, Scuvé E-Moreau J, Lié J-F, Sejnowski TJ, Sepulchre R, Seutin V. 2010. M-type channels selectively control bursting in rat dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* **31**:827–835. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07107.x
- Drion G, Massotte L, Sepulchre R, Seutin V. 2011. How modeling can reconcile apparently discrepant experimental results: The case of pacemaking in dopaminergic neurons. *PLoS Comput Biol* **7**:e1002050. doi:10.1371/journal.pcbi.1002050
- Duda J, Pötschke C, Liss B. 2016. Converging roles of ion channels, calcium, metabolic stress, and activity pattern of *Substantia nigra* dopaminergic neurons in health and Parkinson's disease. *J Neurochem* **139**:156–178. doi:10.1111/jnc.13572
- Dufour MA, Woodhouse A, Amendola J, Goillard JM. 2014a. Non-linear developmental trajectory of electrical phenotype in rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. *Elife* **3**. doi:10.7554/eLife.04059
- Dufour MA, Woodhouse A, Goillard J-M. 2014b. Somatodendritic ion channel expression in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons across postnatal development. *J Neurosci Res* **92**:981–999. doi:10.1002/jnr.23382
- Dunnett SB, Bentivoglio M, Björklund A, Hökfelt T. 2005. Handbook of Chemical Neuroanatomy : Dopamine.

- Engel D, Seutin V. 2015. High dendritic expression of I_h in the proximity of the axon origin controls the integrative properties of nigral dopamine neurons. *J Physiol* **593**:4905–4922. doi:10.1113/JP271052
- Enomoto K, Matsumoto N, Nakai S, Satoh T, Sato TK, Ueda Y, Inokawa H, Haruno M, Kimura M. 2011. Dopamine neurons learn to encode the long-term value of multiple future rewards. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:15462–15467. doi:10.1073/pnas.1014457108
- Evans RC, Twedell EL, Zhu M, Ascencio J, Zhang R, Khaliq ZM. 2020. Functional Dissection of Basal Ganglia Inhibitory Inputs onto Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *Cell Rep* **32**:1–18. doi:10.1016/j.celrep.2020.108156
- Evans RC, Zhu M, Khaliq ZM. 2017. Dopamine inhibition differentially controls excitability of substantia nigra dopamine neuron subpopulations through T-type calcium channels. *J Neurosci* **37**:3704–3720. doi:10.1523/JNEUROSCI.0117-17.2017
- Fakler B, Adelman JP. 2008. Control of K_{Ca} Channels by Calcium Nano/Microdomains. *Neuron* **59**:873–881. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.001
- Fallon JH, Riley JN, Moore RY. 1978. Substantia nigra dopamine neurons: separate populations project to neostriatum and allocortex. *Neurosci Lett* **7**:157–162. doi:10.1016/0304-3940(78)90160-X
- Farassat N, Costa Kauê Machado, Stovanovic S, Albert S, Kovacheva L, Shin J, Egger R, Somayaji M, Duvarci S, Schneider G, Roeper J. 2019. In vivo functional diversity of midbrain dopamine neurons within identified axonal projections. *Elife* **8**. doi:10.7554/elife.48408
- Franz O, Liss B, Neu A, Roeper J. 2000. Single-cell mRNA expression of

- HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons. *Eur J Neurosci* **12**:2685–2693. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00151.x
- Freye E, Levy J V. 2009. Pharmacology and abuse of cocaine, amphetamines, ecstasy and related designer drugs: A comprehensive review on their mode of action, treatment of abuse and intoxication, Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs: A Comprehensive Review on their Mode of Action, Treatment of Abuse and Intoxication. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-90-481-2448-0
- Friedman A, Homma D, Gibb LG, Amemori KI, Rubin SJ, Hood AS, Riad MH, Graybiel AM. 2015. A corticostriatal path targeting striosomes controls decision-making under conflict. *Cell* **161**:1320–1333. doi:10.1016/j.cell.2015.04.049
- Gainetdinov RR, Mohn AR, Bohn LM, Caron MG. 2001. Glutamatergic modulation of hyperactivity in mice lacking the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11047–11054. doi:10.1073/pnas.191353298
- Galtieri DJ, Estep CM, Wokosin DL, Traynelis S, Surmeier DJ. 2017. Pedunculo-pontine glutamatergic neurons control spike patterning in substantia nigra dopaminergic neurons. *Elife* **6**. doi:10.7554/eLife.30352
- Geffen LB, Jessell TM, Cuello AC, Iversen LL. 1976. Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* **260**:258–260. doi:10.1038/260258a0

- Gerfen CR. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* **15**:133–139. doi:10.1016/0166-2236(92)90355-C
- Gerfen CR, Baimbridget KG, Millert JJ. 1985. The neostriatal mosaic: Compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey (striatal compartments/substantia nigra/dopamine). *Neurobiology* **82**:8780–8784.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR. 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **250**:1429–1432. doi:10.1126/science.2147780
- Giguère N, Nanni SB, Trudeau LE. 2018. On cell loss and selective vulnerability of neuronal populations in Parkinson's disease. *Front Neurol*. doi:10.3389/fneur.2018.00455
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**:606–612. doi:10.1038/379606a0
- Gonon F, Bloch B. 1998. Kinetics and geometry of the excitatory dopaminergic transmission in the rat striatum in vivo. *Adv Pharmacol* **42**:140–4. doi:10.1016/s1054-3589(08)60715-2
- Gonon FG, Buda MJ. 1985. Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by in vivo voltammetry in the rat striatum. *Neuroscience* **14**:765–774. doi:10.1016/0306-4522(85)90141-1

- Grace AA, Bunney BS. 1984a. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: Single spike firing. *J Neurosci* **4**:2866–2876. doi:10.1523/jneurosci.04-11-02866.1984
- Grace AA, Bunney BS. 1984b. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: Burst firing. *J Neurosci* **4**:2877–2890. doi:10.1523/jneurosci.04-11-02877.1984
- Grace AA, Bunney BS. 1983. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons-1. Identification and characterization. *Neuroscience* **10**:301–315. doi:10.1016/0306-4522(83)90135-5
- Grace AA, Bunney BS. 1980. Nigral dopamine neurons: intracellular recording and identification with L-dopa injection and histofluorescence. *Science* **210**:654–656. doi:10.1126/science.7433992
- Grahn JA, Parkinson JA, Owen AM. 2008. The cognitive functions of the caudate nucleus. *Prog Neurobiol* **86**:141–155. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.09.004
- Grand T, Demion M, Norez C, Mettey Y, Launay P, Becq F, Bois P, Guinamard R. 2008. 9-Phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels. *Br J Pharmacol* **153**:1697–1705. doi:10.1038/bjp.2008.38
- Graybiel AM, Canales JJ, Capper-Loup C. 2000. Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: A new hypothesis. *Trends Neurosci*. doi:10.1016/S1471-1931(00)00027-6
- Graybiel AM, Ragsdale CW. 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey, and cat demonstrated by

- acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:5723–5726. doi:10.1073/pnas.75.11.5723
- Gu H, Wall SC, Rudnick G. 1994. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* **269**:7124–7130.
- Guinamard R, Simard C, Del Negro C. 2013. Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol Ther* **138**:272–284. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.012
- Guzman JN, Sánchez-Padilla J, Chan CS, Surmeier DJ. 2009. Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* **29**:11011–11019. doi:10.1523/JNEUROSCI.2519-09.2009
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ. 2010. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* **468**:696–700. doi:10.1038/nature09536
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR. 2000. Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* **20**:2369–2382. doi:10.1523/jneurosci.20-06-02369.2000
- Hage TA, Sun Y, Khaliq ZM. 2016. Electrical and Ca²⁺ signaling in dendritic spines of substantia nigra dopaminergic neurons. doi:10.7554/eLife.13905.001
- Hahn J, Tse TE, Levitan ES. 2003. Long-Term K⁺ Channel-Mediated Dampening of Dopamine Neuron Excitability by the Antipsychotic Drug Haloperidol. *J Neurosci* **23**:10859–10866. doi:10.1523/jneurosci.23-34-10859.2003

- Hahn MK, Blakely RD. 2007. The functional impact of SLC6 transporter genetic variation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:401–441. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105242
- Hahn S, Kim SW, Um KB, Kim HJ, Park MK. 2020. N-benzhydryl quinuclidine (NBQN) compounds are a potent and Src kinase-independent inhibitor of NALCN channels. *Br J Pharmacol* **177**:3795–3810. doi:10.1111/bph.15104
- Harrington KA, Augood SJ, Kingsbury AE, Foster OJF, Emson PC. 1996. Dopamine transporter (DAT) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. *Mol Brain Res* **36**:157–162. doi:10.1016/0169-328X(95)00278-Z
- Hassani OK, Cromwell HC, Schultz W. 2001. Influence of expectation of different rewards on behavior-related neuronal activity in the striatum. *J Neurophysiol* **85**:2477–2489. doi:10.1152/jn.2001.85.6.2477
- Häusser M, Stuart G, Racca C, Sakmann B. 1995. Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* **15**:637–647. doi:10.1016/0896-6273(95)90152-3
- He Y, Benz A, Fu T, Wang M, Covey DF, Zorumski CF, Mennerick S. 2002. Neuroprotective agent riluzole potentiates postsynaptic GABAA receptor function. *Neuropharmacology* **42**:199–209. doi:10.1016/S0028-3908(01)00175-7
- Hegeman DJ, Hong ES, Hernández VM, Chan CS. 2016. The external globus pallidus: Progress and perspectives. *Eur J Neurosci* **43**:1239–1265. doi:10.1111/ejn.13196

- Heien M, Wightman R. 2006. Phasic Dopamine Signaling During Behavior, Reward, and Disease States. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* **5**:99–108. doi:10.2174/187152706784111605
- Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. 1984. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2, 5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* **311**:467–469. doi:10.1038/311467a0
- Held K, Voets T, Vriens J. 2016. Signature and Pathophysiology of Non-canonical Pores in Voltage-Dependent Cation Channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **170**:67–99. doi:10.1007/112_2015_5003
- Hollerman JR, Grace AA. 1990. The effects of dopamine-depleting brain lesions on the electrophysiological activity of rat substantia nigra dopamine neurons. *Brain Res* **533**:203–212. doi:10.1016/0006-8993(90)91341-D
- Holzer P, Izzo AA. 2014. The pharmacology of TRP channels. *Br J Pharmacol* **171**:2469–2473. doi:10.1111/bph.12723
- Hong L, Pathak MM, Kim IH, Ta D, Tombola F. 2013. Voltage-Sensing Domain of Voltage-Gated Proton Channel Hv1 Shares Mechanism of Block with Pore Domains. *Neuron* **77**:274–287. doi:10.1016/j.neuron.2012.11.013
- Hornykiewicz O. 2006. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission, Supplement*. Springer Wien. pp. 9–15. doi:10.1007/978-3-211-45295-0_3
- Howe MW, Dombeck DA. 2016. Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. *Nature* **535**:505–510. doi:10.1038/nature18942

- Huang H, Tan BZ, Shen Y, Tao J, Jiang F, Sung YY, Ng CK, Raida M, Köhr G, Higuchi M, Fatemi-Shariatpanahi H, Harden B, Yue DT, Soong TW. 2012. RNA Editing of the IQ Domain in Cav1.3 Channels Modulates Their Ca²⁺-Dependent Inactivation. *Neuron* **73**:304–316. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.022
- Ingram SL, Prasad BM, Amara SG. 2002. Dopamine transporter-mediated conductances increase excitability of midbrain dopamine neurons. *Nat Neurosci* **5**:971–978. doi:10.1038/nn920
- Isoda M, Hikosaka O. 2008. Role for subthalamic nucleus neurons in switching from automatic to controlled eye movement. *J Neurosci* **28**:7209–7218. doi:10.1523/JNEUROSCI.0487-08.2008
- Jackson AC, Yao GL, Bean BP. 2004. Mechanism of Spontaneous Firing in Dorsomedial Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *J Neurosci* **21**:5944–5951. doi:11487617
- Jang M, Bum Um K, Jang J, Jin Kim H, Cho H, Chung S, Park MK. 2015. Coexistence of glutamatergic spine synapses and shaft synapses in substantia nigra dopamine neurons. *Sci Rep* **5**:1–16. doi:10.1038/srep14773
- Jenner P, Olanow CW. 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* **47**:S161-70. doi:10.1212/wnl.47.6_suppl_3.161s
- Ji H, Hougaard C, Herrik KF, Strøbaek D, Christophersen P, Shepard PD. 2009. Tuning the excitability of midbrain dopamine neurons by modulating the Ca²⁺ sensitivity of SK channels. *Eur J Neurosci* **29**:1883–1895. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06735.x
- Jiang D, Gamal el-Din tamer M, Ing C, Lu P, Pomès R, Zheng N, Catterall

- WA. 2018. Structural basis for gating pore current in periodic paralysis. *Nature* **557**:590–594. doi:10.1038/s41586-018-0120-4
- Johnson SW, Seutin V, North RA. 1992. Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: Role of electrogenic sodium pump. *Science* **258**:665–667. doi:10.1126/science.1329209
- Jones SR, Gainetdinov RR, Hu X-T, Cooper DC, Wightman RM, White FJ, Caron MG. 1999. Loss of autoreceptor functions in mice lacking the dopamine transporter. *Nat Neurosci* **2**:649–655. doi:10.1038/10204
- Jones SR, Gainetdinov RR, Mark Wightman R, Caron MG. 1998. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci* **18**:1979–1986. doi:10.1523/jneurosci.18-06-01979.1998
- Jost N, Nagy N, Corici C, Kohajda Z, Horváth A, Acsai K, Biliczki P, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Papp JG, Varró A, Virág L. 2013. ORM-10103, a novel specific inhibitor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, decreases early and delayed afterdepolarizations in the canine heart. *Br J Pharmacol* **170**:768–778. doi:10.1111/bph.12228
- Kang Y, Kitai ST. 1993. Calcium spike underlying rhythmic firing in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Neurosci Res* **18**:195–207. doi:10.1016/0168-0102(93)90055-U
- Kawaguchi Y. 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* **13**:4908–4923. doi:10.1523/jneurosci.13-11-04908.1993

- Kecskés M, Jacobs G, Kerselaers S, Syam N, Menigoz A, Vangheluwe P, Freichel M, Flockerzi V, Voets T, Vennekens R. 2015. The Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4 is a negative regulator of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* **110**. doi:10.1007/s00395-015-0501-x
- Keegan LP, Gallo A, O'Connell MA. 2001. The many roles of an RNA editor. *Nat Rev Genet* **2**:869–878. doi:10.1038/35098584
- Khalili-Araghi F, Tajkhorshid E, Roux B, Schulten K. 2012. Molecular dynamics investigation of the ω -current in the Kv1.2 voltage sensor domains. *Biophys J* **102**:258–267. doi:10.1016/j.bpj.2011.10.057
- Khaliq ZM, Bean BP. 2010. Pacemaking in Dopaminergic Ventral Tegmental Area Neurons: Depolarizing Drive from Background and Voltage-Dependent Sodium Conductances. *J Neurosci* **30**:7401–7413. doi:10.1523/jneurosci.0143-10.2010
- Khaliq ZM, Bean BP. 2008. Dynamic, Nonlinear Feedback Regulation of Slow Pacemaking by A-Type Potassium Current in Ventral Tegmental Area Neurons. *J Neurosci* **28**:10905–10917. doi:10.1523/jneurosci.2237-08.2008
- Kim HF, Ghazizadeh A, Hikosaka O. 2015. Dopamine Neurons Encoding Long-Term Memory of Object Value for Habitual Behavior. *Cell* **163**:1165–1175. doi:10.1016/j.cell.2015.10.063
- Kim JI, Ganesan S, Luo SX, Wu YW, Park E, Huang EJ, Chen L, Ding JB. 2015. Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* **350**:102–106. doi:10.1126/science.aac4690
- Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham

- A, You-Ten AJ, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW. 2005. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5215–5220. doi:10.1073/pnas.0501282102
- Kim SR, Lee DY, Chung ES, Oh UT, Kim SU, Jin BK. 2005. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons In vivo and In vitro. *J Neurosci* **25**:662–671. doi:10.1523/JNEUROSCI.4166-04.2005
- Kimm T, Khaliq ZM, Bean BP. 2015. Differential Regulation of Action Potential Shape and Burst-Frequency Firing by BK and Kv2 Channels in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* **35**:16404–16417.
- Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. 1999. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* **9**:690–697. doi:10.1016/S0959-4388(99)00040-9
- Klassen TL, Spencer AN, Gallin WJ. 2008. A naturally occurring omega current in a Kv3 family potassium channel from a platyhelminth. *BMC Neurosci* **9**:1–12. doi:10.1186/1471-2202-9-52
- Kobayashi S, Schultz W. 2014. Reward contexts extend dopamine signals to unrewarded stimuli. *Curr Biol* **24**:56–62. doi:10.1016/j.cub.2013.10.061
- 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. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016787

- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J. 2008. Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron* **57**:760–773. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.022
- Langston JW, Forno LS, Tetud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* **46**:598–605. doi:10.1002/1531-8249(199910)46:4<598::AID-ANA7>3.0.CO;2-F
- Lavoie B, Smith Y, Parent A. 1989. Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* **289**:36–52. doi:10.1002/cne.902890104
- 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. doi:10.1002/cne.903550308
- Lee J-H, Cribbs LL, Perez-Reyes E. 1999. Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *FEBS Lett* **445**:231–236. doi:10.1016/S0014-5793(99)00082-4
- Leo D, Sukhanov I, Zoratto F, Illiano P, Caffino L, Sanna F, Messa G, Emanuele M, Esposito A, Dorofeikova M, Budygin EA, Mus L, Efimova E, Niello M, Espinoza S, Sotnikova TD, Hoener MC, Laviola G, Fumagalli F, Adriani W, Gainetdinov RR. 2018. Pronounced hyperactivity, cognitive dysfunctions, and BDNF dysregulation in dopamine transporter knock-out rats. *J Neurosci* **38**:1959–1972.

doi:10.1523/JNEUROSCI.1931-17.2018

Lerner TN, Shilyansky C, Davidson TJ, Evans KE, Beier KT, Zalocusky KA, Crow AK, Malenka RC, Luo L, Tomer R, Deisseroth K. 2015. Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell* **162**:635–647. doi:10.1016/j.cell.2015.07.014

Lewis AH, Raman IM. 2014. Resurgent current of voltage-gated Na⁺ channels. *J Physiol* **592**:4825–4838. doi:10.1113/jphysiol.2014.277582

Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J. 2001. Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J* **20**:5715–5724. doi:10.1093/emboj/20.20.5715

Liss B, Haeckel O, Wildmann J, Miki T, Seino S, Roeper J. 2005. K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nat Neurosci* **8**:1742–1751. doi:10.1038/nn1570

Liss B, Roeper J. 2008. Individual dopamine midbrain neurons: Functional diversity and flexibility in health and disease. *Brain Res Rev* **58**:314–321. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.10.004

Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH. 1992. A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **70**:539–551. doi:10.1016/0092-8674(92)90425-C

Ljungberg T, Apicella P, Schultz W. 1991. Responses of monkey midbrain dopamine neurons during delayed alternation performance. *Brain Res* **567**:337–341. doi:10.1016/0006-8993(91)90816-E

- Lobb CJ, Wilson CJ, Paladini CA. 2010. A Dynamic Role for GABA Receptors on the Firing Pattern of Midbrain Dopaminergic Neurons. *J Neurophysiol* **104**:403–413. doi:10.1152/jn.00204.2010
- Lu B, Su Y, Das S, Liu J, Xia J, Ren D. 2007. The Neuronal Channel NALCN Contributes Resting Sodium Permeability and Is Required for Normal Respiratory Rhythm. *Cell* **129**:371–383. doi:10.1016/J.CELL.2007.02.041
- Lutas A, Lahmann C, Soumillon M, Yellen G. 2016. The leak channel NALCN controls tonic firing and glycolytic sensitivity of substantia nigra pars reticulata neurons. *Elife* **5**. doi:10.7554/eLife.15271
- Margolis EB, Mitchell JM, Ishikawa J, Hjelmstad GO, Fields HL. 2008. Midbrain dopamine neurons: Projection target determines action potential duration and dopamine D2 receptor inhibition. *J Neurosci* **28**:8908–8913. doi:10.1523/JNEUROSCI.1526-08.2008
- Marin F, Herrero MT, Vyas S, Puellas L. 2005. Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA expression in mid- and forebrain: Neuromeric pattern and novel positive regions. *Dev Dyn* **234**:709–717. doi:10.1002/dvdy.20467
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. 1984. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* **311**:464–467. doi:10.1038/311464a0
- Marsden CD. 1982. BASAL GANGLIA DISEASE. *Lancet* **320**:1141–1147. doi:10.1016/S0140-6736(82)92797-0
- Mason ER, Wu F, Patel RR, Xiao Y, Cannon SC, Cummins TR. 2019. Resurgent and gating pore currents induced by De Novo SCN2A

- epilepsy mutations. *eNeuro* **6**:1–17. doi:10.1523/ENEURO.0141-19.2019
- Matsuda W., Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. 2009. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *J Neurosci* **29**:444–453. doi:10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009
- Matsuda Wakoto, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. 2009. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *J Neurosci* **29**.
- Matsumoto M, Hikosaka O. 2009. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* **459**:837–841. doi:10.1038/nature08028
- Matsumoto M, Takada M. 2013. Distinct Representations of Cognitive and Motivational Signals in Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* **79**:1011–1024. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.002
- Matthews G, Wickelgren WO. 1977. Effects of guanidine on transmitter release and neuronal excitability. *J Physiol* **266**:69–89. doi:10.1113/jphysiol.1977.sp011756
- Menegas W, Akiti K, Amo R, Uchida N, Watabe-Uchida M. 2018. Dopamine neurons projecting to the posterior striatum reinforce avoidance of threatening stimuli. *Nat Neurosci* **21**:1421–1430. doi:10.1038/s41593-018-0222-1
- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G. 1995. Properties of the Hyperpolarization-activated Cation Current Ih in Rat Midbrain Dopaminergic Neurons. *Eur J Neurosci* **7**:462–469.

doi:10.1111/j.1460-9568.1995.tb00342.x

Mercuri NB, Bond A, Calabresi P, Stratta F, Stefani A, Bernardi G. 1994. Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. *Br J Pharmacol* **113**:831–838. doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb17068.x

Meza RC, López-Jury L, Canavier CC, Henny P. 2018. Role of the Axon Initial Segment in the Control of Spontaneous Frequency of Nigral Dopaminergic Neurons In Vivo. *J Neurosci* **38**:733–744. doi:10.1523/JNEUROSCI.1432-17.2017

Miceli F, Vargas E, Bezanilla F, Taglialatela M. 2012. Gating currents from Kv7 channels carrying neuronal hyperexcitability mutations in the voltage-sensing domain. *Biophys J* **102**:1372–1382. doi:10.1016/j.bpj.2012.02.004

Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. 2016. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron* **90**:675–691. doi:10.1016/J.NEURON.2016.03.038

Middleton FA, Strick PL. 2000. Basal ganglia and cerebellar loops: Motor and cognitive circuits. *Brain Res Rev* **31**:236–250. doi:10.1016/S0165-0173(99)00040-5

Mink JW. 1996. The basal ganglia: Focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol* **50**:381–425. doi:10.1016/S0301-0082(96)00042-1

Monteleone S, Lieb A, Pinggera A, Negro G, Fuchs JE, Hofer F, Striessnig J, Tuluc P, Liedl KR. 2017. Mechanisms Responsible for ω -Pore Currents in Cav Calcium Channel Voltage-Sensing Domains. *Biophys J* **113**:1485–1495. doi:10.1016/j.bpj.2017.08.010

- Morales M, Margolis EB. 2017. Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* **18**:73–85. doi:10.1038/nrn.2016.165
- Moreau A, Gosselin-Badaroudine P, Chahine M. 2014. Molecular biology and biophysical properties of ion channel gating pores. *Q Rev Biophys* **47**:364–388. doi:10.1017/S0033583514000109
- Moubarak E, Enge D, Dufour MA, Tapia M, Tell F, Goillard JM. 2019. Robustness to axon initial segment variation is explained by somatodendritic excitability in rat substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurosci* **39**:5044–5063. doi:10.1523/JNEUROSCI.2781-18.2019
- Mrejeru A, Wei A, Ramirez JM. 2011. Calcium-activated non-selective cation currents are involved in generation of tonic and bursting activity in dopamine neurons of the substantia nigra pars compacta. *J Physiol* **589**:2497–514. doi:10.1113/jphysiol.2011.206631
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. 2008. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* **152**:1024–1031. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.046
- Nakahara H, Itoh H, Kawagoe R, Takikawa Y, Hikosaka O. 2004. Dopamine Neurons Can Represent Context-Dependent Prediction Error. *Neuron* **41**:269–280. doi:10.1016/S0896-6273(03)00869-9
- Nambu A, Tokuno H, Takada M. 2002. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neurosci Res* **43**:111–117. doi:10.1016/S0168-0102(02)00027-5

- Nedergaard S, Flatman JA, Engberg I. 1993. Nifedipine- and omega-conotoxin-sensitive Ca^{2+} conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J Physiol* **466**:727–747. doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019742
- Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J. 2002. I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* **22**:1290–302. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-04-01290.2002
- Nieoullon A. 2002. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* **67**:53–83. doi:10.1016/S0301-0082(02)00011-4
- Nirenberg MJ, Chan J, Pohorille A, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM. 1997. The dopamine transporter: Comparative ultrastructure of dopaminergic axons in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J Neurosci* **17**:6899–6907. doi:10.1523/jneurosci.17-18-06899.1997
- Nomoto K, Schultz W, Watanabe T, Sakagami M. 2010. Temporally extended dopamine responses to perceptually demanding reward-predictive stimuli. *J Neurosci* **30**:10692–10702. doi:10.1523/JNEUROSCI.4828-09.2010
- O’Leary T, Williams AH, Franci A, Marder E. 2014. Cell Types, Network Homeostasis, and Pathological Compensation from a Biologically Plausible Ion Channel Expression Model. *Neuron* **82**:809–821. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.002
- Omodei D, Acampora D, Mancuso P, Prakash N, Di Giovannantonio LG, Wurst W, Simeone A. 2008. Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic

- progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* **135**:3459–3470. doi:10.1242/dev.027003
- Oorschot DE. 1996. Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: A stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol* **366**:580–599. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960318)366:4<580::AID-CNE3>3.0.CO;2-0
- Otomo K, Perkins J, Kulkarni A, Stojanovic S, Roeper J, Paladini CA. 2020. In vivo patch-clamp recordings reveal distinct subthreshold signatures and threshold dynamics of midbrain dopamine neurons. *Nat Commun* **11**:6286. doi:10.1038/s41467-020-20041-2
- Pacelli C, Giguère N, Bourque M-J, Lévesque M, Slack RS, Trudeau L-É. 2015. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Curr Biol* **25**:2349–2360. doi:10.1016/j.cub.2015.07.050
- Paladini CA, Robinson S, Morikawa H, Williams JT, Palmiter RD. 2003. Dopamine controls the firing pattern of dopamine neurons via a network feedback mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2866–2871. doi:10.1073/pnas.0138018100
- Paladini CA, Tepper JM. 2016. Neurophysiology of Substantia Nigra Dopamine Neurons: Modulation by GABA and Glutamate. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier B.V. pp. 335–359. doi:10.1016/B978-0-12-802206-1.00017-9
- Panman L, Papathanou M, Laguna A, Oosterveen T, Volakakis N, Acampora D, Kurtzdotter I, Yoshitake T, Kehr J, Joodmardi E, Muhr J, Simeone A, Ericson J, Perlmann T. 2014. Sox6 and Otx2 control the specification

- of substantia nigra and ventral tegmental area dopamine neurons. *Cell Rep* **8**:1018–25. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.016
- Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Rev* **20**:128–154. doi:10.1016/0165-0173(94)00008-D
- Parker NF, Cameron CM, Taliaferro JP, Lee J, Choi JY, Davidson TJ, Daw ND, Witten IB. 2016. Reward and choice encoding in terminals of midbrain dopamine neurons depends on striatal target. *Nat Neurosci* **19**:845–854. doi:10.1038/nn.4287
- Parlato R, Liss B. 2017. Selective degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: emerging roles of altered calcium homeostasis and nucleolar function. *Neuroforum* **24**:A1–A9.
- Pennartz CMA, Bierlaagh MA, Geurtsen AMS. 1997. Cellular mechanisms underlying spontaneous firing in rat suprachiasmatic nucleus: Involvement of a slowly inactivating component of sodium current. *J Neurophysiol* **78**:1811–1825. doi:10.1152/jn.1997.78.4.1811
- Perozo E, Santacruz-Toloza L, Stefani E, Bezanilla F, Papazian DM. 1994. S4 Mutations Alter Gating Currents of Shaker K Channels. *Biophys J* **66**:345–354. doi:10.1016/s0006-3495(94)80783-0
- Philippart F, Destreel G, Merino-Sepúlveda P, Henny P, Engel D, Seutin V. 2016. Differential Somatic Ca²⁺ Channel Profile in Midbrain Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* **36**:7234–7245. doi:10.1523/JNEUROSCI.0459-16.2016
- Philippart F, Khaliq ZM. 2018. Gi/o protein-coupled receptors in dopamine neurons inhibit the sodium leak channel NALCN. *Elife* **7**.

doi:10.7554/eLife.40984

Pissadaki EK, Bolam JP. 2013. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. *Front Comput Neurosci* **7**:13. doi:10.3389/fncom.2013.00013

Poulin J-F, Zou J, Drouin-Ouellet J, Kim K-YA, Cicchetti F, Awatramani RB. 2014. Defining Midbrain Dopaminergic Neuron Diversity by Single-Cell Gene Expression Profiling. *Cell Rep* **9**:930–943. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.008

Poulin JF, Caronia G, Hofer C, Cui Q, Helm B, Ramakrishnan C, Chan CS, Dombeck DA, Deisseroth K, Awatramani R. 2018. Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat Neurosci* **21**:1260–1271. doi:10.1038/s41593-018-0203-4

Poulin JF, Gaertner Z, Moreno-Ramos OA, Awatramani R. 2020. Classification of Midbrain Dopamine Neurons Using Single-Cell Gene Expression Profiling Approaches. *Trends Neurosci* **43**:155–169. doi:10.1016/j.tins.2020.01.004

Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK. 2013. SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med* **34**:197–219. doi:10.1016/j.mam.2012.07.002

Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang SL, Wurst W, Simeone A. 2004. Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* **131**:2037–2048. doi:10.1242/dev.01107

Puopolo M, Bean BP, Raviola E. 2005. Spontaneous activity of isolated

- dopaminergic periglomerular cells of the main olfactory bulb. *J Neurophysiol* **94**:3618–3627. doi:10.1152/jn.00225.2005
- Puopolo M, Raviola E, Bean BP. 2007. Roles of Subthreshold Calcium Current and Sodium Current in Spontaneous Firing of Mouse Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* **27**:645–656. doi:10.1523/JNEUROSCI.4341-06.2007
- Putzier I, Kullmann PHM, Horn JP, Levitan ES. 2009. Cav1.3 channel voltage dependence, not Ca²⁺ selectivity, drives pacemaker activity and amplifies bursts in nigral dopamine neurons. *J Neurosci* **29**:15414–15419. doi:10.1523/JNEUROSCI.4742-09.2009
- Qian H, Kang X, Hu J, Zhang D, Liang Z, Meng F, Zhang X, Xue Y, Maimon R, Dowdy SF, Devaraj NK, Zhou Z, Mobley WC, Cleveland DW, Fu XD. 2020. Reversing a model of Parkinson's disease with in situ converted nigral neurons. *Nature* **582**:550–556. doi:10.1038/s41586-020-2388-4
- Raman IM, Bean BP. 1997. Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* **17**:4517–4526. doi:10.1523/jneurosci.17-12-04517.1997
- Ren Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. 2005. Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J Biol Chem* **280**:34105–34112. doi:10.1074/jbc.M503483200
- Richards CD, Shiroyama T, Kitai ST. 1997. Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* **80**:545–557. doi:10.1016/S0306-4522(97)00093-6
- 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. doi:10.1016/0306-4522(89)90168-1
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ. 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**:1219–1223. doi:10.1126/science.2820058
- Robinson DL, Heien MLAV, Wightman RM. 2002. Frequency of dopamine concentration transients increases in dorsal and ventral striatum of male rats during introduction of conspecifics. *J Neurosci* **22**:10477–10486. doi:10.1523/jneurosci.22-23-10477.2002
- Robinson DL, Phillips PEM, Budygin EA, Trafton BJ, Garriss PA, Wightman RM. 2001. Sub-second changes in accumbal dopamine during sexual behavior in male rats. *Neuroreport* **12**:2549–2552. doi:10.1097/00001756-200108080-00051
- Robinson RB, Dun W, Boyden PA. 2020. Autonomic modulation of sinoatrial node: Role of pacemaker current and calcium sensitive adenylyl cyclase isoforms. *Prog Biophys Mol Biol* **24**. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2020.08.004
- Robinson S, Smith DM, Mizumori SJY, 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. doi:10.1073/pnas.0405084101
- Sanghera MK, Trulson ME, German DC. 1984. Electrophysiological properties of mouse dopamine neurons: In vivo and in vitro studies. *Neuroscience* **12**:793–801. doi:10.1016/0306-4522(84)90171-4
- Satoh T, Nakai S, Sato T, Kimura M. 2003. Correlated Coding of Motivation

- and Outcome of Decision by Dopamine Neurons. *J Neurosci* **23**:9913–9923. doi:10.1523/jneurosci.23-30-09913.2003
- Saunders A, Macosko EZ, Wysoker A, Goldman M, Krienen FM, de Rivera H, Bien E, Baum M, Bortolin L, Wang S, Goeva A, Nemesh J, Kamitaki N, Brumbaugh S, Kulp D, McCarroll SA. 2018. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell* **174**:1015–1030.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.07.028
- Schiemann J, Schlaudraff F, Klose V, Bingmer M, Seino S, Magill PJ, Zaghloul KA, Schneider G, Liss B, Roeper J. 2012. K-ATP channels in dopamine substantia nigra neurons control bursting and novelty-induced exploration. *Nat Neurosci* **15**:1272–1280. doi:10.1038/nn.3185
- Schultz W. 2019. Recent advances in understanding the role of phasic dopamine activity [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research*. doi:10.12688/f1000research.19793.1
- Schultz W. 2016. Dopamine reward prediction-error signalling: A two-component response. *Nat Rev Neurosci*. doi:10.1038/nrn.2015.26
- Schultz W. 2007. Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu Rev Neurosci* **30**:259–288. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722
- Schultz W. 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* **80**:1–27. doi:10.1152/jn.1998.80.1.1
- Schultz W, Apicella P, Ljungberg T. 1993. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci* **13**:900–913. doi:10.1523/jneurosci.13-03-00900.1993

- Schultz W, Dayan P, Montague PR. 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science* (80-) **275**:1593–1599. doi:10.1126/science.275.5306.1593
- Seutin V, Engel D. 2010. Differences in Na⁺ conductance density and Na⁺ channel functional properties between dopamine and GABA neurons of the rat substantia nigra. *J Neurophysiol* **103**:3099–114. doi:10.1152/jn.00513.2009
- Seutin V, Johnson SW, North RA. 1993. Apamin increases NMDA-induced burst-firing of rat mesencephalic dopamine neurons. *Brain Res* **630**:341–344. doi:10.1016/0006-8993(93)90675-D
- Seutin V, Massotte L, Renette MF, Dresse A. 2001. Evidence for a modulatory role of Ih on the firing of a subgroup of midbrain dopamine neurons. *Neuroreport* **12**:255–258. doi:10.1097/00001756-200102120-00015
- Sharp AA, O'Neil MB, Abbott LF, Marder E. 1993. Dynamic clamp: Computer-generated conductances in real neurons. *J Neurophysiol* **69**:992–995. doi:10.1152/jn.1993.69.3.992
- Shimada S, Kitayama S, Walther D, Uhl G. 1992. Dopamine transporter mRNA: dense expression in ventral midbrain neurons. *Mol Brain Res* **13**:359–362. doi:10.1016/0169-328X(92)90220-6
- Sigworth FJ, Neher E. 1980. Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* **287**:447–449. doi:10.1038/287447a0
- Silm K, Yang J, Marcott PF, Asensio CS, Eriksen J, Guthrie DA, Newman AH, Ford CP, Edwards RH. 2019. Synaptic Vesicle Recycling Pathway Determines Neurotransmitter Content and Release Properties.

- Neuron* **102**:786-800.e5. doi:10.1016/j.neuron.2019.03.031
- Singh-Bains MK, Waldvogel HJ, Faull RLM. 2016. The role of the human globus pallidus in Huntington's disease. *Brain Pathol* **26**:741–751. doi:10.1111/bpa.12429
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy J V., McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Elving Anderson V, Leppert M. 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* **18**:25–29. doi:10.1038/ng0198-25
- Soden ME, Jones GL, Sanford CA, Chung AS, Güler AD, Chavkin C, Luján R, Zweifel LS. 2013. Disruption of dopamine neuron activity pattern regulation through selective expression of a human KCNN3 mutation. *Neuron* **80**:997–1009. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.044
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. 2010. Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of NaV1.4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations. *J Gen Physiol* **136**:225–236. doi:10.1085/jgp.201010414
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. 2007. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* **446**:76–78. doi:10.1038/nature05598
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. 2005. Ion Permeation through a Voltage- Sensitive Gating Pore in Brain Sodium Channels Having Voltage Sensor Mutations. *Neuron* **47**:183–189. doi:10.1016/J.NEURON.2005.06.012
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG. 1997. Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the

- actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* **17**:960–74. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-03-00960.1997
- Starace DM, Bezanilla F. 2004a. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* **427**:548–553. doi:10.1038/nature02270
- Starace DM, Bezanilla F. 2004b. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* **427**:548–553. doi:10.1038/nature02270
- Subramaniam M, Althof D, Gispert S, Schwenk J, Auburger G, Kulik A, Fakler B, Roeper J. 2014. Mutant α -synuclein enhances firing frequencies in dopamine substantia nigra neurons by oxidative impairment of A-type potassium channels. *J Neurosci* **34**:13586–13599. doi:10.1523/JNEUROSCI.5069-13.2014
- Sulzer D, Cragg SJ, Rice ME. 2016. Striatal dopamine neurotransmission: Regulation of release and uptake. *Basal Ganglia*. doi:10.1016/j.baga.2016.02.001
- Sun Y, Sukumaran P, Selvaraj S, Cilz NI, Schaar A, Lei S, Singh BB. 2016. TRPM2 Promotes Neurotoxin MPP+/MPTP-Induced Cell Death. *Mol Neurobiol* **55**:409–420. doi:10.1007/s12035-016-0338-9
- Sun Y, Zhang XH, Selvaraj S, Sukumaran P, Lei S, Birnbaumer L, Brij X, Singh B. 2017. Inhibition of L-Type Ca²⁺ Channels by TRPC1-STIM1 Complex Is Essential for the Protection of Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* **37**:3364–3377. doi:10.1523/JNEUROSCI.3010-16.2017
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J. 2010. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium* **47**:175–82. doi:10.1016/j.ceca.2009.12.003

- Taddese A, Bean BP. 2002. Subthreshold Sodium Current from Rapidly Inactivating Sodium Channels Drives Spontaneous Firing of Tuberomammillary Neurons. *Neuron* **33**:587–600. doi:10.1016/S0896-6273(02)00574-3
- Takikawa Y, Kawagoe R, Hikosaka O. 2004. A Possible Role of Midbrain Dopamine Neurons in Short- and Long-Term Adaptation of Saccades to Position-Reward Mapping. *J Neurophysiol* **92**:2520–2529. doi:10.1152/jn.00238.2004
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW. 2011. Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ Health Perspect* **119**:866–872. doi:10.1289/ehp.1002839
- Tarfa RA, Evans RC, Khaliq ZM. 2017. Enhanced sensitivity to hyperpolarizing inhibition in mesoaccumbal relative to nigrostriatal dopamine neuron subpopulations. *J Neurosci* **37**:3311–3330. doi:10.1523/JNEUROSCI.2969-16.2017
- Tepper JM, Damlama M, Trent F. 1994. Postnatal changes in the distribution and morphology of rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neuroscience* **60**:469–477. doi:10.1016/0306-4522(94)90258-5
- Tepper JM, Lee CR. 2007. GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons. *Prog Brain Res* **160**:189–208. doi:10.1016/S0079-6123(06)60011-3
- Tepper JM, Trent F, Nakamura S. 1991. In Vivo Development of the

- Spontaneous Activity of Rat Nigrostriatal Dopaminergic Neurons. pp. 259–268. doi:10.1007/978-1-4684-5871-8_26
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. 2005a. Voltage-Sensing Arginines in a Potassium Channel Permeate and Occlude Cation-Selective Pores. *Neuron* **45**:379–388. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.047
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. 2005b. Voltage-Sensing Arginines in a Potassium Channel Permeate and Occlude Cation-Selective Pores. *Neuron* **45**:379–388. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.047
- Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bond A, De Lecea L, Deisseroth K. 2009. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* (80-) **324**:1080–1084. doi:10.1126/science.1168878
- Tysnes OB, Storstein A. 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* **124**:901–905. doi:10.1007/s00702-017-1686-y
- Ungerstedt U. 1971. Striatal Dopamine Release after Amphetamine or Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behaviour. *Acta Physiol Scand* **82**:49–68. doi:10.1111/j.1365-201X.1971.tb10999.x
- Ungerstedt U. 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* **5**:107–110. doi:10.1016/0014-2999(68)90164-7
- Vay L, Gu C, McNaughton PA. 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* **165**:787–801. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x
- Venton BJ, Zhang H, Garris PA, Phillips PEM, Sulzer D, Wightman RM. 2003. Real-time decoding of dopamine concentration changes in the

- caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J Neurochem* **87**:1284–1295. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02109.x
- Vernay B, Koch M, Vaccarino F, Briscoe J, Simeone A, Kageyama R, Ang SL. 2005. Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J Neurosci* **25**:4856–4867. doi:10.1523/JNEUROSCI.5158-04.2005
- Vriens J, Held K, Janssens A, Tóth BI, Kerselaers S, Nilius B, Vennekens R, Voets T. 2014. Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel. *Nat Chem Biol* **10**:188–195. doi:10.1038/nchembio.1428
- Wang M, Ling KH, Tan JJ, Lu CB. 2020. Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells*. doi:10.3390/cells9061489
- Waroux O, Massotte L, Alleva L, Graulich A, Thomas E, Liégeois J-F, Scuvée-Moreau J, Seutin V. 2005. SK channels control the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons *in vivo*. *Eur J Neurosci* **22**:3111–3121. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04484.x
- Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A, Uchida N. 2012. Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* **74**:858–873. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.017
- Wilson CJ, Groves PM, Fifková E. 1977. Monoaminergic synapses, including dendro-dendritic synapses in the rat substantia nigra. *Exp Brain Res* **30**:161–174. doi:10.1007/BF00237248
- Wise RA. 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* **5**:483–494. doi:10.1038/nrn1406

- Wolfart J, Neuhoff H, Franz O, Roeper J. 2001. Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* **21**:3443–56. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-10-03443.2001
- Wolfart J, Roeper J. 2002. Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* **22**:3404–13. doi:20026345
- Wu LJ, Wu G, Sharif MRA, Baker A, Jia Y, Fahey FH, Luo HR, Feener EP, Clapham DE. 2012. The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke. *Nat Neurosci* **15**:565–573. doi:10.1038/nn.3059
- Wu X, Liao L, Liu X, Luo F, Yang T, Li C. 2012. Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents? *Channels* **6**:438–442. doi:10.4161/chan.22209
- Yamada-Hanff J, Bean BP. 2013. Persistent Sodium Current Drives Conditional Pacemaking in CA1 Pyramidal Neurons under Muscarinic Stimulation. *J Neurosci* **33**:15011–15021. doi:10.1523/JNEUROSCI.0577-13.2013
- Yin HH, Knowlton BJ. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* **7**:464–476. doi:10.1038/nrn1919
- Young CB, Sonne J. 2019. Neuroanatomy, Basal Ganglia, StatPearls. StatPearls Publishing.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM. 1990. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci* **13**:290–296. doi:10.1016/0166-2236(90)90112-N

Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall V, Fadok JP, Darvas M, Kim MJ, Mizumori SJY, Paladini CA, Phillips PEM, Palmiter RD. 2009. Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:7281–7288. doi:10.1073/pnas.0813415106

ANNEXES

Annexe 1 | Liste des amorces utilisées pour l'amplification de l'ARN codant pour les S4.

Forward Overhang : TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
Reverse Overhang : GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

SCN1A

SCN1AS41for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGTCATTACATTCGCATATGTGACG

SCN1AS41rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCCCCCACGATG

SCN1AS42for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTGGTAGAACTTGGCCTT

SCN1AS42rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTTAATGAGCATGTTTCAGTGTGGG

SCN1AS43for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCAAATGCCTTGGGTACTCT

SCN1AS43rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGAATTGCTCCTAACAGGGCA

SCN1AS44for1

CGATTATGTGACAAGCATTTTGTACAGT

SCN1AS44rev1

GGGTTTGCTGTTGAGGATGG

SCN1A/2AS44for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGAGCTGATAGAGAAGTATTTCTGT

SCN1A/2AS44rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCAGAGTGCGGATCC

SCN2A

SCN2AS41for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACAGAATTTGTAAACCTAGGCAATGTT

SCN2AS41rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGGCCCCCACGATA

SCN2AS42for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTTAATGGAACCTCGGCTTGGCG

SCN2AS42rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTTAATGAGCATGTTTCAGTGTGGG
SCN2AS43for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCAAATGCCTTGGGCTATTTCG
SCN2AS43rev
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGCGTTTACAACAACCCTCATTC

SCN2AS44for1
AGGAGATGACCAACATCCTGTACT
SCN2AS44rev1
TCAGGAGGTCCGCTATTTAGTATAGG

SCN8A

SCN8AS41for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGTCATCATGATGGCATATGTGACA
SCN8AS41rev
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCGCCACGATT

SCN8AS42for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGTTTAATGGAGCTGAGTCTCG
SCN8AS42rev
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGATCTTGATCAGCATGTTTCAGGG

SCN8AS43for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTAATGCCCTGGGCTACTCG
SCN8AS43rev
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGATGGCGCCCACCAAG

SCN8AS44for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTGGCTGATATCATTGAGAAGTA
SCN8AS44rev
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGGGTGCGGATCC

CACNA1B

CACNA1BS41for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGCCACAGCTGGAACCTGA
CACNA1BS41rev
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTTGAGCACCACTG

CACNA1BS42for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCATCAAGCCAGGAACCTCCTTC
CACNA1BS42rev
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGGGAAACAACCAGGTTCCCT

CACNA1BS43for
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGGATCCAAAGGGAAAGACATCAA

CACNA1BS43rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGAGAGTTACCACACAGTCAAAC

CACNA1BS44for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGTAACGGAGATTGCGAACAACCTTC

CACNA1BS44rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTCCATAACAAGATGCGGATGGT

CACNA1C*CACNA1CS41for*

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGCTCTGGGAGGGAAAGG

CACNA1CS41rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGAGTTCAGGACCACCTGG

CACNA1CS42for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCATCCTGGTGGAGACGAAGA

CACNA1CS42rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCGCACTGAGTTCAGCAA

CACNA1CS43for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATTCAGTCCAGCGCGATCAA

CACNA1CS43rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCACAAACACACACTGAACG

CACNA1CS44for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCAGAGGAGAACTCCCG

CACNA1CS44rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGATGAAGGTCCACAGCAGG

CACNA1D*CACNA1DS41for*

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTAGTGGCAAATCAGGAGGC

CACNA1DS41rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGAGTTCAGAACAACCTTGTAACCTG

CACNA1DS42for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCCTGGTGGAACCTGGAGC

CACNA1DS42rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCGATGGACTTCATGGAGTTTAACAG

CACNA1DS43for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGATTCAATCCAGTGCCATCTC

CACNA1DS43rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCACAAAGACACACTGGACC

CACNA1DS44for

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGACAACCTCTGAAGAGAGCAATAGA

CACNA1DS44rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTTAATGAAGGTCCATAGCAG

KCND3*KCND3S4for*

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGGTCATGACCAACAACGAG

KCND3S4rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCTTCAGGGTGTAGCCTAGG

HCN3*HCN3S4for*

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCCACGACTAGACGCT

HCN3S4rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCTCCTCCCACTGGTGC

HCN4*HCN4S4for*

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTAGTGGAGACTCGCATTGACTCG

HCN4S4rev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGAAGATCTCTTCCCACTGGTGA

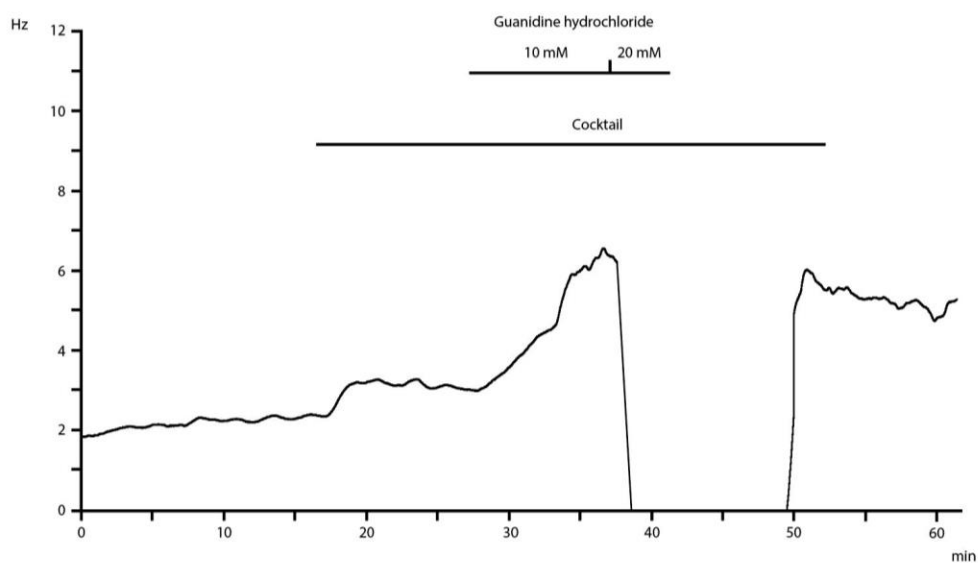
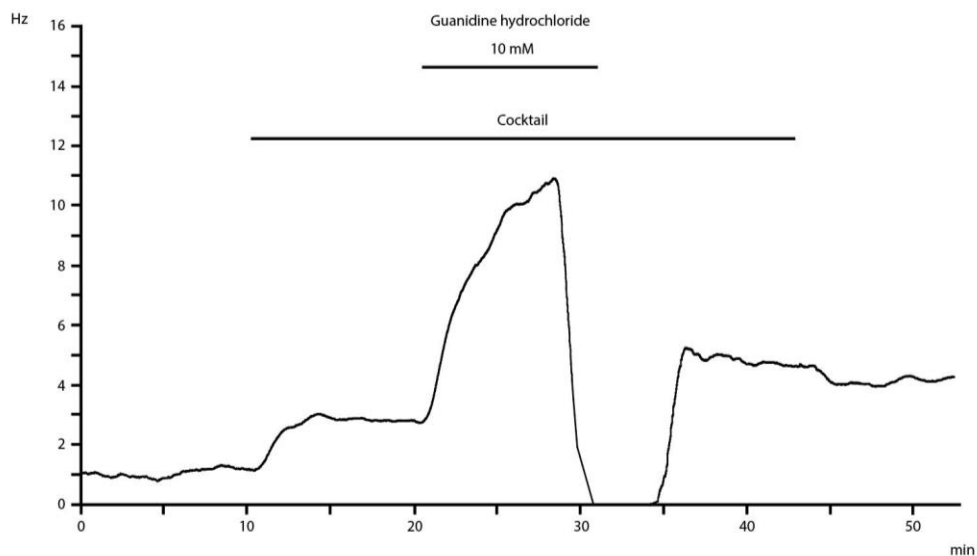
Domaine IQ Cav1.3*CACNA1DIQfor*

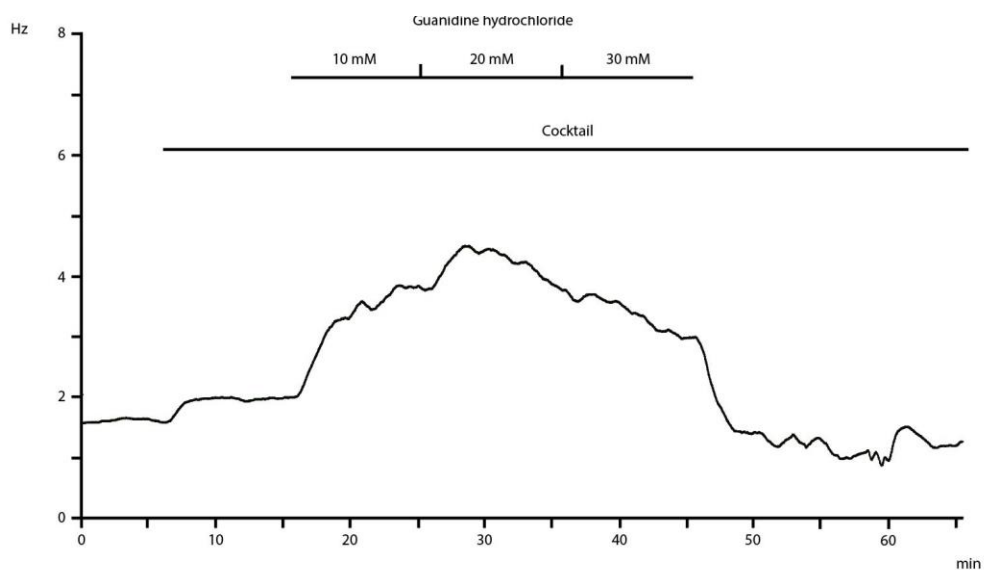
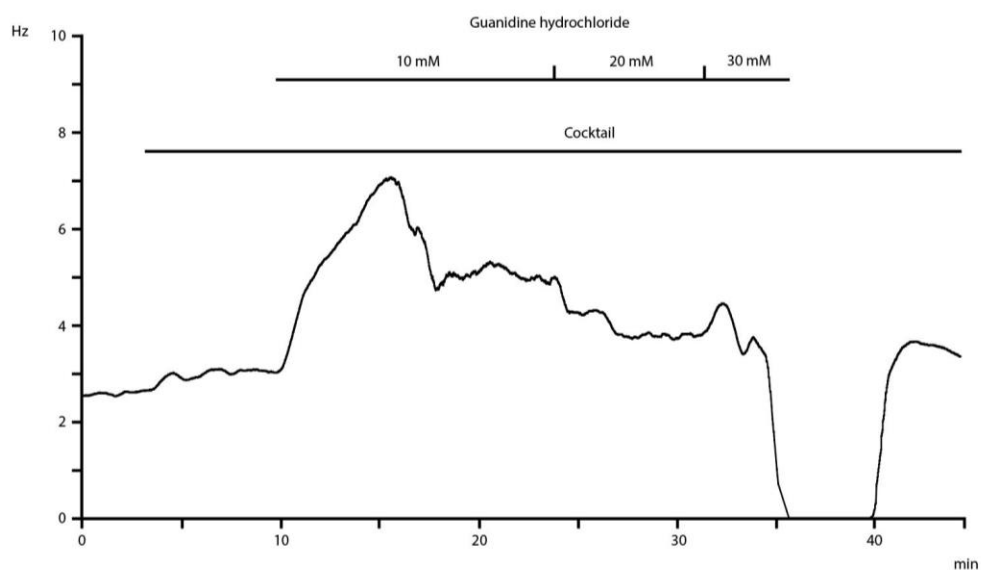
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAAGTTGTCCCTCCAGCT

CACNA1DIQrev

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTGGTGTCTTCGCAGGTAT

Annexe 2 | Enregistrements extracellulaires de l'inhibition de l'activité spontanée des neurones DA de la SNc par différentes concentrations de gua^+ . A : Inhibition à 10 mM de gua^+ . B : Inhibition à 20 mM de gua^+ . C : Inhibition à 30 mM de gua^+ . D : Absence d'inhibition à 30 mM de gua^+ .





ARTICLES

An unconventional conductance is required for pacemaking of nigral dopamine neurons (under reviewing)

Biorxiv DOI : <https://doi.org/10.1101/2020.12.16.423073>

Kevin Jehasse¹, Laurent Massotte¹, Sebastian Hartmann², Romain Vitello³, Sofian Ringlet¹, Marie Vitello¹, Han Chow Chua⁴, Stephan A. Pless⁴, Dominique Engel¹, Jean-François Liégeois³, Bernard Lakaye⁵, Jochen Roeper^{2,*} and Vincent Seutin^{1,*}

¹Laboratory of Neurophysiology, GIGA-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium

²Institute for Neurophysiology, Goethe University, Frankfurt, Germany

³Laboratory of Medicinal Chemistry, CIRM, University of Liège, Liège, Belgium

⁴Department of Drug Design and Pharmacology, University of Copenhagen, Denmark

⁵Laboratory of Molecular Regulation of Neurogenesis, GIGA-Stem Cells, University of Liège, Liège, Belgium

*Both last authors contributed equally to this work

Correspondence:

Vincent Seutin (Laboratory of Neurophysiology, GIGA-Neurosciences, University of Liège) : V.Seutin@uliege.be

ABSTRACT

Although several ionic mechanisms are known to control rate and regularity of the pacemaker in dopamine (DA) neurons from the substantia nigra pars compacta (SNc), a conductance essential for pacing has yet to be defined. Here we provide pharmacological evidence that pacemaking of SNc DA neurons is enabled by an unconventional conductance. We found that 1-(2,4-xylyl)guanidine (XG), an established blocker of gating pore currents in mutant voltage gated sodium channels, selectively stops pacemaking of DA SNc neurons and is without effect on the main pore of their voltage-gated channels. We isolated a voltage-dependent, non-inactivating XG-sensitive current of 20-25 pA which operates in the relevant subthreshold range and is carried by both Na⁺ and Cl⁻ ions. While the molecular identity of this conductance remains to be determined, we show that this XG-sensitive current is crucial to sustain pacemaking in these neurons.

MAIN TEXT

INTRODUCTION

Midbrain dopamine (DA) neurons are slow pacemaker neurons. They are involved in diverse psychomotor functions including control of movement, reward, motivation and cognition (Nieoullon, 2002; Schultz, 2007; Wise, 2004). Although several subpopulations of midbrain DA neurons have been described based on their projections, transcriptomic profiles and electrophysiological properties (Evans et al., 2017; Farassat et al., 2019; Liss and Roeper, 2008; Margolis et al., 2008; Neuhoff et al., 2002; Philippart et al., 2016; Poulin et al., 2014), the majority of DA neurons are able to fire action potentials (AP)

spontaneously at low frequency, in the range of 1 to 5 Hz, which might ensure a basal level of DA signaling in the target areas (Albin et al., 1989; Gonon and Bloch, 1998; Grace and Bunney, 1984b). They are also known to switch their firing mode from pacemaking to burst activity in response to synaptic input (Grace and Bunney, 1984b).

While the onset of bursting is clearly linked to changes in synaptic inputs involving activation of NMDA receptors (Blythe et al., 2007; Destreel et al., 2019; Galtieri et al., 2017; Johnson et al., 1992), the exact mechanism(s) that enable DA neuron slow pacemaking is still unknown. Blocking the hyperpolarization-activated cation channels (HCN) sustaining I_h does not stop the autonomous activity of DA neurons, but it slows the firing frequency of some of them (Neuhoff et al., 2002; Seutin et al., 2001). It was also suggested that Ca^{2+} drives the spontaneous firing through L-type voltage-gated calcium (Ca_v) channels, as applying dihydropyridines (DHPs) slows or even silences the pacemaking of DA SNc neurons (Chan et al., 2007; Mercuri et al., 1994; Nedergaard et al., 1993; Puopolo et al., 2007). However, these experiments were made using high concentration of DHPs, leading to possible off-target actions or these effects were observed only in a subset of the recorded cells (Puopolo et al., 2007). Another study found no effect of lower concentrations of DHPs (Guzman et al., 2009).

Understanding what happens during the interspike interval (ISI) is key to uncover the nature of the autonomous activity of DA neurons. The coefficient of variation of the interspike interval (ISI) in DA SNc neurons *ex vivo* is very low, in the range of 5% (de Vrind et al., 2016). The current amplitude during the ISI has been estimated to be around 5 pA (Khaliq and Bean, 2008). Taking into account the gating properties and

the single channel conductance of most voltage-gated ion channels, which lies around 20 pS, this would mean that few ion channels would underlie this current. Given the stochastic nature of ion channel opening, such a current would inevitably be very noisy, which is incompatible with the small coefficient of variation of the ISI of DA neurons. A second option would be the result from the almost perfect cancellation of inward and outward currents ensuring the robustness of pacemaking (O’Leary et al., 2014). In DA neurons, it could be mediated by fast activating K^+ channels K_v4 (sustaining I_A) cooperating with HCN channels, but blocking both channels only affects their rebound firing (Amendola et al., 2012).

A third possibility would be the recruitment of many small conductance pores to ensure a steady pacemaking. We therefore turned our attention to unconventional pores displaying a very low conductance, in the range of fS, such as currents generated from gating pores (“gating pore currents” or “omega currents” (I_ω)). I_ω is generally the result of a pathological mutation in the voltage sensor domain, creating a pore through which ions can flow (Jiang et al., 2018; Sokolov et al., 2007; Tombola et al., 2005b). Their conductance has been estimated to be 1-6% the conductance of the main α pore of voltage-gated channels (Held et al., 2016). It was subsequently found that I_ω generated from a mutant voltage-gated sodium (Na_v) channel is selectively blocked by 1-(2,4-xylyl)guanidine (XG) (Sokolov et al., 2010). Since XG does not interact with the α pore of Na_v channels, we used it as a pharmacological tool to probe for such currents in DA SNc neurons.

RESULTS

XG inhibits the slow pacemaker activity of DA neurons across the entire midbrain.

We first performed extracellular recordings on acute brain slices from adult rats to investigate the effect of XG on the spontaneous activity on DA neurons. We applied synaptic blockers (10 μ M CNQX, 1 μ M MK-801, 1 μ M CGP55845, 10 μ M SR9551 and 1 μ M sulpiride) before and during the superfusion of XG to prevent any presynaptic effect of the compound. We observed that application of 2 mM XG stops the firing of these neurons (fig.1a). We then tested lower concentrations of XG (fig. 1b) and found that the compound inhibits the spontaneous firing of DA neurons in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 486 ± 51 μ M ($n = 6$ for each concentration; fig. 1c) and a Hill slope of 1.287 ± 0.194 . This result is consistent with the pharmacology of I_{ω} (Sokolov et al., 2010) and indicates that the inhibition is probably due to the interaction of XG with a single target. Since the carbonate salt of XG, which was used in these experiments, is difficult to solubilize at physiological pH, we synthesized a mesylate salt of XG which is much easier to use (see methods). We performed the same experiments with this compound and obtained an IC_{50} of 427 ± 43 μ M, which is not significantly different from the one of the carbonate salt ($n = 6$ for each condition, $p = 0.71$, extra sum-of-squares F test; fig. 1c). The Hill slope was 1.273 ± 0.153 . Interestingly, we obtained similar results on DA neurons located in the ventral tegmental area (VTA) using the mesylate salt of XG. These experiments yielded an IC_{50} for the blocker of 332.5 ± 95 μ M and a Hill slope of 1.052 ± 0.282 ($n = 6$ for each condition, $p = 0.15$, extra sum-of-squares F test; fig. 1c).

We also carried out cell-attached recordings on synaptically isolated mouse DA SNc neurons to verify whether the pacemaker inhibition by XG is species-dependent. We applied 2 mM XG after a stable baseline of spontaneous discharge was established (fig. 2a, b). After > 10 min, we opened the cells to the whole-cell configuration in order to fill the neuron with neurobiotin for post-hoc immunofluorescence identification (fig. 2e). We observed a strong reduction of firing frequency of 1.48 ± 0.16 Hz ($n = 10$, $p < 0.01$, t-test; fig. 2c) across the entire SNc (fig. 2d). These results indicate that the pacemaker inhibition by XG in DA SNc neurons is similar in both rats and mice.

XG selectively inhibits the pacemaker activity of DA SNc neurons.

We next investigated the mechanism of inhibition with whole-cell patch-clamp recordings. SNc DA neurons were identified as described in the methods (Fig.S1). In line with our previous experiments, extracellular application of XG was able to stop the spontaneous activity of DA SNc neurons (1.94 ± 0.18 Hz in control vs 0.02 ± 0.001 Hz in 2 mM XG, $n = 8$, $p = 0.0078$, Wilcoxon test; fig. 3a-b). Intriguingly, intracellular application of XG also inhibited the pacemaking (1.91 ± 0.29 Hz in control vs 0.0003 ± 0.0003 Hz during intracellular application of 2 mM XG, $n = 6$, $p = 0.0312$, Wilcoxon test; fig. 3c). We also tested 2 mM XG on GABA substantia nigra pars reticulata neurons, which are fast pacemaker neurons. XG did not significantly change the firing frequency of these neurons (8.18 ± 1.07 Hz in control vs 8.52 ± 1.06 Hz in 2 mM XG, $n = 7$; $p = 0.21$, t-test; fig. 3f-g).

Importantly, the membrane potential of DA SNc neurons during XG application stayed between -50 and -55 mV, indicating that the inhibition is not due to a strong hyperpolarization of the neurons. This was

confirmed in voltage clamp experiments, in which we clamped the cells at -50 mV and imposed a hyperpolarizing step to -60 mV. The whole-cell conductance was not affected by 2 mM XG (1.98 ± 0.23 nS in control, 1.97 ± 0.23 nS in the presence of the drug and 2.06 ± 0.23 nS during wash-out, $n = 8$ for each condition, $p = 0.17$, ANOVA-1; fig. S2). The holding current at -60 mV was unaffected as well. Taken together, these experiments demonstrate that XG inhibits the slow pacemaking of DA neurons specifically, reproducibly and without opening ion channels. In addition, since two different salts yielded similar results, we conclude that the xylglyguanidinium moiety is responsible for the observed effect.

Injection of a small positive current in the range of 10-30 pA was able to reinstate action potential firing, indicating that the inhibition is not due to blockade of the main pore of Na_v channels (fig. 4a). We performed current injections from 0 pA to 50 pA for 2 s to analyze three parameters of the AP: threshold, half-width and maximal slope. Application of 2 mM XG did not change the threshold ($p = 0.88$), the half-width ($p = 0.30$) or the maximal slope ($p = 0.40$) of the AP whatever the current amplitude ($n = 5$ for all conditions, ANOVA-2; fig. 4b, Table 1). We also performed 20 pA steps from 0 pA to 160 pA for 2 s to determine the shift in current needed to generate pacemaking. The linear regression (fig. 4c) of individual frequency-current curves shows that there was a shift from -19.43 ± 7.56 pA in control to 4.46 ± 2.32 pA in 2 mM XG ($n = 6$, $p = 0.03$, t-test; fig. 4e), indicating that the amplitude of the blocked current is -23.89 ± 8.21 pA. We also did not observe a significant change in the gain (68.63 ± 13.69 Hz/nA in control vs 84.79 ± 11.60 Hz/nA in 2 mM XG, $n = 6$, $p = 0.23$, t-test; fig. 4d), which is consistent with the results from the characterization of the action potential parameters. These

results demonstrate that the inhibition by XG is not due to the modulation of voltage-gated channels involved in AP generation but rather involves the blockade of a small but essential inward current in the subthreshold range.

Since DA neurons display two firing modes *in vivo*, we induced bursting activity by superfusing 30 μ M NMDA and 300 nM apamin to block SK channels, while injecting constant hyperpolarizing current (Destreel et al., 2019; Johnson et al., 1992) to test whether XG could modulate this firing mode. 2 mM XG did not modify the bursting: thus the number of bursts per second and the number of APs per burst did not change during the whole recording time (4.71 ± 0.36 APs in control vs 4.72 ± 0.31 in 2 mM XG, $n = 6$, $p = 0.9$, t-test; fig. 3d-e). These observations demonstrate that XG selectively blocks pacemaking without interfering with other types of firing patterns such as bursting activity (at least in this *ex vivo* model) in these neurons. This further demonstrates the very good selectivity of the drug on pacemaking of DA neurons.

XG-sensitive conductance is crucial for oscillatory events and pacemaking in DA SNc neurons

In DA neurons, the spontaneous firing involves a combination of different conductances, as blocking only Na_v or Ca_v is not sufficient to fully block autonomous activity (Drion et al., 2011; Guzman et al., 2009; Kang and Kitai, 1993). On the contrary, in all our whole-cell recordings, application of 2 mM XG was enough to silence DA neuron activity (fig. 2a). We next investigated whether these XG-sensitive channels can facilitate different oscillatory behaviors in DA neurons. We first studied autonomous oscillations by applying 1 μ M TTX (fig. 5b). As previously shown by others (Guzman et al., 2009; Sun et al., 2017), we found that

these oscillations are blocked by 5 μ M nifedipine, suggesting that they are mediated by L-type Ca_v channels (fig. 5a). Application of 2 mM XG abolished these oscillations ($n = 6$; fig. 5b). We then investigated whether XG could still inhibit pacemaker activity in the absence of L-type Ca_v -mediated oscillations. We applied 5 μ M nifedipine to block the latter. This did not change the firing frequency (1.96 ± 0.22 Hz in control vs 1.79 ± 0.18 Hz in 5 μ M nifedipine, $n = 6$, $p = 0.25$, Friedman test; fig. 5c,d). These results are consistent with the literature (Drion et al., 2011; Guzman et al., 2009). Application of 2 mM XG also led to an almost complete inhibition of the spontaneous activity of DA SNc neurons (0.05 ± 0.03 Hz in 5 μ M nifedipine + 2 mM XG vs 1.78 ± 0.18 Hz in 5 μ M nifedipine only, $p = 0.0433$, Friedman test; fig. 5c, d). These data strongly suggest that an XG-sensitive current (I_{XG}) is crucial to recruit various types of depolarizing channels to drive oscillatory events in DA SNc neurons.

Given that the robustness of the pacemaking activity in DA neurons may involve a cooperation between Na_v , K_v4 , $\text{Ca}_v1.3$ and HCN channels, we next investigated whether blocking the all three categories of channels would impact on the spontaneous activity of DA SNc and whether XG would still silence them. Application of 4 mM 4-aminopyridine (4-AP), 5 μ M isradipine and 30 μ M ZD 7288 to respectively block K_v4 , $\text{Ca}_v1.3$ and HCN channels did not change the firing frequency (1.53 ± 0.15 Hz in control vs 2.54 ± 0.64 Hz in 4 mM 4-AP, 5 μ M isradipine and 30 μ M ZD 7288, $n = 6$ for each condition, $p = 0.10$, ANOVA-1, fig. 5e,f) while adding 2 mM XG to the blockers significantly abolished the firing (0.02 ± 0.01 Hz in blockers + 2 mM XG, vs blockers, $n = 6$ for each condition, $p = 0.02$, ANOVA-1, fig. 5e,f). Taken together, these results strengthen the hypothesis that I_{XG} is

driving the spontaneous activity of DA neurons rather than promoting a cooperation between different conductances.

NALCN channels have been suggested to play a role in the pacemaking of DA neurons (Khaliq and Bean, 2010; Philippart and Khaliq, 2018). To test this hypothesis, we first performed extracellular recordings using 100 μM Gd^{3+} , a known inhibitor of NALCN channels (Chua et al., 2020b). This agent did not significantly alter the firing frequency of DA neurons (fig. S3a). As block by Gd^{3+} is not specific to NALCN channels (Boone et al., 2014), we tested the possibility of a direct effect of XG on NALCN. To this end, we heterologously expressed the NALCN complex (NALCN, UNC80, UNC79 and FAM155A) in *Xenopus laevis* oocytes and performed two-electrode voltage-clamp experiments. We only observed minimal inhibition of NALCN currents by XG ($37 \pm 3.9\%$ inhibition at -100 mV for 3 mM XG, $n = 6$), while 10 μM Gd^{3+} potently inhibited NALCN currents ($74 \pm 9.3\%$ inhibition at -100 mV , $n = 6$) (fig. S3b). Therefore, the effect of XG on pacemaking is unlikely to be due to inhibition of NALCN channels.

No clear evidence for I_ω in DA SNc neurons

Our data so far suggests that XG inhibits an as yet unidentified channel essential for pacemaking in DA SNc neurons. As XG blocks voltage-sensor-related ω pores but not the conventional α pores in mutant Na_v channels (Sokolov et al., 2010), one possibility is that DA SNc neurons express a yet to be defined channel protein that provides a physiological XG-sensitive ω pore for pacemaking. ω pores are often created by the replacement of an arginine in the fourth segments (S4) of the voltage sensor domain of mutant voltage-gated channels (Sokolov et al., 2007; Tombola et al., 2005b). Depending on the location

of the missing arginine, it generates either a small inward or outward current at hyperpolarized or depolarized potentials respectively (Held et al., 2016; Jiang et al., 2018). Therefore, we next aimed to obtain evidence for an involvement of I_ω and to identify a molecular candidate potentially coding for such a current in DA SNc neurons.

First, we used voltage-clamp recordings to isolate I_{XG} and examine its shape. Indeed, it had previously been shown that inward I_ω is prominent at negative (-150 to -100 mV) potentials and becomes smaller at less negative (-50 mV) voltages (Moreau et al., 2014; Sokolov et al., 2010). We performed ramp recordings, from -100 mV to 0 mV. In these experiments, we applied 1 μ M TTX, 20 mM TEA, 200 μ M Cd^{2+} and 2.5 mM Cs^+ to block Na_v , most of K^+ , Ca_v and HCN channels, respectively. Subtracting the current obtained in XG from control current yielded the XG-sensitive current. We found no such current at negative potentials ($n = 5$, fig. 6). However, we did observe a I_{XG} , from around -55 mV to less negative potentials (fig. 6c). This voltage range coincides with the ISI (Khaliq and Bean, 2008), suggesting that this current could correspond to the pacemaker current. Thus, the shape of I_{XG} is inconsistent with it being an inward I_ω -like current.

Second, we addressed the possibility that the mRNA coding for an ion channel species could be edited physiologically by the type-2 adenosine deaminase acting on RNA (ADAR-2) enzyme. Such editing could convert an arginine of a S4 segment into a glycine. Indeed, ADAR-2 converts an adenosine into an inosine, which will be read as a guanosine. ADAR-2 is active in DA SNc neurons and has been shown to edit the IQ calmodulin-binding domain of Ca_v 1.3, modulating the inactivation of this channel by Ca^{2+} (Huang et al., 2012). We sequenced

cDNA from SNc neurons and cortical neurons (as a negative control) in the region coding for the S4 segments of Na_v1.1, 1.2 and 1.6 channels as there is ample evidence that pathological Na⁺ channels do generate I_{ω} (Mason et al., 2019; Sokolov et al., 2007, 2005), and also sequenced the IQ calmodulin-binding domain of Ca_v 1.3 as a control. We found a small percentage of editing in some S4s, but this was observed in both SNc and cortex. On the other hand, we did find the heavy editing reported by Huang et al., demonstrating that our method was adequate (Tables 2 and S1). The fact that there was not a region-specific editing and the low percentage of editing indicate that ω pores are unlikely to be present in the tested channels. Taken together, our molecular and functional data are not in favor of the possibility that a typical gating pore current is the target of XG.

XG blocks a current carried by Na⁺ and Cl⁻

Having identified I_{XG} in DA SNc neurons in the relevant subthreshold range, our next aim was to define the permeant ions. To do so, while also attempting to mimic as closely as possible physiological conditions, we turned to a “pacemaker clamp” protocol (Philippart et al., 2016; Puopolo et al., 2007). In this voltage-clamp approach, the waveform of a spontaneously firing DA neuron is imposed as the command potential and the resulting currents are recorded. We then ran the voltage-clamp protocol in control solution and 2 mM XG and subtracted the current traces. These experiments were performed in TTX, TEA and Cd²⁺. The internal control solution was K-gluconate-based (see methods). Consistent with our previous results, we observed a small inward I_{XG} starting a few mV (-50 to -45 mV) below the threshold of the AP (fig.

7a). In control conditions, the amplitude of this current was -23.85 ± 6.14 pA ($n = 6$) just below the onset of the action potential (-30 mV).

Next, we decreased the concentration of external Ca^{2+} ions from 2 to 0.1 mM. This procedure did not significantly change the amplitude of I_{XG} (-20.73 ± 2.62 pA, $n = 6$, $p = 0.83$ versus control, ANOVA-1; fig. 7b-d), suggesting that I_{XG} is not carried by Ca^{2+} . We next substituted external Na^+ by the much larger cation choline. This made I_{XG} strongly outward (30.55 ± 3.01 pA in choline_e Kglu_{in} vs control_e Kglu_{in} at -30 mV, $n = 6$, $p < 0.0001$, ANOVA-1; fig. 7b-d). These results indicate that I_{XG} is partially carried by Na^+ , in addition to another ionic species that produces the outward component.

Given the experimental conditions, K^+ and Cl^- were the most plausible candidates. First, we substituted internal K^+ by Cs^+ in the external choline condition, in order to isolate the outward component. This did not change the outward component of I_{XG} (28.80 ± 2.57 pA in choline_e Csglu_{in}, $n = 5$, vs choline_e Kglu_{in}, $p = 0.83$, ANOVA-1; fig. 7b-d), indicating that K^+ ions probably do not contribute to this current. Next, we increased the internal Cl^- concentration from 25 mM to 145 mM resulting in a predicted shift of its reversal potential from ~ -45 mV to 0 mV. Under these ionic conditions and in the presence of external choline, I_{XG} was recorded as an inward current that was actually larger compared to the control condition (-62.10 ± 6.50 pA in choline_e KCl_{in}, $n = 6$ vs control_e Kglu_{in}, $p < 0.0001$, ANOVA-1; fig. 7b-d). Taken together, these experiments demonstrated that I_{XG} is carried by both Cl^- and Na^+ ions.

Finally, we recorded I_{XG} in external Na^+ and high internal Cl^- . We hypothesized that, given that the two ionic species carry an inward

current in these conditions, the global inward current would be larger than in the previous condition where only Cl^- could carry it. However, surprisingly, we observed a significantly smaller inward current compared to the “ Cl^- only” condition (-34.40 ± 2.02 pA in control_e KCl_{in}, $n = 6$, vs choline_e KCl_{in}, $p < 0.001$, ANOVA-1, fig. 7b-d). On the other hand, the current amplitude was not significantly different from that of the control condition (control_e KCl_{in} vs control_e Kglu_{in}, $p = 0.21$, ANOVA-1; fig. 7b-d). These results strongly suggest that there is a competition between Na^+ and Cl^- ions for the XG-sensitive pore. Therefore, Na^+ and Cl^- ions generate a pacemaker current through one and the same pore.

XG does not interact with the dopamine transporter

Given the results of our ion substitution experiments (fig. 7), we next turned to possible proteins that could sustain a low conductance permeable to both Na^+ and Cl^- , and that would be expressed only in DA neurons. The dopamine transporter (DAT) was an obvious candidate since it is only expressed in DA neurons. While transporting DA, it takes up Na^+ and Cl^- in a 2:1 ratio, generating a small inward current that is able to modulate DA neuron excitability (Carvelli et al., 2004; Ingram et al., 2002; Sonders et al., 1997). In order to test the possible contribution of the DAT in I_{XG} , we took two approaches.

First, we performed extracellular recordings in rat slices and applied 10 μM GBR12909, a specific blocker of DA uptake. The compound produced no significant change in firing frequency when the synaptic blockers (including sulpiride) were applied (2.77 ± 0.31 Hz in control vs 2.21 ± 0.23 Hz in 10 μM GBR12909, $n = 6$ for both conditions, $p = 0.19$, t-test; fig. 8a). Additionally, superfusion of 2 mM XG inhibited the firing of DA neurons to the same extent as in control conditions (from $2.28 \pm$

0.18 Hz in 10 μ M GBR12909 to 0.01 ± 0.01 Hz in 2 mM XG, $n = 6$ for both conditions, $p = 0.03$, Wilcoxon test; fig. 8b). These observations suggest that uptake of DA is not generating the spontaneous firing and that DAT is probably not the target of XG.

Second, and in order to confirm those results, we performed extracellular recordings on wild type and DAT^{-/-} mice. DA neurons from DAT^{-/-} mice were spontaneously active (fig. 8c). Their firing rate was similar to the one of WT neurons (2.38 ± 0.19 Hz for DAT^{+/+}, $n = 6$ vs 2.34 ± 0.26 Hz for DAT^{-/-}, $n = 5$; fig. 8c,d), as was their regularity (coefficient of variation of the ISI [see methods] was 0.042 ± 0.007 for DAT^{+/+}, $n = 6$ vs 0.026 ± 0.005 for DAT^{-/-}, $n = 5$, $p = 0.1$, t-test; fig. 8e). In addition, XG inhibited the firing of DA neurons from the two genotypes to a similar extent ($p = 0.52$ for genetic variant, ANOVA-2; fig. 8d). Taken together, these two types of experiments demonstrate that XG does not interact with the DAT and that the latter is not responsible for the spontaneous activity of DA SNc neurons.

DISCUSSION

We have tested the hypothesis that a compound previously reported to be a gating pore blocker, XG, is able to inhibit the spontaneous slow pacemaking of DA SNc neurons. Our results show that this is indeed the case in both rat and mouse DA neurons and in slices taken from both juvenile and adult animals. The IC₅₀ of the compound is in the high micromolar range and consistent with the pharmacology of I_{ω} (Sokolov et al., 2010). Using two different salts of XG allowed us to establish that it is the xylglyguanidium moiety that is responsible for the observed inhibition. Moreover, we found that XG inhibits pacemaking of DA neurons without hyperpolarizing them and without increasing their

whole-cell conductance (contrary to what a K^+ channel opener would do). Finally, we found that XG displays a reasonable degree of specificity, since fast GABAergic pacemaker neurons of the SNr were unaffected by the drug. Therefore, we may have found the first specific inhibitor of the spontaneous activity of DA neurons. In addition, XG inhibits pacemaking of DA neurons, but does not affect their bursting behavior. To our knowledge, this is the first compound that is able to do so. In addition, the XG-sensitive current has a shape that is fundamentally different from what was previously reported for inward gating pore currents (Sokolov et al., 2010). An effect of XG via inhibition of NALCN channels could also be excluded. Intriguingly, we demonstrated that the XG-sensitive current is carried by both Na^+ and Cl^- . However, although the DAT transports Na^+ and Cl^- during dopamine uptake, we could rule out that this protein sustains slow pacemaking in DA neurons.

Mesencephalic DA neurons constitute a heterogeneous population in terms of electrophysiological and molecular properties. The electrophysiological characteristics of mesencephalic DA neurons, including AP duration and the density of I_A and I_H , vary along a medio-lateral axis going from mesocortical projections (medial) to nigrostriatal projections (lateral) (Amendola et al., 2012; Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008; Neuhoff et al., 2002; Tarfa et al., 2017). In addition, mesoprefrontal VTA DA neurons in mice (Lammel et al., 2008) and amygdala-projecting VTA DA neurons in rats (Margolis et al., 2008) display unique properties, such as lack of somato-dendritic D2 receptors and high-frequency pacemaking. As far as the slow pacemaking activity is concerned, various types of voltage-dependent channels have been suggested or shown to contribute to it, including

several types of Ca_v channels, e.g. L-type channels in some cells and P/Q type channels in other cells (Puopolo et al., 2007), as well as HCN channels (Neuhoff et al., 2002; Seutin et al., 2001). In addition, the ionic nature of the channels operating during the ISI differs between VTA and SNc DA neurons (Khaliq and Bean, 2010; Puopolo et al., 2007), even though the spontaneous activity is remarkably similar in DA neurons of both regions. In this study, we found a complete or near complete inhibition of firing with 2 mM XG in all neurons that we studied. We suggest that the XG-sensitive conductance provides the depolarizing drive in all slow DA pacemakers. Thus, these neurons, regardless of their location within the midbrain, would be endowed with a robust common pacemaking mechanism, on top of which additional conductances would be expressed in a region-specific manner.

XG has only been described so far as a blocker of I_ω (Sokolov et al., 2010). Regarding the effect of I_ω on cell excitability, it has been shown that R222W in $\text{hNa}_v1.4$ channels shifts the resting potential of muscle fibers to more depolarized state, facilitating the generation of APs (Bayless-Edwards et al., 2018). The amplitude of APs is also decreased as the sustained inward current reduces Na_v channel availability. In the brain, R853Q $\text{hNa}_v1.2$ channels have been shown to generate a K^+ -selective inward current linked to epilepsy (Mason et al., 2019; Sokolov et al., 2005). Our data show no evidence for an I_ω , as we did not observe XG-sensitive inward currents at hyperpolarized potential (fig.6c) and the sequencing of Na_v channels S4 did not show any R/X variant (Table 2). However, we cannot exclude that editing occurs in DA neurons in channels that were not investigated in our study, as ω pores were observed previously in shaker K^+ channels (Starace and Bezanilla, 2004b; Tombola et al., 2005b). Note that a combined permeability to

cations and anions has been previously demonstrated for I_{ω} (Khalili-Araghi et al., 2012). Therefore, our results do not formally exclude that a gating pore current underlies pacemaking in DA neurons. Other possibilities exist. For example, it has been shown that the biophysical properties of voltage-gated proton channels are similar to the ones of ω pores (Hong et al., 2013). Since they are blocked by guanidinium derivatives, the structures of which are very similar to the one of XG, it is possible that such channels are the target of XG.

Even though we did not identify the molecular target of XG, we characterized its ion permeability and found that both Na^+ and Cl^- permeate through the same pore. This mechanism may be critical to ensure the temporal stability of pacemaking. Thus, any depolarizing event will increase the ratio of Cl^- versus Na^+ influx and the converse will be true for a hyperpolarizing event. This is what we would expect from a pacemaker current in order to sustain a stable spontaneous activity. In light of our results, we speculate that I_{XG} might correspond to the small inward current in the ISI described by others (Khaliq and Bean, 2008). Future application of XG to other slow pacemaker cells will clarify if the mechanism proposed here is of more general relevance. Additionally, we expect that a full characterization of I_{XG} , when identified, can be used to verify the mechanism we propose in a computational model of DA neuron pacemaking.

In conclusion, we provide evidence for the involvement of an unconventional conductance in the generation of slow pacemaking of DA neurons. This conductance is sensitive to a blocker of I_{ω} , yet lacks some characteristics of gating pores, and is permeable to both Na^+ and

Cl⁻, a feature that, to our knowledge, has not been reported so far for a membrane ion channel.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All our experiments were performed in accordance with the ethical guidelines of the European Union (Directive 2010/63/EU). In addition, all procedures of animal care, handling and sacrifice were approved by the Ethics Committee for Animal Use of Liège University (protocol 1210)

Both juvenile (18-26 days) and adult (6-8 weeks) Wistar rats were used for patch-clamp and extracellular recordings, respectively. DA neurons reach their electrophysiological maturity at P18 (Dufour et al., 2014a; Tepper et al., 1994). Juvenile C57Bl6/N mice were used as well for both types of recordings. A mouse model bearing a complete KO for the DAT was also used in extracellular recordings. This mouse line (Giros et al., 1996) was kindly provided by Pr. Marc Caron (Duke University, Durham, NC, USA) and has been amply characterized.

Molecular biology

Parts of the SNc and cortex were isolated from adult rat brains and kept at -80°C. RNA was extracted using the “Monarch Total RNA Miniprep” kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and then was reverse transcribed by random priming using the PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). PCRs were performed using the Q5 polymerase (New England Biolabs) and specific primer pairs (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). Specificity of amplification was first assessed by gel agarose analysis and then PCR fragments were processed by the GIGA-Genomics

platform (GIGA Institute, Liège University) for high throughput sequencing on an Illumina sequencer.

The sequences of primer pairs that were designed to amplify the fourth alpha-helices of each transmembrane domain of the voltage-gated Na⁺ channels and of the HCN channels, or to amplify the IQ domain of the voltage-gated Ca²⁺ channel, are given in Table S1. Delineations of alpha-helices or of the IQ domain are given under the accession number describing each channel.

Electrophysiology

Animals were anaesthetized with isoflurane and sacrificed by decapitation. The brain was quickly removed and submerged in an oxygenated ice-cold physiological saline solution (ACSF) containing the following (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 (extracellular recordings) or 25 (patch clamp recordings) glucose, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, pH 7.4 (95% O₂ 5% CO₂ and 310 mosm/L). Coronal or horizontal 300 µm-thick slices were obtained using a vibratome (Leica VT-1200, Nussloch, Germany) for patch-clamp and extracellular recordings respectively. Midbrain slices were incubated at 34°C for 30-60 min before being stored at room temperature.

Extracellular recordings were performed as previously described (Drion et al., 2011). DA neurons were identified based on their low firing rate (0.5-5 Hz), long AP duration (> 2 ms) and very regular pacemaking activity (CV_{ISI} < 10 % over a 5 min period). Numerous previous experiments have shown that these neurons are inhibited by dopaminergic agonists via D2 receptors and are therefore considered as DA. Neurons whose firing frequency varied by more than 5 % in control conditions were discarded. To quantify the effect of various

concentrations of XG on the firing frequency, we calculated the mean frequency of the neurons over a 5-min control period. We next measured the mean frequency of the neuron during the last minute of superfusion of a given drug concentration and calculated the ratio of the two values as a percentage. Due to the difficulty of solubilizing XG-carbonate, each neuron was exposed to only one concentration of that salt. Briefly, the ACSF had to be brought to a pH of ~3 for a full dissolution to occur. The pH was then brought back to 7.4 while the ACSF was oxygenated with carbogen and heated. In order to exclude artifacts related to pH manipulations, a control solution that did not contain the drug was prepared in parallel and superfused as the control solution. On the other hand, XG-mesylate solubilized easily at physiological pH. Therefore, each neuron was exposed to various concentrations of this salt. To quantify firing regularity in the DAT KO experiments, we measured the CV_{ISI} defined as followed: $CV_{ISI} = SD_{ISI}/mean_{ISI}$. CV_{ISI} was measured during the control period for 5 min, before superfusion of XG.

For whole-cell patch-clamp recordings, slices were positioned in the recording chamber and superfused with heated ACSF (34°C). Neurons were visualized using infrared-Dodt gradient contrast (IR-DGC) optics on a Zeiss Axio Examiner A1 microscope equipped with a CCD camera (C7500-51; Hamamatsu, Japan). Patch pipettes (3-5 M Ω) were pulled from filamented borosilicate glass tubing (2.0 mm outer diameter, 0.42 mm wall thickness; Reference 1403516, Hilgenberg, Germany) with a horizontal puller (P-97; Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Pipettes were filled with a potassium gluconate-based solution, consisting of (in mM) : 125 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 10 Na₂-phosphocreatine, and 0.5 EGTA, pH 7.2 (~ 300 mosm/L). Patch-

clamp recordings were performed using a Multiclamp 700B amplifier connected to a PC through a Digidata 1550 interface (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) and we acquired data with pClamp 10.5 (Molecular Devices). Data were sampled at 50 kHz and filtered at 10 kHz through a Bessel filter. Some traces in the figures were digitally filtered at 2 kHz (Gaussian characteristics). Analyses were carried out in pClamp 10.5 (clampFit) or Stimfit 0.15 (Christoph Schmidt-Hieber, UCL).

SNC DA neurons were identified based on their electrophysiological properties, including low frequency of firing (0.5-5 Hz), AP duration (width at half-amplitude > 1.35 ms) and the presence of a strong hyperpolarization-activated inward current (I_H) (fig. S1) (Richards et al., 1997; Seutin and Engel, 2010). Burst recordings were performed as previously described (Destreel et al., 2019; Johnson et al., 1992).

Intracellular application of XG mesylate was done by adding it to the intracellular solution. For these experiments, a neuron was first patched in the whole-cell configuration with the control intracellular solution to check its DA nature (see above) and record its basal spontaneous activity. Then, the pipette was withdrawn from the neuron and the neuron was patched with a second pipette containing the drug.

For pacemaker clamp recordings, patch pipettes had a very low resistance (1-3 M Ω) and various solutions were used to determine the ionic nature of I_{XG} . For the external solution, we first used the standard ACSF solution (see above). The low Ca^{2+} solution contained 0.1 mM $CaCl_2$; for the high choline solution, we replaced NaCl equimolarly by choline chloride. For the internal solution, we used a potassium gluconate-based solution (as described above), a cesium gluconated-

based solution, in which K-gluconate and KCl were replaced equimolarly by Cs-gluconate and CsCl, respectively and a potassium chloride-based solution in which K gluconate was replaced by KCl, giving a total intracellular concentration of 145 mM KCl. Neurons whose access resistance increased by >20 % over the duration of the recording were discarded. All the experiments described above, except bursting activity recordings, were performed in the presence of synaptic blockers to isolate DA neurons pharmacologically and to prevent any presynaptic effect. We used 10 μ M CNQX, 10 μ M SR95531, 1 μ M MK801, 1 μ M sulpiride, and 1 μ M CGP55845, to block respectively AMPA/kainate, GABA_A, NMDA, D₂/D₃, and GABA_B receptors.

For cell-attached recordings, 250 μ m-thick coronal midbrain slices were obtained from 10 to 12 week-old male C57Bl6N mice. Animals were sectioned in ice-cold ACSF (containing in mM: 50 sucrose, 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 glucose, 6.2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, and 3 kynurenic acid; Sigma-Aldrich GmbH; bubbled with 95% O₂ / 5% CO₂) after intracardial perfusion with ice-cold ACSF. After sectioning, slices were rested for recovery at least one hour before recording in 95% O₂ / 5% CO₂ ACSF at 37°C. Recordings were carried out in ACSF (containing in mM: 22.5 sucrose, 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 glucose, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂; bubbled with 95% O₂ / 5% CO₂ in the presence of CNQX (20 μ M), DL-AP-5 (4 μ M) and Gabazine (SR95531, 4 μ M) to inhibit fast excitatory and inhibitory transmission. DA SNc neurons were initially visually identified and recorded in cell-attached mode and subsequently in whole-cell using a pipette solution containing in mM: 135 K-gluconate, 10 HEPES, 5 KCl, 5 MgCl₂, 0.075 CaCl₂, 0.1 EGTA, 5 ATP, 1 GTP, 0.1% neurobiotin.

Human NALCN, UNC79, UNC80, FAM155A complementary DNAs (cDNAs), codon optimized for *Homo sapiens* in pCDNA3.1(+) vectors, were used as previously described (Chua et al., 2020b). The NALCN, UNC-79, UNC-80, and FAM155A RNAs were mixed in a ratio of 1:1:1:1 and injected into *Xenopus laevis* oocytes. Injected cells were incubated in ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, and 5 mM HEPES; pH 7.4) supplemented with 0.5 mM theophylline, 2.5 mM Na pyruvate, 50 µg/mL gentamycin and 50 µg/mL tetracycline at 18 °C, 140 rpm. Two-electrode voltage-clamp measurements were performed on oocytes five days after injection using a Warner OC-725C Oocyte Clamp amplifier (Warner Instrument Corp, USA). Oocytes were continuously perfused in a Ca²⁺/Mg²⁺-free ND96 recording solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM BaCl₂, and 5 mM HEPES; pH 7.4) at room temperature. Data were acquired using the pCLAMP 10 software (Molecular Devices) and a Digidata 1550 digitizer (Molecular devices), sampled at 10 kHz. Electrical powerline interference was filtered with a Hum Bug 50/60 Hz Noise Eliminator (Quest Scientific). Recording microelectrodes with resistances around 0.2 to 1.0 MΩ were pulled from borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus) using a P-1000 Flaming/Brown Micropipette Puller System (Sutter Instrument) and were filled with 3 M KCl. Stock solutions (1 M) of gadolinium (Gd³⁺, Sigma Aldrich) and XG-mesylate were prepared in Ca²⁺/Mg²⁺-free ND96 and diluted to desired concentrations.

Immunofluorescence & confocal microscopy

Cell-attached recordings were converted to the whole-cell configuration to fill neurons with 0,1% neurobiotin for post-hoc verification of anatomical and neurochemical identity. The slices were then fixed in

4% PFA-PBS solution (containing 15% Picric acid, 0.1 M buffer, pH = 7.4) over night at 4°C, rinsed in PBS (containing in mM: 137 NaCl; 2.7 KCl; 10 NaH₂PO₄; 10 Na₂HPO₄; pH = 7.4) and incubated in blocking solution (0.2 M PBS with 10% horse serum, 0.5% Triton X-100, 0.2% BSA) for 1 hour. Slices were incubated with polyclonal anti-tyrosine hydroxylase rabbit antibodies (1:1000, Calbiochem, Merck) and were incubated overnight in carrier solution (containing in PBS: 0.2% PSA, 0.5% Triton, 1% horse serum) at room temperature. Slices were again rinsed in PBS and incubated in carrier solution with AlexaFluor-568 secondary anti-rabbit polyclonal goat antibody (1:1000; Thermo Fisher Scientific) and Streptavidin AlexaFluor-488 (1:750; Thermo Fisher Scientific) over night, then rinsed and mounted in Vectashield. Confocal microscopy was used to identify recorded neurons as dopaminergic and locate the position of neurobiotin-positive recorded neurons inside the SNc.

Synthesis of XG-mesylate

N,N'-diBOC-2,4-Xylyl Guanidine (BOC-XG) preparation

2,4-dimethylaniline (about 50 mmol) reacted overnight with N,N'-diBOC-1H-pyrazole-1-carboxamidine (1.2 equivalents) as well as N-ethyldiisopropylamine (2 equivalents) in 100ml of methanol. The reaction medium was then evaporated under reduced pressure. The resulting crude oil was dissolved in 100 ml ethyl acetate and washed three times by 30 ml HCl (1 N) and by 50 ml brine. The organic solution was evaporated under reduced pressure, and the residue was then crystallized in methanol.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) 1.47 (s, 10H), 1.54 (s, 10H), 2.26 (s,

3H), 2.28 (s, 3H), 7.00 (m, 2H), 7.75 (d, $J = 8.14$ Hz, 1H), 10.04 (s, 1H),
11.67 (s, 1H)

^{13}C NMR : (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm) (CH_3) 18.13, 20.82, 28.10, 28.22,
(CH) 124.64, 127.06, 130.95, (C) 79.38, 83.42, 130.35, 132.49, 134.96,
153.44, 154.03, 163.78

Elemental Analysis : $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ (363.46 g/mol) Calculated (%) C
62.79, H 8.04, N 11.56, Found (%) C 62.58, H 8.28, N 11.63

2,4-Xylyl Guanidine mesylate (XG mesylate) preparation

The isolated BOC-XG was dissolved in 50 ml dichloromethane and methanesulfonic acid (2.5 ml per gram) was added. After 4 to 5 hours at room temperature, the medium was evaporated under reduced pressure, the oily residue was subsequently washed five times by about 20 ml diisopropylether and dried under reduced pressure. The XG mesylate was then crystallized in hot ethanol by addition of cold diethylether.

^1H NMR : (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm) 2.27 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.85 (s, 3H),
7.07 (m, 3H), 7.58 (broad, 3H), 9.28 (s, 1H)

^{13}C NMR : (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm) (CH_3) 17.18, 20.88, 39.22, (CH)
127.46, 128.00, 132.36, (C) 129.80, 135.96, 138.88, 156.93

Melting point : 105.5–107.5°C (several samples presented another polymorphic form, confirmed by Raman and FTIR spectra, and a melting point at 137.5–139.0°C)

Elemental Analysis : $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (259.33 g/mol) Calculated (%) C
46.32, H 6.61, N 16.20, S 12.36 Found (%) C 46.33, H 6.70, N 16.25,
S 12.02

Mass Spectrometry : $C_9H_{13}N_3$ (163.11 g/mol) Adduct $+H^+$, extraction mass 164.11822 Da, found at 164.11817 Da

Statistics

Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical analyzes were performed using Prism 8. Normality tests were performed prior to analyzing the data by either a parametric or non-parametric test. In this study, we used Student t-test/Wilcoxon test, ANOVA-1/Friedman followed by a post hoc Holm-Sidak's/Dunn's test and ANOVA-2 when required. Significance level is given as $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$ and is displayed in the figures.

Chemicals

Apamin, CNQX and SR9551 were purchased from Alomone labs (Jerusalem, Israel) ; isradipine, ZD 7228, MK801, NMDA, sulpiride and CGP55845 from Tocris Bioscience (Bristol, UK) ; TTX and Cs-gluconate from Hello Bio (Bristol, UK) ; 4-AP, nifedipine, XG carbonate and salts used to prepare the external and internal solutions were obtained from Sigma-Aldrich (Overijse, Belgium).

DATA AVAILABILITY

Access to data files and statistical analysis will be provided upon full publication.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest with respect to the research, authorship, or publication of this article.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the members from the laboratory of Neurophysiology for the helpful discussions and their suggestions. We are also grateful to the GIGA-Genomics platform for the sequencing of mRNA. This work was supported by grants from the “Fonds National de la Recherche Scientifique” (FNRS, Belgium) (J.0148.19 to VS VS), from the “Fondation Léon Frédéricq” (Belgium) (FHULF-D.MESGCAN.01-05 and “prix de l’espoir” to KJ). JFL is a senior Research Associate of the FNRS. DE and BL are Research Associates of the FNRS. The salaries of KJ, RV and SR are paid by the “Fonds de la Recherche dans l’Industrie et l’Agriculture” (FRIA).

REFERENCES

- Amendola J, Woodhouse A, Martin-Eauclaire MF, Goillard JM. 2012. Ca²⁺/cAMP-sensitive covariation of I_A and I_H voltage dependences tunes rebound firing in dopaminergic neurons. *J Neurosci* **32**:2166–2181. doi:10.1523/JNEUROSCI.5297-11.2012
- Bayless-Edwards L, Winston V, Lehmann-Horn F, Arinze P, Groome JR, Jurkat-Rott K. 2018. NaV1.4 DI-S4 periodic paralysis mutation R222W enhances inactivation and promotes leak current to attenuate action potentials and depolarize muscle fibers. *Sci Rep* **8**:1–13. doi:10.1038/s41598-018-28594-5
- Blythe SN, Atherton JF, Bevan MD. 2007. Synaptic Activation of Dendritic AMPA and NMDA Receptors Generates Transient High-Frequency Firing in Substantia Nigra Dopamine Neurons In Vitro. *J Neurophysiol* **97**:2837–2850. doi:10.1152/jn.01157.2006
- Boone AN, Senatore A, Chemin J, Monteil A, Spafford JD. 2014. Gd³⁺

- and calcium sensitive, sodium leak currents are features of weak membrane-glass seals in patch clamp recordings. *PLoS One* **9**. doi:10.1371/journal.pone.0098808
- Carvelli L, McDonald PW, Blakely RD, Defelice LJ. 2004. Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. *Proc Natl Acad Sci* **101**:16046–16051. doi:10.1073/pnas.0403299101
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. 2007. ‘Rejuvenation’ protects neurons in mouse models of Parkinson’s disease. *Nature* **447**:1081–1086. doi:10.1038/nature05865
- Chua HC, Wulf M, Weidling C, Rasmussen LP, Pless SA. 2020. The NALCN channel complex is voltage sensitive and directly modulated by extracellular calcium. *Sci Adv* **6**. doi:10.1126/sciadv.aaz3154
- de Vrind V, Scuvée-Moreau J, Drion G, Hmaied C, Philippart F, Engel D, Seutin V. 2016. Interactions between calcium channels and SK channels in midbrain dopamine neurons and their impact on pacemaker regularity: contrasting roles of N- and I-type channels. *Eur J Pharmacol* **788**:274–279. doi:10.1016/j.ejphar.2016.06.046
- Destreel G, Seutin V, Engel D. 2019. Subsaturating of the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site allows the regulation of bursting activity in juvenile rat nigral dopamine neurons. *Eur J Neurosci* **50**:3454–3471. doi:10.1111/ejn.14491
- Drion G, Massotte L, Sepulchre R, Seutin V. 2011. How modeling can reconcile apparently discrepant experimental results: The case of pacemaking in dopaminergic neurons. *PLoS Comput Biol*

7:e1002050. doi:10.1371/journal.pcbi.1002050

Dufour MA, Woodhouse A, Amendola J, Goillard JM. 2014. Non-linear developmental trajectory of electrical phenotype in rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. *Elife* **3**. doi:10.7554/eLife.04059

Evans RC, Zhu M, Khaliq ZM. 2017. Dopamine inhibition differentially controls excitability of substantia nigra dopamine neuron subpopulations through T-type calcium channels. *J Neurosci* **37**:3704–3720. doi:10.1523/JNEUROSCI.0117-17.2017

Farassat N, Costa Kauê Machado, Stovanovic S, Albert S, Kovacheva L, Shin J, Egger R, Somayaji M, Duvarci S, Schneider G, Roeper J. 2019. In vivo functional diversity of midbrain dopamine neurons within identified axonal projections. *Elife* **8**. doi:10.7554/elife.48408

Galtieri DJ, Estep CM, Wokosin DL, Traynelis S, Surmeier DJ. 2017. Pedunculopontine glutamatergic neurons control spike patterning in substantia nigra dopaminergic neurons. *Elife* **6**. doi:10.7554/eLife.30352

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**:606–612. doi:10.1038/379606a0

Gonon F, Bloch B. 1998. Kinetics and geometry of the excitatory dopaminergic transmission in the rat striatum in vivo. *Adv Pharmacol* **42**:140–4. doi:10.1016/s1054-3589(08)60715-2

Grace AA, Bunney BS. 1984. The control of firing pattern in nigral

- dopamine neurons: Burst firing. *J Neurosci* **4**:2877–2890. doi:10.1523/jneurosci.04-11-02877.1984
- Guzman JN, Sánchez-Padilla J, Chan CS, Surmeier DJ. 2009. Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* **29**:11011–11019. doi:10.1523/JNEUROSCI.2519-09.2009
- Held K, Voets T, Vriens J. 2016. Signature and Pathophysiology of Non-canonical Pores in Voltage-Dependent Cation Channels Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Springer, Cham. pp. 67–99. doi:10.1007/112_2015_5003
- Hong L, Pathak MM, Kim IH, Ta D, Tombola F. 2013. Voltage-Sensing Domain of Voltage-Gated Proton Channel Hv1 Shares Mechanism of Block with Pore Domains. *Neuron* **77**:274–287. doi:10.1016/j.neuron.2012.11.013
- Huang H, Tan BZ, Shen Y, Tao J, Jiang F, Sung YY, Ng CK, Raida M, Köhr G, Higuchi M, Fatemi-Shariatpanahi H, Harden B, Yue DT, Soong TW. 2012. RNA Editing of the IQ Domain in Cav1.3 Channels Modulates Their Ca²⁺-Dependent Inactivation. *Neuron* **73**:304–316. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.022
- Ingram SL, Prasad BM, Amara SG. 2002. Dopamine transporter-mediated conductances increase excitability of midbrain dopamine neurons. *Nat Neurosci* **5**:971–978. doi:10.1038/nn920
- Jiang D, Gamal el-Din tamer M, Ing C, Lu P, Pomès R, Zheng N, Catterall WA. 2018. Structural basis for gating pore current in periodic paralysis. *Nature* **557**:590–594. doi:10.1038/s41586-018-0120-4

- Johnson SW, Seutin V, North RA. 1992. Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: Role of electrogenic sodium pump. *Science* **258**:665–667. doi:10.1126/science.1329209
- Kang Y, Kitai ST. 1993. Calcium spike underlying rhythmic firing in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Neurosci Res* **18**:195–207. doi:10.1016/0168-0102(93)90055-U
- Khalik ZM, Bean BP. 2010. Pacemaking in Dopaminergic Ventral Tegmental Area Neurons: Depolarizing Drive from Background and Voltage-Dependent Sodium Conductances. *J Neurosci* **30**:7401–7413. doi:10.1523/jneurosci.0143-10.2010
- Khalik ZM, Bean BP. 2008. Dynamic, Nonlinear Feedback Regulation of Slow Pacemaking by A-Type Potassium Current in Ventral Tegmental Area Neurons. *J Neurosci* **28**:10905–10917. doi:10.1523/jneurosci.2237-08.2008
- Klassen TL, Spencer AN, Gallin WJ. 2008. A naturally occurring omega current in a Kv3 family potassium channel from a platyhelminth. *BMC Neurosci* **9**:1–12. doi:10.1186/1471-2202-9-52
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J. 2008. Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron* **57**:760–773. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.022
- Liss B, Roeper J. 2008. Individual dopamine midbrain neurons: Functional diversity and flexibility in health and disease. *Brain Res Rev* **58**:314–321. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.10.004

- Margolis EB, Mitchell JM, Ishikawa J, Hjelmstad GO, Fields HL. 2008. Midbrain dopamine neurons: Projection target determines action potential duration and dopamine D2 receptor inhibition. *J Neurosci* **28**:8908–8913. doi:10.1523/JNEUROSCI.1526-08.2008
- Mason ER, Wu F, Patel RR, Xiao Y, Cannon SC, Cummins TR. 2019. Resurgent and gating pore currents induced by De Novo SCN2A epilepsy mutations. *eNeuro* **6**:1–17. doi:10.1523/ENEURO.0141-19.2019
- Mercuri NB, Bond A, Calabresi P, Stratta F, Stefani A, Bernardi G. 1994. Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. *Br J Pharmacol* **113**:831–838. doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb17068.x
- Moreau A, Gosselin-Badaroudine P, Chahine M. 2014. Molecular biology and biophysical properties of ion channel gating pores. *Q Rev Biophys* **47**:364–388. doi:10.1017/S0033583514000109
- Nedergaard S, Flatman JA, Engberg I. 1993. Nifedipine- and omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J Physiol* **466**:727–747. doi:10.1113/jphysiol.1993.sp019742
- Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J. 2002. I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* **22**:1290–302.
- Nieoullon A. 2002. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* **67**:53–83. doi:10.1016/S0301-0082(02)00011-4

- O'Leary T, Williams AH, Franci A, Marder E. 2014. Cell Types, Network Homeostasis, and Pathological Compensation from a Biologically Plausible Ion Channel Expression Model. *Neuron* **82**:809–821. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.002
- Philippart F, Destreel G, Merino-Sepúlveda P, Henny XP, Engel D, Seutin V. 2016. Differential Somatic Ca²⁺ Channel Profile in Midbrain Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* **36**:7234–7245. doi:10.1523/JNEUROSCI.0459-16.2016
- Philippart F, Khaliq ZM. 2018. Gi/o protein-coupled receptors in dopamine neurons inhibit the sodium leak channel NALCN. *Elife* **7**. doi:10.7554/eLife.40984
- Poulin J-F, Zou J, Drouin-Ouellet J, Kim K-YA, Cicchetti F, Awatramani RB. 2014. Defining Midbrain Dopaminergic Neuron Diversity by Single-Cell Gene Expression Profiling. *Cell Rep* **9**:930–943. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.008
- Puopolo M, Raviola E, Bean BP. 2007. Roles of Subthreshold Calcium Current and Sodium Current in Spontaneous Firing of Mouse Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* **27**:645–656. doi:10.1523/JNEUROSCI.4341-06.2007
- Richards CD, Shiroyama T, Kitai ST. 1997. Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* **80**:545–557. doi:10.1016/S0306-4522(97)00093-6
- Schultz W. 2007. Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu Rev Neurosci* **30**:259–288. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722

- Seutin V, Engel D. 2010. Differences in Na⁺ conductance density and Na⁺ channel functional properties between dopamine and GABA neurons of the rat substantia nigra. *J Neurophysiol* **103**:3099–114. doi:10.1152/jn.00513.2009
- Seutin V, Massotte L, Renette MF, Dresse A. 2001. Evidence for a modulatory role of Ih on the firing of a subgroup of midbrain dopamine neurons. *Neuroreport* **12**:255–258. doi:10.1097/00001756-200102120-00015
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. 2010. Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of NaV1.4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations. *J Gen Physiol* **136**:225–236. doi:10.1085/jgp.201010414
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. 2007. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* **446**:76–78. doi:10.1038/nature05598
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. 2005. Ion Permeation through a Voltage- Sensitive Gating Pore in Brain Sodium Channels Having Voltage Sensor Mutations. *Neuron* **47**:183–189. doi:10.1016/J.NEURON.2005.06.012
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG. 1997. Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* **17**:960–74. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-03-00960.1997
- Starace DM, Bezanilla F. 2004. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* **427**:548–553. doi:10.1038/nature02270

- Sun Y, Zhang XH, Selvaraj S, Sukumaran P, Lei S, Birnbaumer L, Brij X, Singh B. 2017. Inhibition of L-Type Ca² Channels by TRPC1-STIM1 Complex Is Essential for the Protection of Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* **37**:3364–3377. doi:10.1523/JNEUROSCI.3010-16.2017
- Tarfa RA, Evans RC, Khaliq ZM. 2017. Enhanced sensitivity to hyperpolarizing inhibition in mesoaccumbal relative to nigrostriatal dopamine neuron subpopulations. *J Neurosci* **37**:3311–3330. doi:10.1523/JNEUROSCI.2969-16.2017
- Tepper JM, Damlama M, Trent F. 1994. Postnatal changes in the distribution and morphology of rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neuroscience* **60**:469–477. doi:10.1016/0306-4522(94)90258-5
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. 2005. Voltage-Sensing Arginines in a Potassium Channel Permeate and Occlude Cation-Selective Pores. *Neuron* **45**:379–388. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.047
- Wise RA. 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* **5**:483–494. doi:10.1038/nrn1406

Figure 1

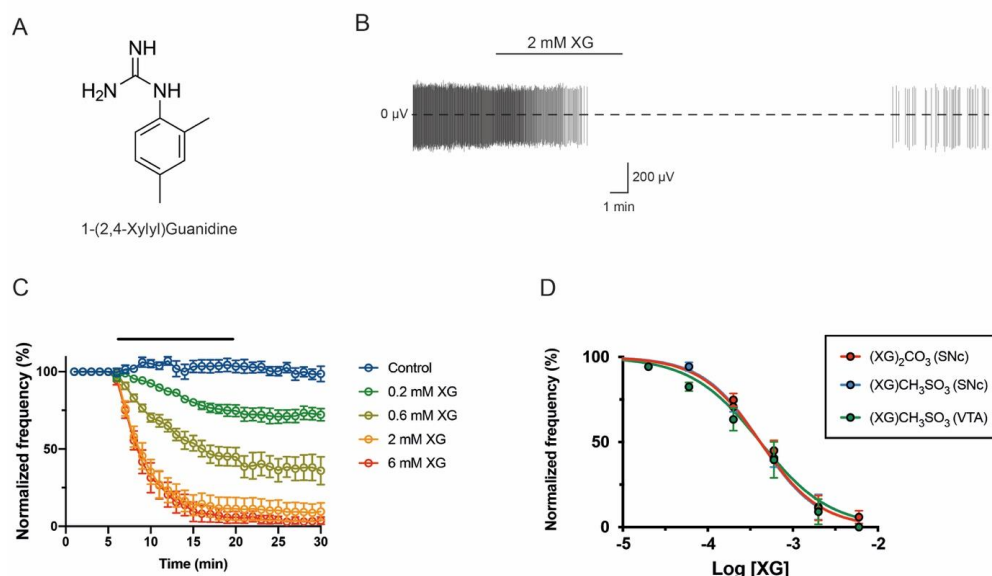


Figure 1. XG inhibits the spontaneous activity of rat DA SNc neurons. **A.** Molecular structure of XG. **B.** Representative extracellular recording of the spontaneous firing of a single DA SNc neuron. The continuous line corresponds to the time of application of XG on the slice. Note that the effect of XG is partially reversible after a long wash-out. **C.** Summary data of the evolution of the firing frequency according to the time of exposition and the concentration. Each point corresponds to the mean normalized frequency $\pm$ SEM (in %, $n=6$). The black line represents the time during which the tested solution was superfused. **D.** Concentration-response curve of the inhibitory effect of XG. All values were normalized to the control firing frequency. Note that the potency is very similar for the two different salts and in the two regions tested ($n=6$ for each condition).

Figure 2

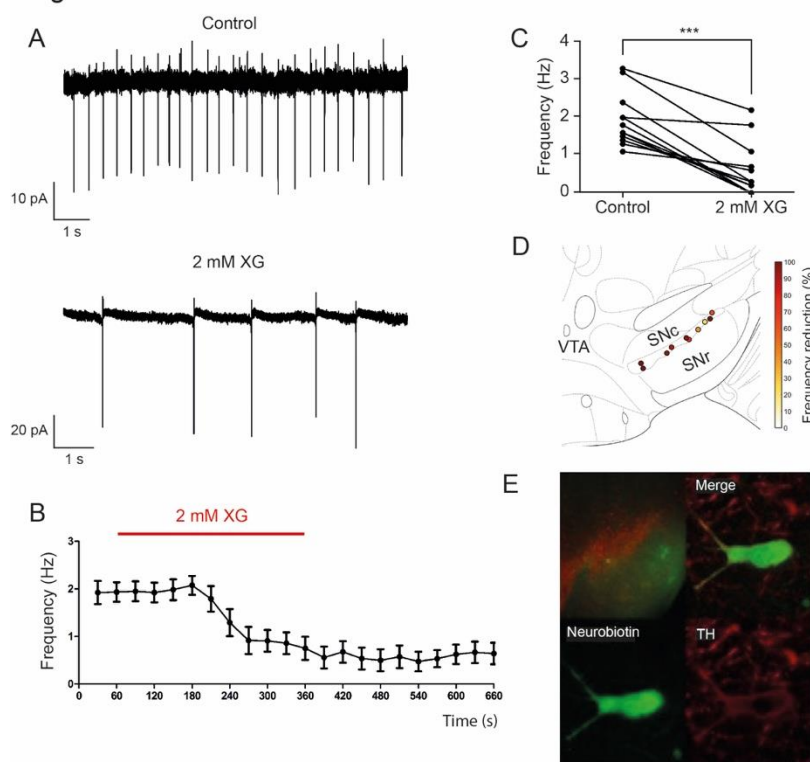


Figure 2. XG inhibits the spontaneous activity of mouse DA SNc neurons. **A.** Representative cell-attached recording showing the inhibitory effect of 2 mM XG. **B.** Group data showing the average inhibition produced by XG over time (n=10). **C.** Summary data of individual experiments showing a reduction of the firing frequency (n=10). **D.** Heat map of the inhibitory effect of XG according to the localization of the recorded neurons within SNc. **E.** Post-hoc identification of a recorded neurons filled with neurobiotin as being DA based on TH immunofluorescence.

Figure 3

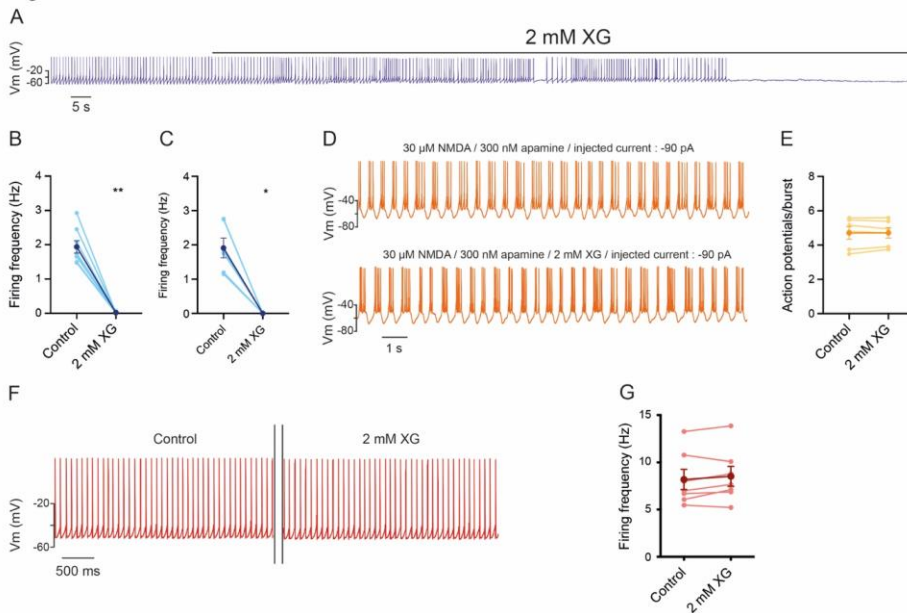


Figure 3. XG selectively inhibits the pacemaking activity of DA SNc neurons. **A.** Representative recording of a single DA SNc neuron. The black line corresponds to the application of 2 mM XG on the slice. **B.** Summary data of the effect of the extracellular application of 2 mM XG on the firing frequency. The light blue data correspond to individual neurons ($n = 8$) and the dark blue correspond to the mean $\pm$ SEM of all recorded neurons. XG abolished the firing (Wilcoxon test, $**p < 0.01$). **C.** Summary data of the effect of intracellular application of 2 mM XG on the firing frequency. The light blue data corresponds to individual neurons ($n = 6$) and the dark blue corresponds to the mean $\pm$ SEM of all recorded neurons. XG abolished the firing (Wilcoxon, $*p < 0.05$). **D.** Representative recording of bursting activity in a single DA SNc neuron. **E.** Summary data of the effect of application of 2 mM XG on the number of APs per burst. The light orange data corresponds to individual neurons ($n = 6$) and the darker orange corresponds to the mean with SEM of all recorded neurons. XG did not significantly affect the number of APs/burst (t-test, $p = 0.9$). **F.** Representative recording of a fast firing GABAergic SNr neuron. **G.** Summary data of the effect of the extracellular application of 2 mM XG on the firing frequency of SNr neurons. The light red data corresponds to individual neurons ($n = 7$) and the dark red corresponds to the mean $\pm$ SEM of all recorded neurons. XG did not affect the firing frequency in these neurons (t-test, $p = 0.21$).

Figure 4

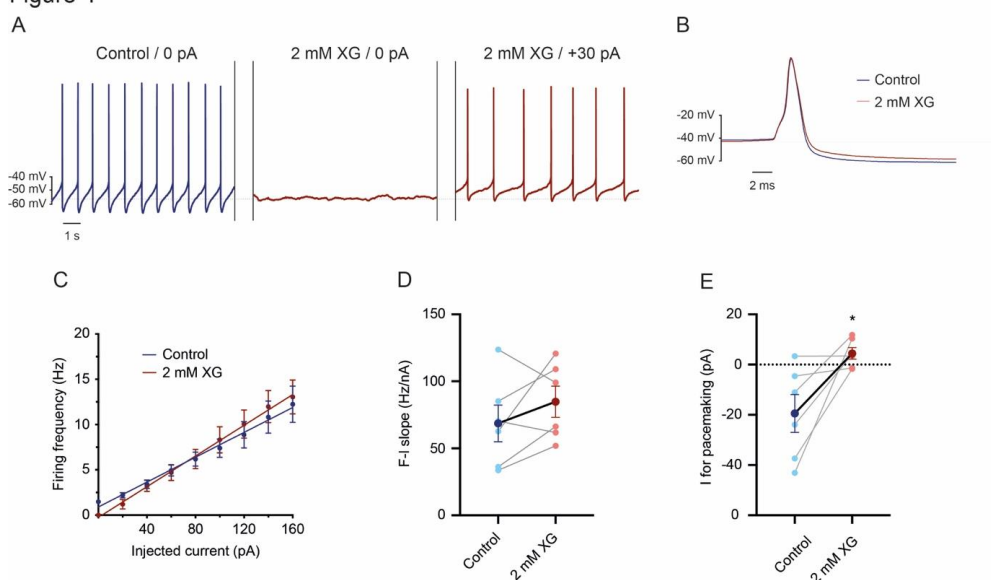


Figure 4. XG does not modulate voltage-gated channels involved in the action potential. **A.** Representative recording showing that the firing of a DA neuron can be recovered in XG upon injection of a small positive current. **B.** Superposition of one action potential in control conditions and in XG with a +30 pA current. **C.** Mean frequency-current relationship of 6 DA neurons in control conditions (blue) and in the presence of 2 mM XG (red). The frequency was measured using 20 pA steps from 0 pA to 160 pA for 2 s. Only the three first APs were used to calculate the firing frequency. **D.** Summary data of the effect of 2 mM XG on the gain (F-I slope). The individual slopes of the linear regression from single cells are represented in light color ($n = 6$ for both conditions) while the means $\pm$ SEM are represented in darker color. **E.** Summary data of the effect of 2 mM XG on the minimal current needed to generate spontaneous activity. The individual minimal current for pacemaking to occur are represented in light color ($n = 6$ for both conditions) while the means $\pm$ SEM are represented in darker color. The current was determined based on the current value at which the linear regression intercepts with the current axis. The amplitude of the current blocked by 2 mM XG is 23.9 ± 8.2 pA.

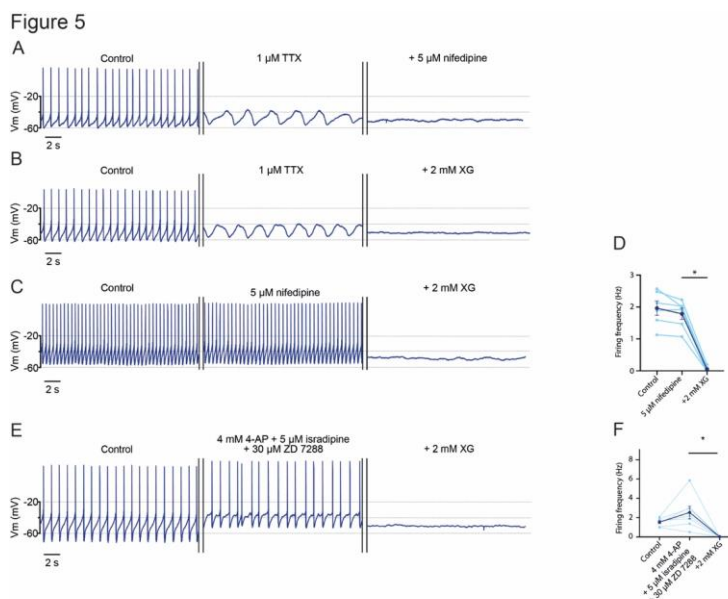


Figure 5. *XG-sensitive conductance are essential to various oscillatory phenomena in DA SNc neurons.* **A.** Applying 1 μM TTX on a spontaneous active DA neuron reveals oscillations of membrane potential (middle panel) that are nifedipine-sensitive (right panel), suggesting that they are mediated by L-type Ca_v channels. **B.** Representative recording of the effect of 2 mM XG on membrane potential oscillations. Application of 2 mM XG was able to silence them. **C.** Representative recording of the effect of 2 mM XG while Ca^{2+} oscillations are blocked by 5 μM nifedipine. In these conditions, the spontaneous firing is maintained (middle panel) and is still sensitive to 2 mM XG (right panel). **D.** Summary data of the effect of 2 mM XG on the firing frequency while Ca^{2+} oscillations are blocked. The light blue data corresponds to individual neurons ($n = 6$) and the dark blue corresponds to the mean $\pm$ SEM of all recorded neurons. **E.** Representative recording of the effect of 2 mM XG on the pacemaking activity while K_v4 , $\text{Ca}_v1.3$ and HCN channels are blocked. When the spontaneous activity remains in the presence of 4 mM 4-AP, 5 μM isradipine and 30 μM ZD 7288 (middle panel), application of 2 mM XG is still able to silence the neurons (right panel). **F.** Summary data of the effect of 2 mM XG on the firing frequency while K_v4 , $\text{Ca}_v1.3$ and HCN channels are blocked. The light blue data corresponds to individual neurons ($n = 6$) and the dark blue corresponds to the mean $\pm$ SEM of all recorded neurons.

Figure 6

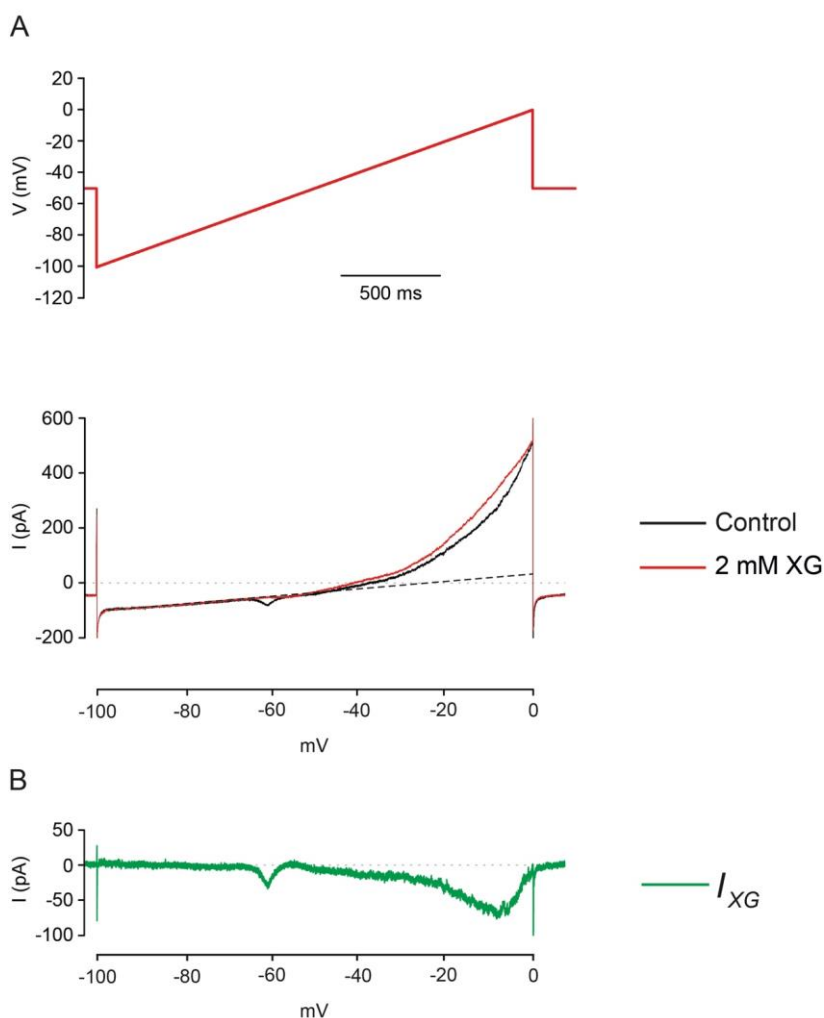


Figure 6. Isolation of I_{XG} . **A.** Mean currents before (black) and after (red) application of 2 mM XG evoked in voltage-clamp by a ramp at a speed similar to the ISI (25 mV/s). In both conditions, 1 μ M TTX, 20 mM TEA, 200 μ M Cd^{2+} and 2.5 Cs^+ were applied to block respectively Na_v , most K^+ , Ca_v and HCN channels. Dotted line corresponds to the extrapolated linear regression between -98 mV and -70 mV. Its slope corresponds to an input resistance of 935 M Ω . The inward current at -60 mV corresponds to a T-type calcium current in control which is absent in the presence of XG, probably due to rundown. **B.** Subtraction of the control trace by the trace in the presence of XG in **A** reveals I_{XG} plotted as a function of voltage. Note that the the current starts to operate at -50 mV.

Figure 7

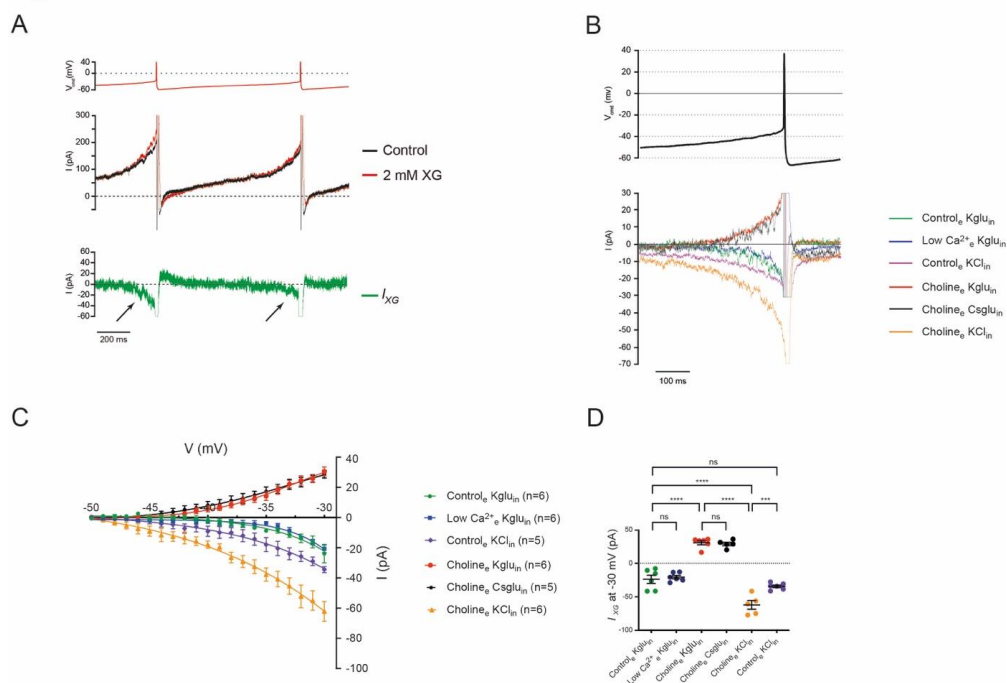


Figure 7. I_{XG} is activated during the ISI and is carried by Na^+ and Cl^- . **A.** Representative currents evoked by a pacemaking waveform in $1 \mu\text{M}$ TTX, 20 mM TEA and $200 \mu\text{M}$ Cd^{2+} before (black) and after (red) application of 2 mM XG (middle panel). Each trace represents an average of five sweeps obtained from one neuron. The subtraction of the control trace by the XG trace reveals I_{XG} . Note that the latter starts below the AP threshold (arrows). **B.** Representative I_{XG} evoked by a pacemaking waveform under different ion substitutions reveals that it is permeable to Na^+ and Cl^- . **C.** Summary results of I_{XG} as a function of voltage and various ionic conditions. **D.** Summary results of I_{XG} at -30 mV .

Figure 8

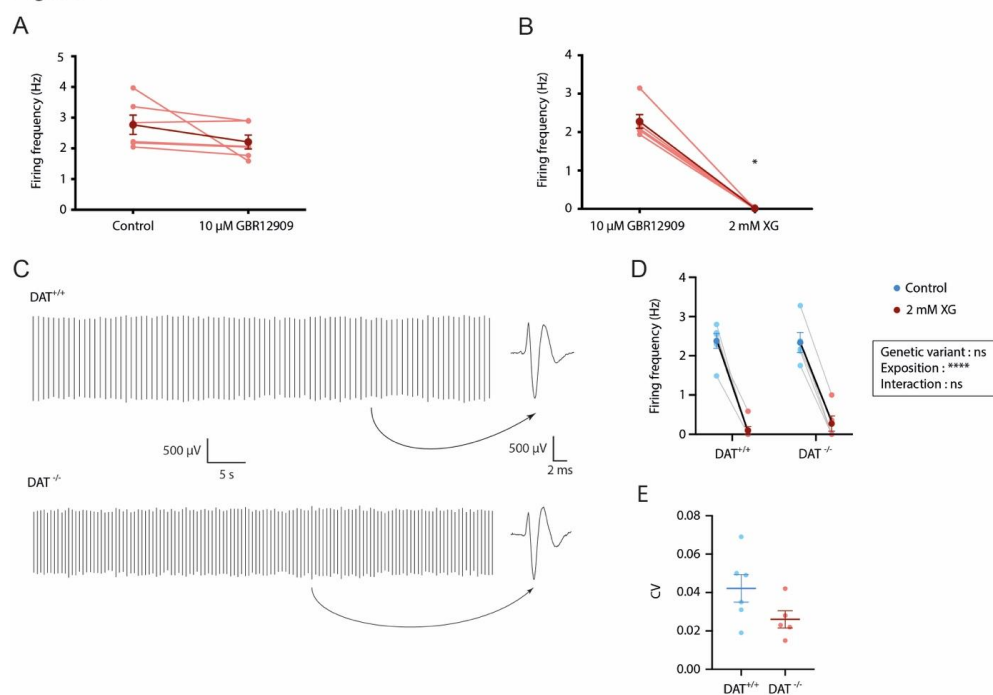


Figure 8. XG does not interact with the dopamine transporter. **A.** Summary data of the effect of 10 μM GBR12909 on the firing frequency of DA SNc neurons. The individual frequencies are represented in light red ($n = 6$ for both conditions) while the means $\pm$ SEM are represented in dark red. **B.** Summary data of the effect of 2 mM XG on the firing frequency of DA SNc neurons during application of 10 μM GBR12909. The individual frequencies are represented in light red ($n = 6$ for both conditions) while the means $\pm$ SEM are represented in dark red. **C.** Representative extracellular recordings of DA neurons from $DAT^{+/+}$ (upper panel) and $DAT^{-/-}$ (down panel) mice. Insets show the waveform of an action potential. **D.** Summary data of the effect of 2 mM XG on the firing frequency of DA SNc neurons from $DAT^{+/+}$ and $DAT^{-/-}$ mice. The individual frequencies are represented in light color ($n = 6$ for both $DAT^{+/+}$ and $DAT^{-/-}$ mice) while the means $\pm$ SEM are represented in dark color. **E.** Summary data of the coefficient of variation (CV) of the firing frequency of DA SNc neurons from $DAT^{+/+}$ and $DAT^{-/-}$ mice. The individual frequencies are represented in light color ($n = 6$ for both $DAT^{+/+}$ and $DAT^{-/-}$ mice) while the means $\pm$ SEM are represented in dark color.

	0 pA		10 pA		20 pA		30 pA		40 pA		50 pA	
	Control	XG	Control	XG	Control	XG	Control	XG	Control	XG	Control	XG
Half-width (ms)	2.00 ± 0.25	-	1.98 ± 0.15	1.98 ± 0.19	1.96 ± 0.15	2.17 ± 0.17	2.13 ± 0.2	2.23 ± 0.17	2.24 ± 0.16	2.33 ± 0.13	2.14 ± 0.21	2.32 ± 0.16
	n = 5		n = 5	n = 4	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
Max slope (ms)	83.44 ± 10.47	-	79.04 ± 8.33	92.12 ± 11.38	74.40 ± 7.49	78.67 ± 11.87	69.79 ± 7.04	74.34 ± 10.88	60.00 ± 7.38	68.97 ± 9.82	65.31 ± 5.16	58.17 ± 7.33
	n = 5		n = 5	n = 4	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
Threshold (mV)	-35.13 ± 1.90	-	-33.86 ± 2.34	-35.64 ± 2.71	-34.05 ± 1.98	-33.32 ± 2.54	-32.65 ± 2.13	-32.46 ± 2.91	-31.57 ± 2.43	-32.53 ± 1.83	-32.62 ± 1.81	-39.68 ± 2.01
	n = 5		n = 5	n = 4	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5

Table 1. Summary results of the half-width, maximal slope and threshold of action potentials before and after application of XG. XG does not affect any of the three parameters.

		0		1		2		3		4		5	
		SNc	Cortex	SNc	Cortex	SNc	Cortex	SNc	Cortex	SNc	Cortex	SNc	Cortex
SCN1A	S4.1	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	-
	S4.2	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)
	S4.3	K (100 %)	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-
	S4.4	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)
SCN2A	S4.1	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	-
	S4.2	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)
	S4.3	K (100 %)	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (98 %) / G (2 %)	R (99 %) / G (1 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-
	S4.4	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)
SCN8A	S4.1	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	-	-
	S4.2	-	-	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)	K (100 %)
	S4.3	K (100 %)	K (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	-	-
	S4.4	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	R (100 %)	K (100 %)	K (100 %)

Table 2. Summary results from the sequencing of the various S4 segments of Nav1.1, 1.2 and 1.6 channels in SNc and cortex (n = 2). There is no evidence in favour of robust editing in these parts of the channels.

EXTENDED DATA

Figure S1

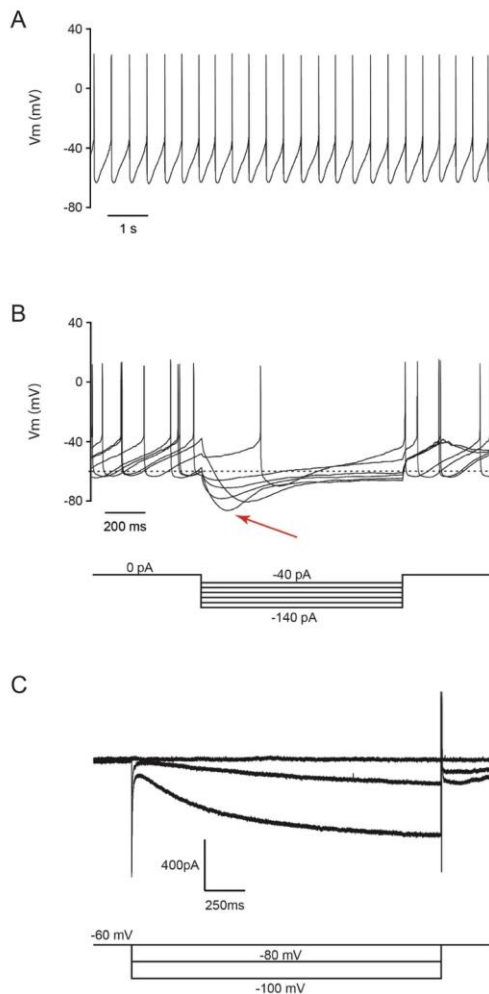


Figure S1. *Electrophysiological identification of DA SNc neurons.* **A.** Representative recording of spontaneous activity from a DA SNc neuron. **B.** Example of voltage traces evoked by a 1 s current injection from -140 pA to -40 pA in 20 pA steps. The red arrow points to the membrane rectification, or sag due to the activation of HCN channels. **C.** Representative recording of I_h evoked by a 2 s step from -60 mV to -100 mV (represented below). The slow pacemaker activity and the presence of I_h support the DA identity of the recorded neurons (Destreel et al., 2019).

Figure S2

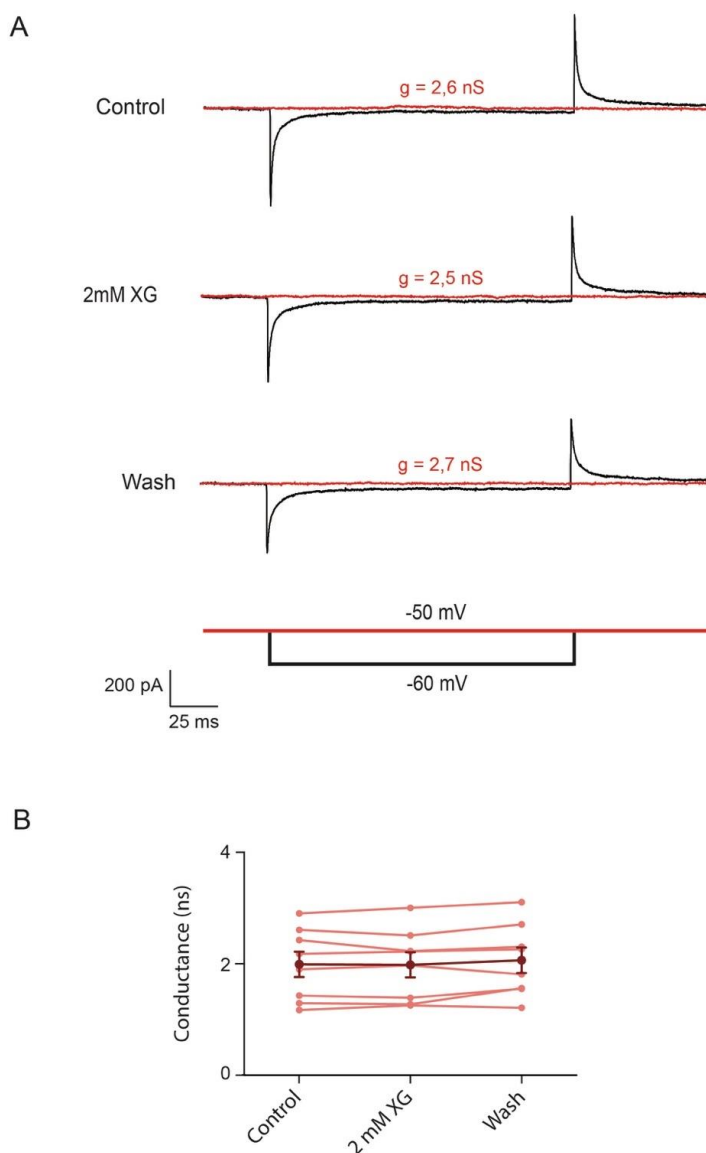
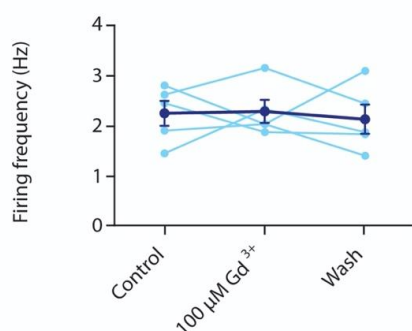


Figure S2. XG does not increase the whole-cell conductance of DA SNc neurons. **A.** Representative recording of currents evoked by a 100 ms step from -50 mV (red) to -60 mV (black). The conductance calculated from $g = dI/dV$. **B.** Summary data of the effect of 2 mM XG on the conductance. The light red data corresponds to individual neurons ($n = 8$) and the dark red corresponds to the mean $\pm$ SEM of all recorded neurons.

Figure S3

A



B

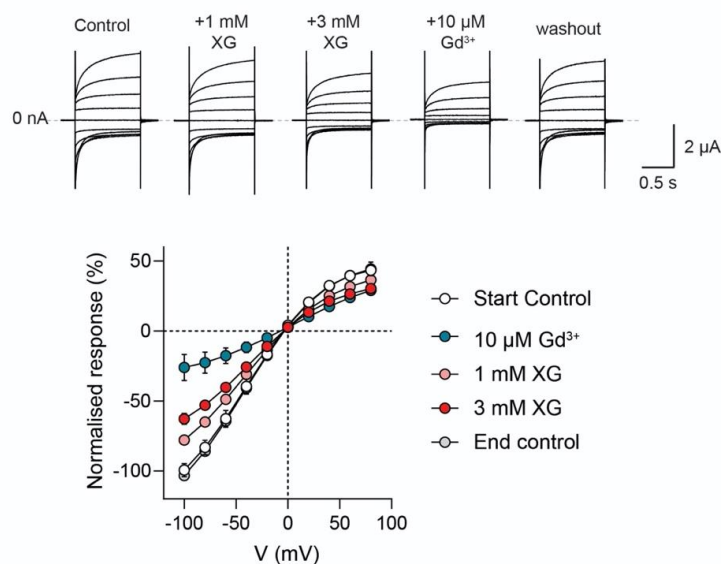


Figure S3. Inhibition of pacemaking of SNc neurons does not involve NALCN channels. **A.** Summary data of the effect 100 μM Gd^{3+} on the firing frequency of DA SNc neurons. The light blue data corresponds to individual neurons ($n = 5$) and the dark blue corresponds to the mean $\pm$ SEM of all recorded neurons. **B.** Representative traces of NALCN currents during application of XG and Gd^{3+} (top). Summary plot of the effects of XG and Gd^{3+} on NALCN-mediated instantaneous inward currents expressed in *Xenopus laevis* oocytes (bottom).

Cav 1.3 IQ domain editing			
		SNc	Cortex
<i>CACNA1D</i> IQ	I / M	68 % / 32 %	81 % / 19 %
	Q / R	97 % / 3 %	99 % / 1 %
	Y / C	78 % / 22 %	87 % / 13 %

Table S1. Summary results from the sequencing of the IQ domain of Cav1.3 channels in SNc and cortex (n = 2). These data are consistent with what has already been showed by others (Huang et al., 2012).

Channel	Accession number		Oligonucleotide sequence (5' → 3')
SCN1A	NP_110502.1	SCN1A-S4.1for	CTGTCATTACATTTCGCATATGTGACG
		SCN1A-S4.1rev	GGGCCCCCACGATG
		SCN1A-S4.2for	GCCTGGTAGAACTTGGCCTT
		SCN1A-S4.2rev	CTTAATGAGCATGTTCAGTGTGGG
		SCN1A-S4.3for	AGCAAATGCCTTGGGTTACTCT
		SCN1A-S4.3rev	GGAATTGCTCCTAACAGGGCA
		SCN1A-S4.4for	CGATTATGTGACAAGCATTTTGTACG GT
		SCN1A-S4.4rev	GGGTTTGCTGTTGAGGATGG
SCN2A	NP_036779.1	SCN2A-S4.1for	AACAGAATTTGTAAACCTAGGCAATG TT
		SCN2A-S4.1rev	AGGGCCCCCACGATA
		SCN2A-S4.2for	TTTAATGGAACTCGGCTTGGCG
		SCN2A-S4.2rev	CTTAATGAGCATGTTCAGTGTGGG
		SCN2A-S4.3for	GCAAATGCCTTGGGCTATTCG
		SCN2A-S4.3rev	AGCGTTTACAACAACCCTCATTC
		SCN2A-S4.4for	AGGAGATGACCAACATCCTGTACT
		SCN2A-S4.4rev	TCAGGAGGTCCGCTATTTAGTATAG G
SCN8A	NP_062139.2	SCN8A-S4.1for	GTGTCATCATGATGGCATATGTGACA

		SCN8A-S4.1rev	GGGCGCCCACGATT
		SCN8A-S4.2for	CAGTTTAATGGAGCTGAGTCTCG
		SCN8A-S4.2rev	GATCTTGATCAGCATGTTCAGGG
		SCN8A-S4.3for	TAATGCCCTGGGCTACTCG
		SCN8A-S4.3rev	GATGGCGCCCACCAAG
		SCN8A-S4.4for	TCCTGGCTGATATCATTGAGAAGTAC
		SCN8A-S4.4rev	GCAGGGTGCGGATCC
CACNA1D	NP_058994.1	CACNA1D-IQfor	CCAAGTTGTCCCTCCAGCT
		CACNA1D-IQrev	GTGGTGTTCTTCGCAGGGTAT

Table S2. Sequences of primer pairs used to amplify the S4 transmembrane domains of various Na_v channels or the IQ domain of Ca_v1.3 channels.

Functional analysis of the F337C mutation in the *CLCN1* gene associated with dominant *myotonia congenita* reveals an alteration of their macroscopic conductance and voltage dependence.

Accepted in *Molecular Genetics & Genomic Medicine* on 15th December 2020

Doi : 10.1002/mgg3.1588

Bernard Lakaye and Vincent Seutin contributed equally to this work.

Funding information

This research was funded by grant R.FNRS.4129-9-F (KJ and VS) from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgium) and grant R.CFRA.2958 (BL) from the University of Liège (Belgium).

Kevin Jehasse¹ | Kathleen Jacquerie² | Alice de Froidmont¹ | Camille Lemoine¹ | Thierry Grisar³ | Katrien Stouffs⁴ | Bernard Lakaye³ | Vincent Seutin^{1,*}

¹ Laboratory of Neurophysiology, GIGA Institute, Liege, Belgium

² Department of Electrical Engineering and Computer Science, Liège University, Liège, Belgium

³ Laboratory of Molecular Regulation of Neurogenesis, GIGA Institute, Liège, Belgium

⁴ Neurogenetics Research Group, Vrije Universiteit Brussel (VUB) Universitair Ziekenhuis Brussel (UZ Brussel), Reproduction and Genetics, Brussels, Belgium

Correspondence

Vincent Seutin, Laboratory of Neurophysiology, GIGA Institute, Liege, Belgium.

Email: v.seutin@uliege.be

Funding Information

Université de Liège R.CFRA.2958

Fonds De La Recherche Scientifique - FNRS R.FNRS.4129-9-F

ABSTRACT

Background

Myotonia congenita (MC) is a common channelopathy affecting skeletal muscle and which is due to pathogenic variants within the *CLCN1* gene. Various alterations in the function of the channel have been reported and we here illustrate a novel one.

Methods

A patient presenting the symptoms of *myotonia congenita* was shown to bear a new heterozygous missense variant in exon 9 of the *CLCN1* gene (c.1010 T > G, p.(Phe337Cys)). Confocal imaging and patch clamp recordings of transiently transfected HEK293 cells were used to functionally analyze the effect of this variant on channel properties.

Results

Confocal imaging showed that the F337C mutant incorporated as well as the WT channel into the plasma membrane. However, in patch clamp, we observed a smaller conductance for F337C at -80 mV. We also found a marked reduction of the fast gating component in the mutant channels, as well as an overall reduced voltage dependence.

Conclusion

To our knowledge, this is the first report of a mixed alteration in the biophysical properties of hClC-1 consisting of a reduced conductance at resting potential and an almost abolished voltage dependence.

Keywords: channel gating, *CLCN1*, microscopy, myotonia, patch clamp

INTRODUCTION

Myotonia congenita (MC) is the most common genetic channelopathy affecting the skeletal muscle (Horga et al., 2013). Clinically, it is characterized by muscle stiffness following a voluntary movement, sometimes associated with a «warm up» phenomenon, which reflects the fact that this symptom improves with repetitive activity. By far the most frequent cause of MC is a pathogenic variant within the *CLCN1* gene (OMIM accession number 118425), which encodes the ClC-1 channel protein (Jentsch & Pusch, 2018). This channel is the main contributor (~80%) of the resting conductance of skeletal muscle. It normally acts to dampen myocyte excitability after an action potential.

MC can be inherited in a dominant (Thomsen's disease) or recessive form (Becker's disease). Symptomatology is usually more severe in the latter because no rescue or attenuation is possible by normal channel proteins. Indeed, it is usually considered that severe myotonia is associated with a large reduction in the ClC-1 conductance (by at least 80%), whereas smaller reductions are supposed to yield a mild phenotype (Colding-Jørgensen, 2005).

ClC-1 channels are homodimeric channels that present a double-barreled structure (Ludewig et al., 1996; Middleton et al., 1996; Mindell et al., 2001; Park & Mackinnon, 2018). Extensive biophysical analyses have demonstrated the voltage dependence of these channels, which have two protopore gates (involving the individual subunits) and one common gate. This common gate affects both pores simultaneously across an intersubunit interface and is relatively slow, whereas the so-called protopore gates are faster (Accardi & Pusch, 2000). Both gates need to be open to conduct Cl⁻ ions. The opening of both gates is voltage-dependent, with an increase in open probability at potentials more depolarized than the muscle resting potential (−80 mV). However, the open probability is not 0 at −80 mV, but about 0.6 and 0.2, for the slow and fast gate, respectively (Accardi & Pusch, 2000). This explains why the channel both contributes to the resting conductance and is able to increase its opening probability during any depolarizing event (the

time constant of the fast gate is fast enough for the ClC-1 channel to contribute to the repolarization of the action potential).

More than 130 pathogenic variants in *CLCN1* have been identified, including small deletions, insertions, frame-shifts, stop codons, missense, and splice-site mutations (Imbrici et al., 2015). Generally, those variants in MC are responsible for a defect in the channel trafficking to the membrane (Vindas-Smith et al., 2016) or a change in the biophysical properties by shifting the activation curve, reducing the unitary conductance, or changing the ion selectivity (Desaphy et al., 2013; Fahlke et al., 1997; Tsujino et al., 2011; Ulzi et al., 2012; Weinberger et al., 2012). It seems that, in dominant MC, a «hot spot» of mutations is observed in or close to exon 8, encompassing the regions between loops H and J of the channel (Fialho et al., 2007). In several cases, a major depolarizing shift of the curve describing the opening of the gate versus the voltage has been described, for example, in I290 M (Pusch et al., 1995) or F306L (Fialho et al., 2007). Such a shift will strongly reduce the ability of the channel to help repolarize the myocyte membrane at the end of the action potential. In other cases (e.g., A313 V), an almost complete abolition of the ClC-1 current was found (Fialho et al., 2007).

Here, we report on a 23-year-old Belgian patient suffering from dominant MC associated with a heterozygous variant (F337C) in the same region. Since her infancy, she complained of transient muscle stiffness. She experiences difficulties mainly when initiating movements (such as when starting a walk, moving eyes, talking, or masticating). Her symptoms improve after repeated contractions, which is suggestive of a «warm up» phenomenon. They also tend to worsen with cold, for example, when washing her face with cold water. There is no complaint of muscle weakness after a rest.

The patient has non-consanguineous parents. Her mother, as well as one grand uncle on the maternal side exhibit a similar semiology, suggesting a Thomsen type form of the disease. Her growth has been normal and she reports no other disease.

Medical examination shows general muscle hypertrophy, normal muscle strength, and attenuated myotatic reflexes. An electroneuromyogram has clearly confirmed the presence of myotonic burst discharges. Typical myotonic contractions can be clearly elicited by percussion of muscles of either the tongue or the thenar eminence. Serum creatine kinase was recently found to be at 220 IU/L (normal range: 15–130 IU/L). DNA isolated from blood lymphocytes was amplified by PCR and the 23 exons of *CLCN1*, as well as part of the flanking introns, were sequenced. The analysis showed that the patient is a heterozygous carrier of a c.1010 T > G, p.(Phe337Cys) substitution in exon 9 (Figure 1A). This alteration has already been observed (Derevenciuc et al., 2016), but no functional analysis has been performed. In silico analysis programs (SIFT°, PolyPhen2°, Mutation Taster°, and Align GVGD°) indicated that the substitution of this highly conserved amino acid is probably pathogenic, especially in view of a change from a hydrophobic amino acid to a cysteine. We therefore decided to investigate the trafficking and functionality of this mutant channel.

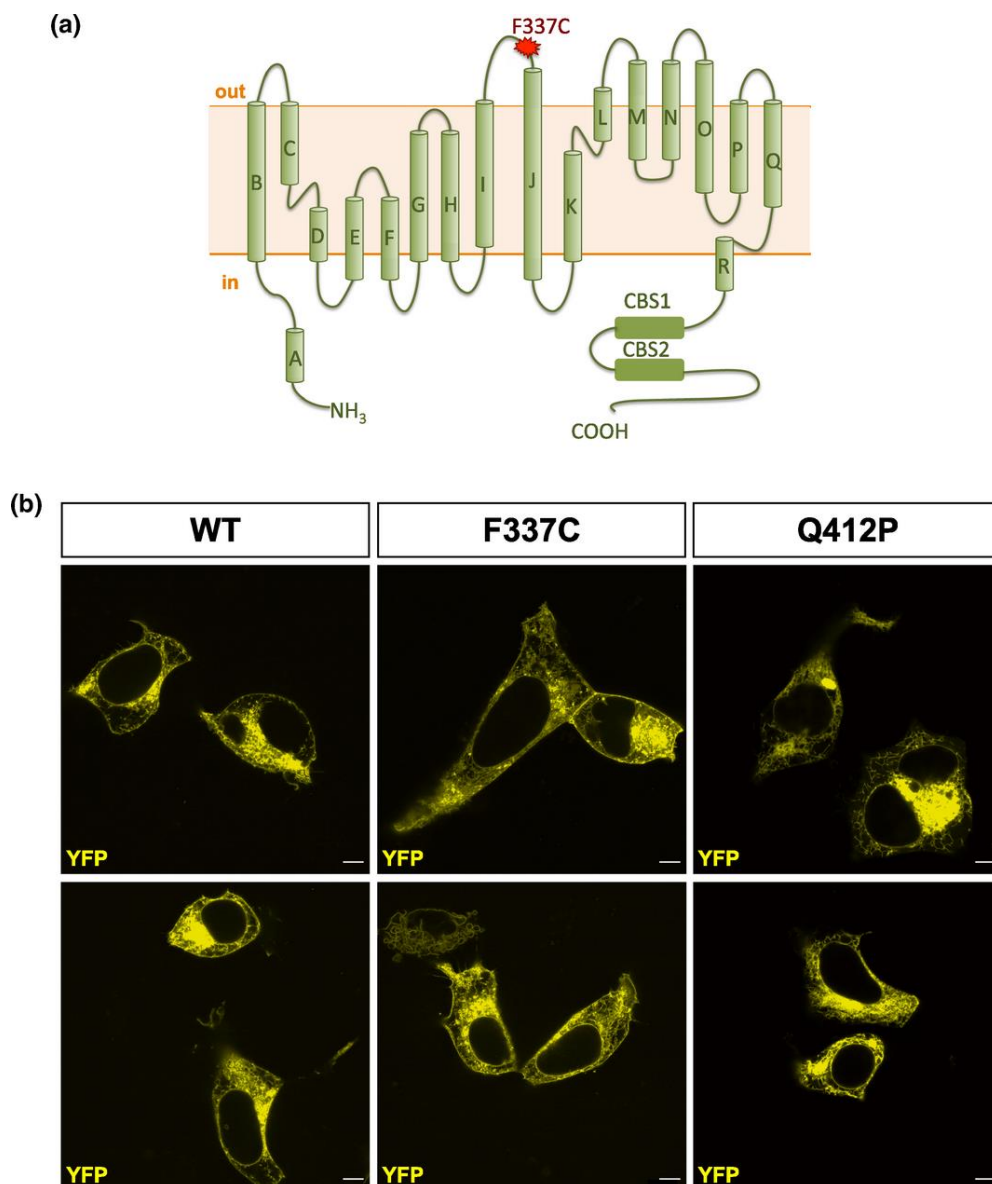


FIGURE 1. Subcellular localization of WT, F337C, and Q412P hCIC-1 channels. A, Schematic structure of a hCIC-1 channel subunit. The F337C mutation is located in the extracellular loop between I and J transmembrane domains. CBS is the cystathionine β -synthase domain where ATP binds CIC-1 and inhibits the common gating. B, Visualization of YFP-tagged WT, F337C, or Q412P hCIC-1 channels in transfected HEK293 cells (scale bar: 5 μ m). Note the clear membrane localization of WT and F337C channels, but not Q412P channels.

We first looked whether the F337C mutation affects the expression of the channel at the cell membrane. To appreciate the membrane location of F337C, we compared it with the one of WT and Q412P hCIC-1 channels. The latter were chosen as a control because they had previously been demonstrated to have a very small surface expression (Vindas-Smith et al., 2016). We used the plasmid pRcCMV-YFP-hCIC-1 for transfection (Ronstedt et al., 2015). At first glance, it is clear that F337C hCIC-1 channels are expressed at the plasma membrane (and more so than Q412P), although more experiments are needed to quantify the density of F337C at the cell membrane.

To evaluate the functional properties of the WT and F337C hCIC-1 channels, we used a classical voltage clamp protocol (see Figure 2A). In this protocol, the cells were held at 0 mV to strongly activate the fast and slow gates in symmetric chloride conditions (see SI), meaning that concentrations of intracellular and extracellular chloride were equivalent. Deactivation of the channels at negative potentials could be visualized as a biexponential decrease of the current. The instantaneous and the steady-state currents were measured respectively at the beginning (~1 ms) and the end (~350 ms) of each pulse of voltage to obtain the IV curves shown in Figure . In the WT, we observed a clear deactivation of the channel in the range of -200 mV to -100 mV. In F337C, the instantaneous current was much smaller in the same voltage range. When plotting the IV curves of the instantaneous currents from the WT and F337C, we observed in the mutant a loss of the typical inward rectification (Figure 2C) of these channels. As far as the steady-state currents were concerned, F337C generated a linear current, smaller in amplitude than the one generated by the WT. In addition, the current of the variant was extremely linear, resembling a leak channel. In order to verify that this «leak-type» current was indeed generated by the mutant, we performed the same recordings on non-transfected cells (data not shown). No detectable current was measured. The conductance of the mutant around -80 mV was significantly smaller than the one of the WT channel, 11.88 ± 0.4 nS ($n = 17$) versus 21.99 ± 0.4 ($n = 26$) (ANOVA-1 followed by Tukey's test, $p < 0.001$), but only by about 50%. The voltage dependence of the channel activation was obtained from the apparent P_o as a function of

the membrane voltage (Figure 2D). F337C decreased the voltage dependence of the apparent P_o without affecting its $V_{1/2}$ (see Table S1 for the quantification).

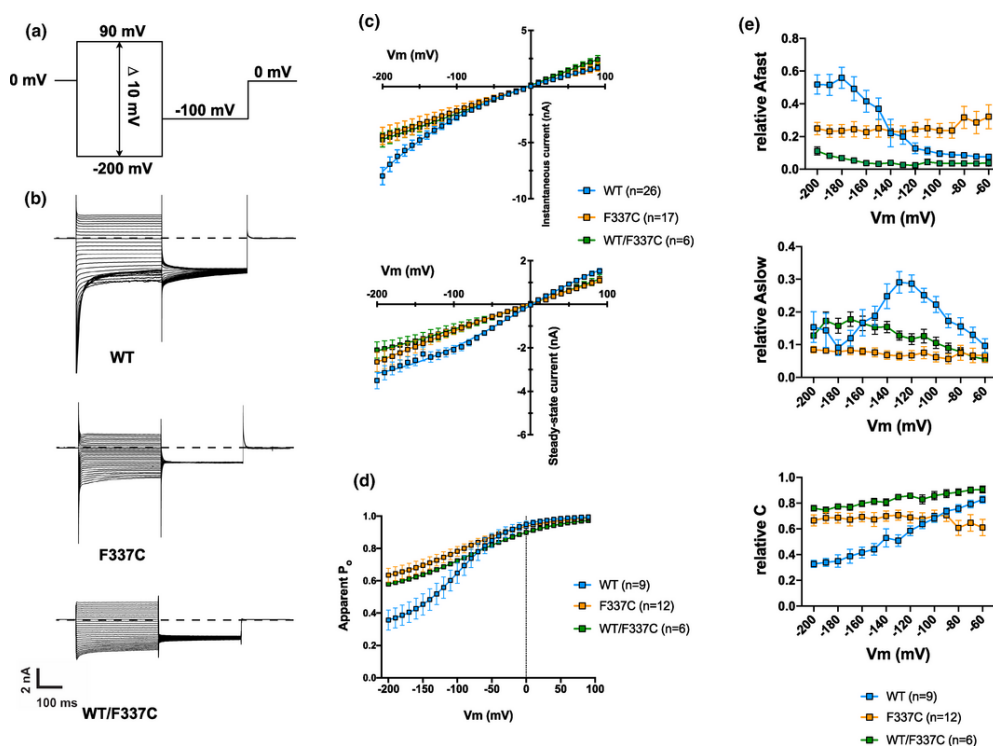


FIGURE 2. Functional analysis of WT and F337C hCIC-1 channels. A, Protocol used in all our experiments. B, Examples of current traces of WT, F337C, and WT/F337C hCIC-1. C, Current-voltage curves of the instantaneous (top) and steady-state (bottom) hCIC-1 currents. Instantaneous WT currents display an inward rectification, whereas F337C and WT/F337C currents are linear. Steady-state F337C and WT/F337C currents are more linear than WT currents. D, Apparent P_o -voltage curve. The apparent P_o was obtained by measuring the tail current at -100 mV (post-pulse) as a function of the voltage reached during the previous step (see supporting information). The P_o of F337C and WT/F337C is much less voltage-dependent than that of WT. E, Kinetics of deactivating currents for WT, F337C, and WT/F337C hCIC-1 channels. See Eq.1 in the Methods for the fit. Each point is represented as a mean $\pm$ SEM of 9, 12, and 6 fits for WT, F337C, and WT/F337C currents, respectively. Note the reduction of the contribution of A_{fast} and A_{slow} caused by the F337C mutation.

To quantify the loss of current deactivation in F337C, we fitted the curves using a double-exponential function as described in the methods, including the residual current, between -200 and -60 mV. There was a significant difference between WT and F337C in the fast and slow amplitude components, as well as in the residual component (Figure 2E). Thus, the progressive increase in the weight of the fast deactivation (A fast) at more negative potentials was lost in the mutant, as was the weight of the slow deactivation in the -100 to -150 mV range. In addition, the relative weight of the constant current was high at all voltages in the mutant, whereas it decreased toward the more negative potentials in WT channels, because of the preponderance of current deactivation. The apparent lack of deactivating current in F337C is consistent with a higher apparent P_o at hyperpolarized potentials.

Given the dominant nature of the F337C variant, we transfected HEK293 cells with equal amounts of WT and F337C cDNA to generate heteromeric channels, similarly to what happens in heterozygous patients. We performed the same current analysis as described above. WT/F337C heteromeric channels ($n = 6$) displayed properties similar to those of F337C homomeric channels, with a reduced conductance at -80 mV (11.35 ± 2.5 nS for WT/F337C vs. WT, ANOVA-1 followed by Tukey's test, $p < 0.05$) (Figure 2, Table S1). Therefore, we can assume that the total ClC-1 current is mainly generated by F337C rather than WT in heterozygous patients carrying this variant.

These data show that the F337C mutation significantly decreases the macroscopic conductance at the resting membrane potential (about 50% of the conductance of WT hClC-1 channels), and strongly reduces the channel's voltage dependence. Functionally, this means that the channel is able to sustain the resting membrane potential of this patient's myocytes. However, it will not be able to massively activate during action potentials and to powerfully bring the membrane potential back to its resting value. Therefore, the likelihood of repetitive action potentials underlying myotonic burst discharges will be much increased. The clear myotonic phenotype of the patient bearing this mutation suggests that the repolarizing effect of hClC-1 during an action potential may be more important than its resting activity to protect

normal fibers from abnormal repetitive discharges, a question that is somewhat controversial (Pedersen et al., 2016).

To our knowledge, the phenotype of the F337C mutant is rather original in the sense that most pathogenic variants either almost completely abolish channel conductance (which was not the case here) or shift voltage dependence to more depolarized potentials (whereas $V_{1/2}$ was not changed, but voltage dependence was reduced in our case) (Imbrici et al., 2015). The question arises whether this phenotype may be due to the cysteine residue of the mutant channel. It is possible that this replacement will yield an abnormal intramonomer or intermonomer disulfide bridge which would be responsible for this specific channel phenotype and also affect the WT subunits in heteromeric configurations, just like the neighboring variant T335N affects WT subunit functionality by shifting the open probability to more depolarized potentials (Imbrici et al., 2016). Further experiments using reducing conditions, alternative substitutions of the phenylalanine, membrane expression, and measuring the P_o of the fast and slow gating separately will help answer this question.

In summary, we have characterized a mutant of the hClC-1 channel protein, F337C, to correlate it with the myotonic symptomatology of this patient. When expressed in HEK293 cells, this mutant seems to insert normally in the membrane, but has major functional alterations consisting of a reduced steady-state conductance and a loss of voltage dependence.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by grant R.FNRS.4129-9-F (KJ and VS) from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgium) and grant R.CFRA.2958 (BL) from the University of Liège (Belgium). We thank C. Gillissen, P. Shah, and B. Coumans for their technical help and the patient for her willingness to contribute to the knowledge of *CLCN1*.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest with respect to the research, authorship, or publication of this article.

AUTHORS' CONTRIBUTION

KJe, AdF, and CL performed the transfections and the electrophysiological experiments. KJa implemented the curve fitting. KS genotyped the patient. TG was in charge of the patient's treatment and had the idea of the project. BL did the site-directed mutagenesis. VS supervised the whole project. KJe and VS wrote the manuscript.

REFERENCES

Accardi, A., & Pusch, M. (2000). Fast and slow gating relaxations in the muscle chloride channel CLC-1. *Journal of General Physiology*, 116, 433–444. <https://doi.org/10.1085/jgp.116.3.433>

Colding-Jørgensen, E. (2005). Phenotypic variability in myotonia congenita. *Muscle and Nerve*, 32, 19–34. <https://doi.org/10.1002/mus.20295>

Derevenciuc, A.-I., Abicht, A., Hamza, S., Roth, C., & Ferbert, A. (2016). Thomsen myotonia-A 4-generation family with a new mutation and a mild phenotype. *Muscle and Nerve*, 53, 653–654. <https://doi.org/10.1002/mus.24971>

Desaphy, J.-F., Gramegna, G., Altamura, C., Dinardo, M. M., Imbrici, P., George, A. L., Modoni, A., Lomonaco, M., Conte Camerino, D., & Camerino, D. C. (2013). Functional characterization of CLC-1 mutations from patients affected by recessive myotonia congenita presenting with different clinical phenotypes. *Experimental Neurology*, 248, 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.018>

Fahlke, C., Beck, C. L., & George, A. L. (1997). A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 94, 2729–2734. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2729>

Fialho, D., Schorge, S., Pucovska, U., Davies, N. P., Labrum, R., Haworth, A., Stanley, E., Sud, R., Wakeling, W., Davis, M. B., Kullmann, D. M., & Hanna, M. G. (2007). Chloride channel myotonia: exon 8 hot-spot for dominant-negative interactions. *Brain*, 130, 3265–3274. <https://doi.org/10.1093/brain/awm248>

Horga, A., Rayan, D. L. R., Matthews, E., Sud, R., Fialho, D., Durran, S. C. M., Burge, J. A., Portaro, S., Davis, M. B., Haworth, A., & Hanna, M. G. (2013). Prevalence study of genetically defined skeletal muscle channelopathies in England. *Neurology*, 80, 1472–1475. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828cf8d0>

Imbrici, P., Altamura, C., Camerino, G. M., Mangiatordi, G. F., Conte, E., Maggi, L., Brugnioni, R., Musaraj, K., Caloiero, R., Alberga, D., Marsano, R. M., Ricci, G., Siciliano, G., Nicolotti, O., Mora, M., Bernasconi, P., Desaphy, J.-F., Mantegazza, R., & Camerino, D. C. (2016). Multidisciplinary study of a new CIC-1 mutation causing myotonia congenita: a paradigm to understand and treat ion channelopathies. *The FASEB Journal*, 30, 3285–3295. <https://doi.org/10.1096/fj.201500079R>

Imbrici, P., Altamura, C., Pessia, M., Mantegazza, R., Desaphy, J. F., & Camerino, D. C. (2015). CIC-1 chloride channels: State-of-the-art research and future challenges. *Front Cell Neurosci*, 9:156.

Jentsch, T. J., & Pusch, M. (2018). CLC chloride channels and transporters: Structure, function, physiology, and disease. *Physiological Reviews*, 98, 1493–1590. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2017>

Ludewig, U., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. *Nature*, 383, 340–343. <https://doi.org/10.1038/383340a0>

Middleton, R. E., Pheasant, D. J., & Miller, C. (1996). Homodimeric architecture of a CIC-type chloride ion channel. *Nature*, 383, 337–340. <https://doi.org/10.1038/383337a0>

Mindell, J. A., Maduke, M., Miller, C., & Grigorieff, N. (2001). Projection structure of a CIC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature*, 409, 219–223.

Park, E., & Mackinnon, R. (2018). Structure of the CLC-1 chloride channel from homo sapiens. *Elife*, 7, e36629. <https://doi.org/10.7554/eLife.36629>

Pedersen, T. H., Riisager, A., de Paoli, F. V., Chen, T.-Y., & Nielsen, O. B. (2016). Role of physiological CLC-1 Cl⁻ ion channel regulation for the excitability and function of working skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 147, 291–308. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611582>

Pusch, M., Steinmeyer, K., Koch, M. C., & Jentsch, T. J. (1995). Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CLC-1 chloride channel. *Neuron*, 15, 1455–1463. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90023-3)

Ronstedt, K., Sternberg, D., Detoro-Dassen, S., Gramkow, T., Begemann, B., Becher, T., Kilian, P., Grieschat, M., Machtens, J. P., Schmalzing, G., Fischer, M., & Fahlke, C. (2015). Impaired surface membrane insertion of homo- and heterodimeric human muscle chloride channels carrying amino-terminal myotonia-causing mutations. *Scientific Reports*, 5, 15382. <https://doi.org/10.1038/srep15382>

Tsujino, A., Kaibara, M., Hayashi, H., Eguchi, H., Nakayama, S., Sato, K., Fukuda, T., Tateishi, Y., Shirabe, S., Taniyama, K., & Kawakami, A. (2011). A CLCN1 mutation in dominant myotonia congenita impairs the increment of chloride conductance during repetitive depolarization. *Neuroscience Letters*, 494, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.002>

Ulzi, G., Lecchi, M., Sansone, V., Redaelli, E., Corti, E., Saccomanno, D., Pagliarani, S., Corti, S., Magri, F., Raimondi, M., D'Angelo, G., Modoni, A., Bresolin, N., Meola, G., Wanke, E., Comi, G. P., & Lucchiari, S. (2012). Myotonia congenita: Novel mutations in CLCN1 gene and functional characterizations in Italian patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 318, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.03.024>

Vindas-Smith, R., Fiore, M., Vásquez, M., Cuenca, P., del Valle, G., Lagostena, L., Gaitán-Peñas, H., Estevez, R., Pusch, M., & Morales, F. (2016). Identification and Functional Characterization of CLCN1 Mutations Found in Nondystrophic Myotonia

Weinberger, S., Wojciechowski, D., Sternberg, D., Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K., Becher, T., Begemann, B., Fahlke, C., & Fischer, M. (2012). Disease-causing mutations C277R and C277Y modify gating of human ClC-1 chloride channels in myotonia congenita. *Journal of Physiology*, 590, 3449–3464.

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

METHODS

Informed consent of the patient

The Ethics Committee of the local institution deemed that this research did not have to be submitted to it, provided that a written agreement was obtained from the patient. This agreement was obtained by TG.

Gene sequencing

Sanger sequencing was performed for all coding exons and part of the flanking introns using standard procedures. This new variant has been submitted to ClinVar (SUB7196737).

Mutagenesis

Plasmid pRcCMV-YFP-hClC-1 was a generous gift of Dr. C. Fahlke. Mutations were introduced into the plasmid by replacing a 1.1 kb *SpeI/AfeI* fragment by a mutated (either F337C or Q412P) double stranded gBlock DNA Fragment (IDT-DNA, Belgium). The sequences were verified by sequencing (GIGA-Genomics platform, Liège University).

Electrophysiology

Experiments were performed on transiently transfected HEK-293 cells. The cells were transfected with 1 µg plasmid pRcCMV/YFP/hClC-1, containing the full-length WT hClC-1 cDNA or the F337C hClC-1, using TransIT®-LT1 (Mirus Bio, Madison, WI). Cells were used 24 h after transfection. Whole-cell patch-clamp experiments were performed using classical methods. Data was acquired at room temperature (21–24°C) using an EPC-10 amplifier (Heka, Lambrecht, Germany) and Patchmaster software (Heka, Lambrecht, Germany). Low-resistance pipettes ($\approx 3 \text{ M}\Omega$) were pulled from filamented borosilicate glass tubing

(2.0 mm outer diameter, 0.42 mm wall thickness; Hilgenberg) with a P87 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Recordings in which the series resistance was $\geq 10 \text{ M}\Omega$ were discarded. The composition of the extracellular solution which superfused (@ 2 ml/min) the cells was (in mM): 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 and 5 HEPES, with the pH adjusted to 7.4 using NaOH. The composition of the internal solution, was (in mM): 140 NaCl, 2 MgCl_2 , 5 EGTA, 10 HEPES, pH adjusted to 7.4 with NaOH. In this condition, the reversal potential of Cl^- was -1 mV. Cells were therefore held at 0 mV.

Data analysis

MatLab[®] was used to analyze the time course of current deactivation. An algorithm was developed to fit the decay of currents elicited between -200 and -60 mV with a sum of two exponentials and a time-independent component. The following equation was used :

$$\text{Eq.1 } I(t) = A_{\text{fast}} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + A_{\text{slow}} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + C$$

where τ_{fast} and τ_{slow} are the time constants of the fast and slow components of current relaxation/deactivation, and A_{fast} , A_{slow} , are the weights of the fast and slow components, and C is the steady-state component of the current. Relative A_{fast} , A_{slow} , and C were defined as the ratio of the parameter on the sum of A_{fast} , A_{slow} , and C .

The voltage dependence of channel activation was examined by plotting the apparent open probability (P_o) as a function of the pre-pulse voltage ranging from -200mV to 90mV. The following formula was used for the fitting,

$$\text{Eq.2 } P_o(V) = \text{Min} + (1-\text{Min})/[1+\exp((V_{1/2}-V)/S)]$$

where Min is the minimal value of P_o , $V_{1/2}$ is the half-maximal activation potential, and S is the slope factor. Both types of analysis were done on a subset of the recordings with the lowest noise in order to enhance their reliability.

Confocal imaging

HEK293 cells were plated in 24-well plates at a density of $1.8 \cdot 10^5$ cells/well in DMEM (Lonza). They were transfected with either an empty

plasmid or a plasmid containing cDNA of WT, F337C or Q412P channels. The latter were chosen as a control because they had previously been demonstrated to have a very small surface expression (Vindas-Smith et al., 2016). The concentration of all plasmids was 0.1 µg/µl. Cells were transfected using Xtreme Gene (Sigma Aldrich), diluted at 1/33 in Mix OptiMEM and applied at room temperature for 15 minutes. On the next day, « Cellview » dishes (Greiner Bio One) were coated with 100 µg/ml Poly-D-Lysine (Lonza) and left for 1h at 37°C. After rinsing and trypsin (Gibco – ThermoFisher Scientific) digestion, the cells were plated (2 ml/dish). On the next day, cells were observed using an inverted Zeiss confocal microscope (LSM 880 Elyra S1).

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Prism version 8 (Graphpad Software), using the adequate statistical test. P<0.05 was considered as significant.

Variant	N	Min	$V_{1/2}$ (mV)	S
WT	9	0.29 ± 0.06	-106.1 ± 12.3	36.7 ± 3.9
F337C	12	$0.56 \pm 0.06^{**}$	-103.7 ± 10.9	$53.9 \pm 2.7^{**}$
WT/F337C	6	$0.56 \pm 0.02^*$	-84.2 ± 8.7	$60.9 \pm 2.5^{**}$

Supplementary Table 1. Boltzmann parameters of activation curves of WT, F337C and WT/F337C hCIC-1 channels. The activation curve found in each experiment was fitted with a Boltzmann equation (Eq.2). The parameters are reported as mean $\pm$ SEM. N is the sample size, Min is the minimal (relative) open probability, $V_{1/2}$ is the voltage at which activation is half-maximal and S is the slope factor. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, ANOVA-1 followed by *post-hoc* Tukey's test. The differences were observed when compared with WT. The activation curves are shown in Fig. 2D.