



FACULTÉ  
DE MÉDECINE



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

## Rôle des interneurones somatostatine dans la physiologie striatale : une approche morphologique, électrophysiologique et comportementale

**Thèse présentée par Adeline GAZAN**

en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2018-2019

Sous la direction du Professeur Serge Schiffmann, promoteur et du  
Professeur Alban De Kerchove d'Exaerde, co-promoteur

Laboratoire de Neurophysiologie

### **Jury de thèse :**

Jean-Pierre BRION (Université libre de Bruxelles, Président)  
Serge SCHIFFMANN (Université libre de Bruxelles, Secrétaire)  
Alban DE KERCHOVE D'EXAERDE (Université libre de Bruxelles)  
Paul VERBANCK (Université libre de Bruxelles)  
Nicolas GASPARD (Université libre de Bruxelles)  
David GALL (Université libre de Bruxelles)  
Serge ARON (Université libre de Bruxelles)  
Bernard LAKAYE (Université de Liège)  
Jacques BARIK (Université de Nice)

## REMERCIEMENTS

Des remerciements s'imposent ! Tout d'abord, je voudrais remercier Serge Schiffmann et Alban de Kerchove d'Exaerde pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de neurophysiologie ainsi que pour leur patience et leurs précieux conseils. Ensuite, un énorme merci à Daniel Rial pour m'avoir prise sous son aile, conseillée, encouragée et pour avoir supporté mes goûts musicaux douteux (selon ses dires). Notre karma est probablement sous le niveau de la mer avec toutes ces dissections !

Vient le tour de mes partenaires de bureau ! Elisa et Elena, avec qui tout a commencé et qui m'ont appris les trois uniques mots d'espagnol que je connais ... Piruleta! Bon et en fait, j'ai oublié les deux autres ... On aura vécu sur un autre rythme circadien ... mais toujours là, les unes pour les autres. Merci à Lars qui est venu compléter ce bain d'exotisme, même si pour le coup, il ne m'a pas appris un seul mot d'allemand !

Pour ce qui est des nombreux conseils pratiques et de l'aide au quotidien, merci à Laeticia, Perrine, Souad et Delphine. De même qu'à Pierre, ma calculette portable !

Merci à Deniz et Amandine pour tous ces repas de midi partagés... Vous m'avez manqué ces derniers mois. Merci à Jean-Marie pour ses nombreux e-mails matinaux à propos de la microscopie ou des légumes oubliés ! Et finalement, merci à l'équipe des vers, des électrophy, à Julian, Michelle, Michiel ainsi qu'à tous les anciens !

Pour terminer cette longue énumération, merci à ma famille et à mes amis qui ont compris que la thèse n'était pas un long fleuve tranquille, ainsi qu'à la machine à coca du niveau 2 et au congélateur du -1, sans qui je n'aurais probablement jamais pu croiser ce gars du 5<sup>e</sup> qui partage mon quotidien aujourd'hui ...

*Cette thèse, je la dédie à mon papa qui nous a quittés bien trop vite et qui aurait probablement fêté ça avec ... un bon verre de coca !*

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS</b>	<b>10</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 : INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>1. Les Noyaux de la base</b>	<b>18</b>
1.1. Organisation anatomique des noyaux de la base	19
1.2. Organisation fonctionnelle des noyaux de la base	20
1.2.1. Organisation dorso/ventrale du <i>striatum</i>	20
1.2.2. Voie directe/indirecte du <i>striatum</i>	23
1.2.3. Organisation striosomale et matricielle du <i>striatum</i>	24
1.3. Dysfonctionnement des noyaux de la base	26
1.3.1. La maladie de Parkinson	26
1.3.2. La chorée de Huntington	27
1.3.3. L'assuétude aux drogues	28
<b>2. Organisation cytologique du <i>striatum</i></b>	<b>31</b>
2.1. Les neurones de projection (« medium-sized spiny neurons » ou MSN)	31
2.2. Les interneurones du <i>striatum</i>	34
2.2.1. Les interneurones cholinergiques du <i>striatum</i> (« Tonicly Active Neuron » ou TAN)	36
2.2.2. Les interneurones GABAergiques du <i>striatum</i>	38
2.2.2.1. Les interneurones exprimant la parvalbumine (« Fast Spiking Interneurones » ou FSI)	38
2.2.2.2. Les interneurones exprimant la calrétinine	40
2.2.2.3. Les interneurones exprimant la somatostatine, le Neuropeptide Y et la n(NO) synthase (« Persistent and Low Threshold Spike » interneurons ou PLTS)	41
2.2.2.3.1. Les neuropeptides et enzymes spécifiques des PLTS	43
2.2.2.3.2. Connexions avec les MSN	45
2.2.2.3.3. Les interneurones SST au sein de la circuiterie striatale	48
2.2.2.4. Les autres types d'interneurones GABAergiques	49

2.1.2.5. Implication des interneurons striataux dans les différentes pathologies des noyaux de la base	50
--	----

---

<b>Chapitre 2 : OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>51</b>
--	-----------

---

<b>Chapitre 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>54</b>
--	-----------

---

<b>1. Composition des différentes solutions utilisées</b>	55
<b>2. Lignées transgéniques</b>	61
1.1. Lignée SST-Cre	61
2.1. Lignée iDTR	62
2.3. Croisements	63
<b>3. Procédure générale</b>	63
3.1. Hébergement	63
3.2. Anesthésie	64
3.3. Suivi	64
3.4. Aspects éthiques	64
<b>4. Génotypage</b>	64
<b>5. Chirurgies</b>	66
5.1. Stéréotaxie	66
5.2. Perfusion transcardiaque	68
<b>6. Immunofluorescence</b>	69
6.1. Coupes flottantes de cerveau	69
6.2. Immunomarquages	69
6.3. Acquisition et traitement des données	71
<b>7. Western blot</b>	71
7.1. Préparation des échantillons	71
7.2. Dosage protéique	72
7.3. Electrophorèse sur gel	72
7.4. Transfert protéique et révélation des protéines	72
7.5. Révélation	72
<b>8. Enregistrements électrophysiologiques</b>	73
8.1. Préparation des tranches de cerveau	74
8.2. Enregistrements électrophysiologiques	744

8.3. Analyse des propriétés passives de la membrane et de l'excitabilité intrinsèque	75
<b>9. Analyse de la morphologie neuronale</b>	<b>77</b>
9.1. Fixation et révélation des neurones enregistrés	78
9.2. Acquisition au microscope confocal	78
9.3. Déconvolution	78
9.4. Analyse des paramètres morphologiques	79
<b>10. Etudes de comportements</b>	<b>79</b>
10.1. Comportements moteurs	79
10.1.1. Test de champ ouvert	79
10.1.2. Test de rotarod accélérant	80
10.1.3. Single-pellet Reaching Task	81
10.2. Comportements modélisant l'anxiété ou la dépression	83
10.2.1. Test de préférence au saccharose	83
10.2.2. Test de nage forcée	84
10.2.3. Test de suspension par la queue	85
10.2.4. Elevated Plus Maze	85
10.3. Nociception	86
10.3.1. Test des filaments de Von Frey	86
10.3.2. Test d'hypersensibilité au froid	87
10.4. Comportements induits pharmacologiquement	88
10.4.1. Test de sensibilité à la cocaïne	88
10.4.2. Test de préférence de place conditionnée	88
10.4.3. Réponse au SKF-38393	90
10.4.4. Test de catalepsie induite par l'halopéridol	90
<b>11. Traitement des données</b>	<b>90</b>

---

## **Chapitre 4 : RÉSULTATS** **92**

<b>1. Validation du modèle d'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> après injection striatale de toxine diphtérique</b>	<b>93</b>
<b>2. Modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones de projection du <i>striatum</i></b>	<b>95</b>
<b>3. Modifications de la morphologie des neurones de projection du <i>striatum</i></b>	<b>98</b>

4. Comportement moteur, comportement nociceptif et comportements modélisant l'anxiété ou la dépression	102
5. Altérations des comportements induits par la cocaïne	110
6. Expression protéique de marqueurs dopaminergiques après traitement chronique à la cocaïne	115
7. Modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones de projection du <i>striatum</i> après traitement chronique à la cocaïne	118
8. Modifications de la morphologie des neurones de projection du <i>striatum</i> après traitement chronique à la cocaïne	122
<b>Chapitre 5 : DISCUSSION</b>	<b>125</b>
<hr/>	
1. Validation du modèle d'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> après injection striatale de toxine diphtérique	126
2. Modification des propriétés électrophysiologiques et de la morphologie des neurones de projection du <i>striatum</i>	126
3. Comportement moteur, comportement nociceptif et comportements modélisant l'anxiété ou la dépression	129
4. Effets de la cocaïne chez des souris dépourvues d'interneurones somatostatine dans le <i>striatum</i>	131
<b>Chapitre 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>138</b>
<hr/>	
<b>Chapitre 7 : BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>142</b>
<hr/>	

## TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Localisation anatomique sur tranche parasagittale oblique de cerveau de souris des différents noyaux formant le système des noyaux de la base	18
Figure 2 : Représentation schématique des différentes boucles cortico-ganglio-thalamo-corticales	20
Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe coronale de cerveau de rat, mettant en évidence la localisation des différentes régions du <i>striatum</i>	21
Figure 4 : Représentation schématique d'un cerveau de rongeur, mettant en évidence les projections neuronales majeures entre les différentes structures connues du circuit de la récompense	22
Figure 5 : Représentation schématique du système des ganglions de la base décrivant les voies directe et indirecte issues du <i>striatum</i>	24
Figure 6 : Coupe parasagittale de <i>striatum</i> , immunomarquée pour le récepteur $\mu$ -opioïde (MOR) permettant de visualiser les striosomes au sein de la matrice	25
Figure 7 : Représentation schématique de la voie de la récompense où les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) envoient leurs projections vers le noyau accumbens (NAc)	29
Figure 8 : Représentation schématique des différentes populations de neurones du <i>striatum</i>	31
Figure 9 : Projection en z selon l'intensité maximale d'une acquisition confocale d'un neurone épineux de taille moyenne	32
Figure 10 : Enregistrement électrophysiologique en mode cellule entière d'un neurone épineux de taille moyenne (MSN)	34
Figure 11 : Classification des interneurones du <i>striatum</i>	35
Figure 12 : Enregistrement électrophysiologique, en configuration cellule entière d'un interneurone cholinergique toniquement actif (TAN)	37
Figure 13 : Enregistrement électrophysiologique, en configuration cellule entière, d'un interneurone parvalbumine de type « Fast Spiking » (FS)	39
Figure 14 : Enregistrement électrophysiologique, en configuration cellule entière, d'un interneurone de type « Low Threshold Spiking » (LTS)	43
Figure 15 : Etude de connectivité entre un interneurone de type PLTS et un MSN	46
Figure 16 : Représentation 3D de la position des différents neurones striatonigraux et des interneurones somatostatine connectés	47
Tableau 1 : Tableau récapitulatif reprenant la composition des différentes solutions d'amplification selon le transgène à identifier	58

Figure 17 : Immunomarquage GFP sur une coupe sagittale d'un cerveau adulte de souris SST-ires-cre :: RCE-LoxP	62
Figure 18 : Schéma général du système iDTR, où la lignée iDTR est croisée avec une lignée exprimant la Cre recombinase dans une population cellulaire voulue, permettant d'éliminer la cassette stop qui bloque l'expression du récepteur simien à la toxine diphtérique	63
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes séquences oligonucléotidiques utilisées, de la température d'hybridation des amorces ainsi que du nombre de cycles d'amplification et du poids moléculaire des différents fragments	65
Tableau 3 : Tableau reprenant l'ensemble des coordonnées, nombre de sites d'injection, volumes, concentrations et vitesses d'injection de la toxine diphtérique qui ont été testés	67
Figure 19 : Graphe reprenant le pourcentage de cellules positives pour la somatostatine dans le cortex et le <i>striatum</i> de souris injectées avec différents volumes ou concentrations de toxine diphtérique	68
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages	70
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés lors des expériences de Western blot	73
Figure 20 : Potentiel d'action enregistré lors d'un courant imposé	77
Figure 21 : Photographie d'un dispositif d'openfield subdivisé en 4 arènes	80
Figure 22 : Photographie d'un dispositif de rotarod accélérant	81
Figure 23 : Ligne du temps des différentes étapes prenant cours au long du test de « single-pellet reaching task » et captures vidéo des étapes d'habituation, de mise en place et d'entraînement	83
Figure 24 : Capture vidéo prise lors d'un test de nage forcée	84
Figure 25 : Capture vidéo prise lors d'un test de suspension par la queue	85
Figure 26 : Photographie du dispositif utilisé lors d'un test d' « Elevated Plus Maze »	86
Figure 27 : Photographie d'un set de filaments de Von Frey utilisé dans l'étude de l'allodynie	87
Figure 28 : Photographie du dispositif utilisé lors d'un test de conditionnement de préférence de place	89
Figure 29 : Validation du modèle d'ablation des interneurons somatostatine après injection striatale de DT dans des souris SST-Cre iDTR	94
Figure 30 : Préservation des MSNs et des interneurons cholinergiques, parvalbumine et calrétinine du <i>striatum</i> après injection de toxine diphtérique dans le <i>striatum</i> de souris SST-Cre iDTR	95
Figure 31 : Les MSNs des souris SST-Cre <sup>+/-</sup> iDTR <sup>+/-</sup> après ablation des interneurons SST présentent une altération de leur potentiel membranaire de repos et une augmentation de	97



leur excitabilité intrinsèque

Tableau 6 : Paramètres analysés lors des enregistrements électrophysiologiques des MSNs chez des souris SST-Cre iDTR <sup>+/-</sup> après injection striatale bilatérale de DT	98
Figure 32 : L'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> n'affecte pas l'arborisation dendritique des MSNs	100
Figure 33 : L'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> induit une modification de la densité des épines dendritiques distales des MSNs sans modifier le volume dendritique	101
Figure 34 : L'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> n'affecte pas la locomotion et l'apprentissage moteur	105
Figure 35 : L'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> n'altère pas les comportements modélisant l'anxiété ou la dépression	108
Figure 36 : L'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> n'affecte pas la perception algésique	109
Figure 37 : Les souris dépourvues d'interneurons somatostatine du <i>striatum</i> présentent une augmentation de la locomotion induite par la cocaïne sans toutefois présenter de préférence pour le compartiment où la cocaïne est injectée	111
Figure 38 : L'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> ne modifie pas les réponses aux molécules ciblant les récepteurs de la dopamine D1 ou D2, à savoir le SKF-38393 ou l'halopéridol	114
Figure 39 : L'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> modifie l'expression du transporteur de la dopamine DAT	117
Tableau 7 : Paramètres analysés lors des enregistrements électrophysiologiques des MSNs chez des souris SST-Cre iDTR <sup>+/-</sup> après injection striatale bilatérale de DT et traitées à la cocaïne durant 3 jours successifs	119
Figure 40 : Les MSNs des souris dépourvues d'interneurons somatostatine du <i>striatum</i> et traitées à la cocaïne présentent une excitabilité similaire au groupe contrôle	120
Figure 41 : Les MSNs des souris dépourvues d'interneurons somatostatine du <i>striatum</i> et traitées à la cocaïne sont plus excitables suite à l'ajout de dopamine dans le milieu extracellulaire	121
Figure 42 : Les souris ayant subi l'ablation des interneurons somatostatine du <i>striatum</i> ne présentent pas de différence de l'arborisation dendritique des MSNs par rapport à des souris contrôles suite à des injections répétées de cocaïne	123
Figure 43 : Les souris dépourvues en interneurons somatostatine du <i>striatum</i> présentent une réduction de la densité des épines dendritiques des MSNs par rapport à des souris contrôles lorsque celles-ci sont soumises à des injections chroniques de cocaïne	124
Figure 44 : Expression de la mCherry et de la SST dans le <i>striatum</i> après injection striatale de virus AAV5-Gq-mCherry et immunomarquage pour la somatostatine chez des souris SST-Cre	140

## LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

°C	Degré Celsius
3'UTR	<i>UnTranslated Region 3'</i>
AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i> (Trad : Virus adéno-associé)
aCSF	<i>artificial CerebroSpinal Fluid</i> (Trad : Liquide céphalorachidien artificiel)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AHP	<i>AfterHyperPolarization</i> (Trad : Potentiel au point le plus hyperpolarisé)
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPA	<i>α-Amino-3-hydroxyl-5-Methyl-4-isoxazolePropionate Acid</i>
APS	Ammonium PerSulfate
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> (Trad : Chromosome bactérien artificiel)
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i> (Trad : Albumine de sérum bovin)
C57BL/6	C57 black 6
CCK	CholéCystoKinine
CDK5	<i>Cyclin-Dependent Kinase 5</i>
ChAT	Choline AcétylTransférase
ChR2	ChannelRhodopsine 2
CNO	Clozapine-N-Oxide
CPP	<i>Conditioned Place Preference test</i> (Trad : Test de préférence de place conditionnée)
CPu	Caudé-Putamen
CR	CalRétinine
Cre	<i>Cyclization recombination</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>

DARPP-32	<i>Dopamine- and cAMP-Regulated PhosphoProtein, Mr 32 kDa</i>
DAT	<i>DopAmine Transporteur</i> (Trad : Transporteur de la dopamine)
dATP	désoxyAdénosine TriPhosphate
DEPC	DiEthylPyroCarbonate
DLS	<i>DorsoLateral Striatum</i> (Trad : <i>Striatum</i> dorsolatéral)
DMS	<i>DorsoMedian Striatum</i> (Trad : <i>Striatum</i> dorsomédian)
dNTP	désoxyriboNucléotide TriPhosphate
DREADD	<i>Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug</i>
DT	<i>Diphtheria Toxin</i> (Trad : Toxine diphtérique)
DTT	DiThioThréitol
$\Delta$ FosB	Variant d'épissage tronqué de FosB
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF2	<i>Elongation Factor</i> (Trad : Facteur d'élongation 2)
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol-bis(<math>\beta</math>-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid</i>
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i> (Trad : Test du labyrinthe surélevé)
EPSC	<i>Excitatory Post Synaptic Current</i> (Trad : Courant post-synaptique excitateur)
ES	Embryonnaire Souche
eYFP	<i>enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FLP	FLiPpase
FLPe	Version améliorée de la recombinaise site spécifique FLP
FLPeR	FLiPpeR
FRT	<i>Flippase Recognition Target</i>
FS(I)	<i>Fast Spiking (Interneuron)</i> (Trad : Interneurone à décharge rapide)
FST	<i>Forced Swimming Test</i> (Trad : Test de nage forcée)
GABA	$\gamma$ -AminoButiric Acid
GAD	Glutamate Décarboxylase
GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GHB	Acide $\gamma$ -HydroxyButirate
GluR2	<i><math>\alpha</math>-Amino-3-hydroxyl-5-Methyl-4-isoxazolePropionate Acid (AMPA)</i> <i>Glutamate Receptor subunit 2</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPCR	<i>G Protein coupled Receptor</i> (Trad : Récepteur couplé aux protéines G)
GPe	<i>Globus pallidus externe</i>
GPI	<i>Globus pallidus interne</i>
HEPES	<i>HydroxyEthyl PiperazineEthaneSulfonic acid</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
(i)DTR	<i>(Inducible) Diphtheria Toxin Receptor</i> (Trad : Récepteur de la toxine diphtérique)
i.p.	Intrapéritonéal
iPSC	<i>Inhibitory Post Synaptic Current</i> (Trad : Courant post-synaptique inhibiteur)
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ISI	<i>Inter-Spike Interval</i> (Trad : Intervalle inter-évènement)
kb	Kilobase
kDa	kiloDalton
KO	<i>KnockOut</i>
L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
LoxP/lox	<i>Locus of X-over of P1</i>
LTD	<i>Long Term Depression</i> (Trad : Depression à long terme)
LTP	<i>Long Term Potentiation</i> (Trad : Potentialisation à long terme)
miARN	Micro Acide RiboNucléique
MSN	<i>Medium-Sized Neuron</i> (Trad : Neurone épineux de taille moyenne)
mAChR	<i>muscarinic Acetylcholin Receptor</i> (Trad : Récepteur de l'acétylcholine muscarinique)
NAc	Noyau Accumbens
nAChR	<i>nicotinic Acetylcholin Receptor</i> (Trad : Récepteur de l'actétylcholine nicotinique)

NADPH	Forme réduite du NicotinAmide adénine Dinucléotide Phosphate
Neo/NeoR	Gène de résistance à la Néomycine
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGF	<i>NeuroGliaForm</i>
NHS	<i>Normal Horse Serum</i>
NMDA	N-methyl-D-aspartate
(n)NOS	<i>(neuronal) Nitric Oxide Synthase</i> (Trad : Oxyde nitrique synthase (neuronale))
NPY	Neuropeptide Y
NST	Noyau Sous-Thalamique
Nur77	Récepteur Nucléaire 77
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAF	PAraFormaldéhyde
Pb	Paire de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline Twee</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Trad : Réaction en chaîne par polymérase)
PLC	PhosphoLipase C
PLTS	<i>Persistent Low Threshold Spike</i>
PolyA	Séquence de polyadénylation
PV	ParValbumine
RCE	R26R CAG-boosted EGFP
RMP	<i>Resting Membrane Potential</i> (Trad : Potentiel membranaire de repos)
Rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Trad : Erreur standard à la moyenne)
SERT	<i>SERotonin Transporter</i> (Trad : Transporteur de la sérotonine)
SNc	Substance Noire <i>pars compacta</i>
SNr	Substance Noire <i>pars reticulata</i>

SRIF	<i>Somatotropin Release Inhibitory Factor</i>
SST	SomatoSTatine
STE	Sodium chloride-Tris-EDTA
STN	<i>Sub-Thalamic Nucleus</i> (Trad : Noyau sous-thalamique)
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TAN	<i>Tonically Active Neuron</i> (Trad : Neurone toniquement actif)
TEMED	TEtraMéthylEthylèneDiamine
TH	Tyrosine Hydroxylase
TST	<i>Tail Suspension Test</i> (Trad : Test de suspension par la queue)
VIP	<i>VasoIntestinal Peptide</i> (Trad : Peptide vasoactif intestinal)
VTA	<i>Ventral Tegmental Area</i> (Trad : Aire tegmentale ventrale)
WT	<i>WildType</i>

## RÉSUMÉ

Le système des noyaux de la base possède un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions telles que le contrôle et l'apprentissage moteur ainsi que les processus motivationnels et cognitifs. Le *striatum* constitue la principale structure d'entrée de ce système et peut être subdivisé en une région dorsale, impliquée dans cet apprentissage et ce contrôle moteur, et une partie ventrale, impliquée dans le système de la récompense et donc les processus motivationnels. Le *striatum* est composé de deux principales catégories de neurones : les neurones épineux de projection (ou « medium-sized spiny neurons », MSN) qui composent la majorité de la structure, et des interneurones. Les interneurones du *striatum* participent à la modulation de l'activité des neurones épineux, selon un *modus operandi* propre à chaque population. Les interneurones exprimant la somatostatine, le neuropeptide Y (NPY) et l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique (nNOS) constituent l'une de ces populations d'interneurones et n'a encore été que brièvement caractérisée d'un point de vue fonctionnel.

Notre travail de thèse s'est donc focalisé sur l'étude de la fonction des interneurones somatostatine du *striatum* par une approche basée sur la perte de fonction. Cette étude fonctionnelle a été réalisée à l'aide d'un modèle de souris ayant subi une ablation spécifique des interneurones somatostatine dans le *striatum*. Trois principaux types d'analyses ont été réalisés.

La première partie du travail s'est intéressée aux fonctions de ces interneurones à l'échelle cellulaire et, plus particulièrement à l'effet de la perte de ces interneurones sur l'activité électrique des MSNs. Nous avons ainsi observé que l'ablation des interneurones somatostatine induit une dépolarisation du potentiel membranaire de repos des MSNs et une augmentation de leur excitabilité, suggérant que par les différents neurotransmetteurs que ces interneurones libèrent, ceux-ci participent au contrôle de leurs propriétés électrophysiologiques.

Le second chapitre, toujours à l'échelle cellulaire et dans ce même contexte de connexion interneurone-MSN, a visé à étudier l'effet de la perte des interneurones somatostatine du *striatum* sur la morphologie des neurones de projection et ce, au moyen

d'une reconstruction 3D. Celle-ci a mis en évidence que les MSNs présentent une réduction de leur densité d'épines dendritiques dans la portion distale, pouvant être le résultat d'un mécanisme d'homéostasie synaptique, alors que l'arborisation dendritique-même n'est pas modifiée.

Finalement, la dernière partie a considéré le rôle des interneurons à une échelle systémique, en étudiant l'effet de l'ablation sur le comportement de la souris. Nous avons observé que l'ablation des interneurons somatostatine striataux n'altère pas le comportement moteur, le comportement nociceptif ou les comportements modélisant l'anxiété ou la dépression mais résulte en une augmentation de l'hyperlocomotion induite par la cocaïne. Il s'est également avéré que le rôle des interneurons somatostatine du *striatum* dans la réponse à la cocaïne se limite exclusivement à l'aspect locomoteur de la cocaïne et non à l'aspect motivationnel, comme montré par un test de préférence de place conditionné. Des analyses d'expression de différents marqueurs dopaminergiques ont, de plus, permis de suggérer que le phénotype hyperlocomoteur observé impliquerait une augmentation de l'expression du transporteur de la dopamine. Enfin, une étude électrophysiologique et morphologique des MSNs, chez des souris dépourvues d'interneurons somatostatine dans le *striatum* et sensibilisées à la cocaïne, a permis de mettre en évidence une occlusion des effets de la cocaïne sur les propriétés membranaires passives et l'excitabilité des MSNs. De plus, l'addition de dopamine au milieu extracellulaire induit une augmentation de l'excitabilité des MSNs des souris ayant subi une ablation des interneurons somatostatine striataux, compatible avec l'expression accrue de transporteur de la dopamine. D'autre part, l'étude morphologique a mis en évidence un effet de la sensibilisation à la cocaïne sur la densité des épines proximales des MSNs des souris dépourvues d'interneurons somatostatine.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de fournir, à l'aide d'un modèle d'ablation spécifique, des données substantielles quant au rôle des interneurons somatostatine du *striatum* dans la physiologie striatale et, en particulier leur fonction inhibitrice des MSNs, ainsi que leur rôle dans les comportements impliquant le *striatum*, dont la réponse induite par la cocaïne.



# CHAPITRE 1 :

# INTRODUCTION

## 1. Les Noyaux de la base

Le système des noyaux de la base constitue un réseau de structures sous-corticales du cerveau formé d'une série de noyaux interconnectés et localisés dans le télencéphale basal, le diencephale et le mésencéphale (Lanciego et al. 2012). Ce réseau est constitué du *striatum* (composé du noyau caudé, du *putamen* et du noyau accumbens), du *globus pallidus* interne et externe, du noyau sous-thalamique et de la substance noire *pars reticulata* et *pars compacta* (Figure 1).

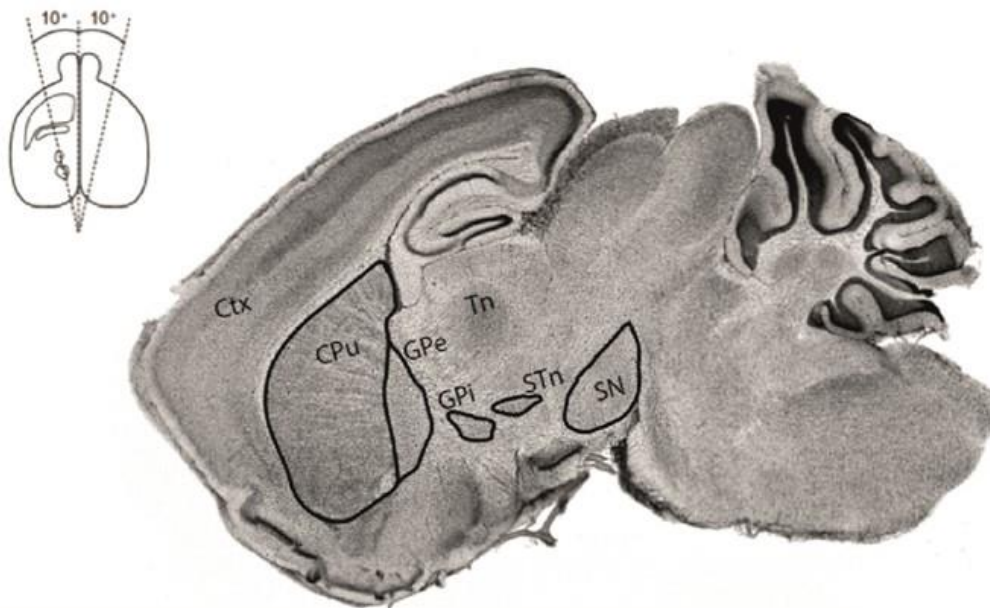


Figure 1 : Localisation anatomique sur tranche parasagittale oblique de cerveau de souris des différents noyaux formant le système des noyaux de la base. Abréviations : Ctx, cortex; CPu, *caudate putamen*; GPe, *globus pallidus* externe; GPi, *globus pallidus* interne; STn, noyau sous-thalamique; SN, substance noire; Th, *thalamus*. Adapté de la thèse de Laurie Lambot 2015.

Cette série de structures est impliquée dans différents processus physiologiques tels que le mouvement volontaire, la motivation, les émotions, et certaines fonctions cognitives comme l'apprentissage ou encore la mémorisation (Lanciego et al. 2012; Graybiel & Grafton 2015).

Il est d'ailleurs avéré depuis un certain nombre d'années qu'un dysfonctionnement du système des noyaux de la base peut être associé à de nombreuses pathologies telles que la maladie de Huntington (Reiner & Deng 2018), la maladie de Parkinson (Wichmann 2018),

le syndrome de Gilles de la Tourette (Xu et al. 2016), la schizophrénie (Haller et al. 2014) ou encore la dépendance aux drogues (Lüscher 2016).

### 1.1. Organisation anatomique du système des noyaux de la base

De manière plus détaillée, le *striatum* est une structure télencéphalique sous-corticale qui constitue la principale voie d'entrée du système des noyaux de la base et la plus grande structure de ce système. Le *striatum* est composé essentiellement de neurones GABAergiques et reçoit de nombreuses afférences d'origine corticale, thalamique et dopaminergique.

Le *globus pallidus*, composé de neurones GABAergiques, est également localisé dans le télencéphale. Celui-ci se subdivise en deux parties : le *globus pallidus* interne (GPi) et le *globus pallidus* externe (GPe). De par ses projections sur le *thalamus* et ses afférences provenant des différents noyaux du système, le segment interne du *globus pallidus* représente l'une des structures de sortie des ganglions de la base.

Le noyau sous-thalamique (NST) est localisé dans le diencephale et sert de noyau relai entre les noyaux d'entrée et de sortie. Celui-ci reçoit des afférences inhibitrices de la portion externe du *globus pallidus* et envoie des projections glutamatergiques vers la portion interne du *globus pallidus* et la substance noire *pars reticulata*. En plus de son rôle d'intermédiaire dans la voie indirecte, celui-ci participe également à la voie dite « hyperdirecte », en référence à ses afférences provenant directement du cortex (Lanciego et al. 2012). Cette voie permet d'atteindre les noyaux de sortie sans passer par les noyaux d'entrée et joue un rôle dans l'inhibition motrice globale (Tewari et al. 2016).

Pour terminer, la substance noire est une structure localisée à la base du mésencéphale dont le nom provient de sa couleur foncée chez le primate. Ce noyau est également subdivisé en deux parties formant la substance noire *pars compacta* (SNc) et la substance noire *pars reticulata* (SNr). Tout comme le GPi, de par ses projections GABAergiques sur le *thalamus*, la SNr constitue l'un des noyaux de sortie du système des ganglions de la base. Quant à la SNc, celle-ci contient l'une des sources majeures de projections dopaminergiques (Gerfen & Bolam 2017).

## 1.2. Organisation fonctionnelle des noyaux de la base

Le *striatum* constitue la principale voie d'entrée de ce système de par ses afférences corticales et thalamiques. Celui-ci intègre et transmet ses informations vers les noyaux de sortie qui communiquent eux-mêmes avec le *thalamus*. L'information est alors renvoyée vers le cortex selon une boucle cortico-ganglio-thalamo-corticale. Plusieurs boucles, utilisant un schéma similaire, permettent au système des ganglions de la base d'assurer des fonctions différentes et variées (Figure 2)(Alexander et al. 1986; Tewari et al. 2016).

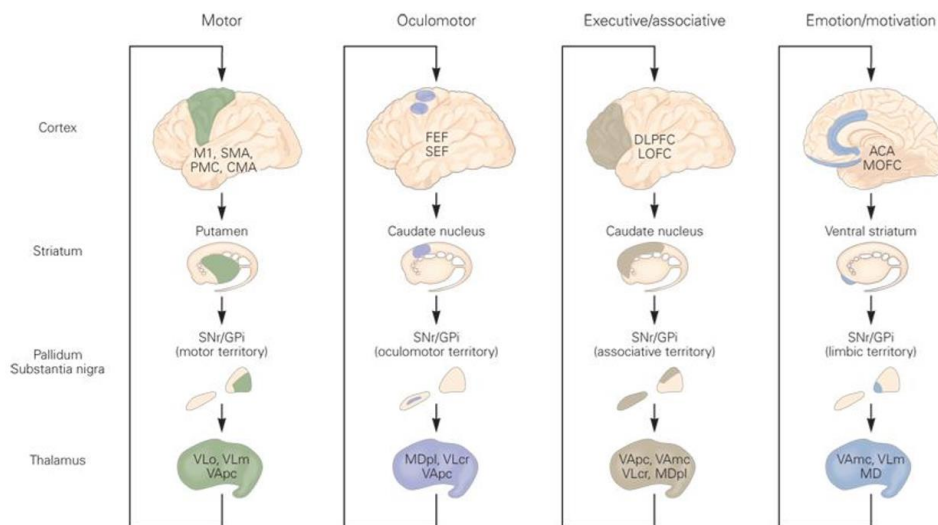


Figure 2 : Représentation schématique des différentes boucles cortico-ganglio-thalamo-corticales. Adapté de Principles of Neural Science, Fifth Edition.

Le *striatum* est la structure qui va particulièrement nous intéresser au cours de cette thèse de par son rôle essentiel dans le système des ganglions de la base. D'un point de vue fonctionnel, celui-ci s'organise de différentes façons et ces différents types d'organisation se superposent formant un système complexe (Crittenden & Graybiel 2011).

### 1.2.1. Organisation dorso/ventrale du *striatum*

Le *striatum* peut être subdivisé en deux grandes régions constituant le *striatum* dorsal ou *néostriatum* ainsi que le *striatum* ventral correspondant au noyau accumbens (NAc).

Le *striatum* dorsal est lui-même composé de deux noyaux distincts chez le primate : le noyau caudé et le *putamen*. Chez la souris, par opposition aux primates, ces noyaux ne peuvent être distingués d'un point de vue anatomique et forment une structure unique, souvent notée caudé-*putamen* (CPu). Malgré cette absence de différence anatomique, celle-ci est tout de même subdivisée en une région médiane, formant ce que l'on appelle communément le *striatum* dorsomédian (DMS) qui correspond au noyau caudé du primate et en une région latérale, formant le *striatum* dorsolatéral (DLS), qui correspond au *putamen* (Durieux et al. 2012) (Figure 3).

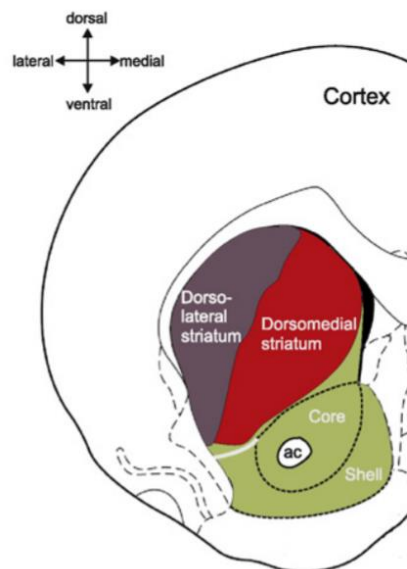


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe coronale de cerveau de rat, mettant en évidence la localisation des différentes régions du *striatum*. Le *striatum* dorsal peut lui-même être subdivisé en une région médiane et en une région latérale formant respectivement le *striatum* dorsomédian et le *striatum* dorsolatéral. Le *striatum* ventral ou noyau accumbens, quant à lui, est composé du cœur (core), qui s'organise autour de la commissure blanche antérieure (ac), et de la coquille (shell). Adapté de Humphries & Prescott 2010.

Le *striatum* dorsal est principalement associé aux fonctions motrices et reçoit des afférences corticales différentes selon la région. En effet, alors que le DMS reçoit plutôt des afférences du cortex préfrontal et des aires associatives, le DLS, lui, est principalement innervé par le cortex sensorimoteur. De par cette distinction, le DMS et le DLS sont impliqués dans des composantes différentes de la fonction motrice. Plus particulièrement, le DMS paraît nécessaire aux premières phases de l'apprentissage instrumental tandis que le DLS apparaît plutôt impliqué dans l'acquisition d'habitudes (Durieux et al. 2012). Le *striatum*

dorsal reçoit également des afférences dopaminergiques issues de la SNc (Lanciego et al. 2012).

Le *striatum* ventral participe essentiellement aux processus motivationnels et au circuit de la récompense. En effet, le NAc est l'un des composants essentiels de ce circuit et reçoit des projections dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale (VTA), localisée dans le mésencéphale. En présence de récompenses naturelles définies comme « des stimuli émotionnels positifs tels que de la nourriture, du sexe ou des interactions sociales »<sup>1</sup>, celui-ci est activé et associé à une libération de dopamine dans le NAc mais également dans le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe, autres composants du système (Figure 4). Ainsi, une stimulation du circuit va permettre de reconnaître le stimulus en tant que récompense, de « consommer » cette récompense afin d'assurer la survie de l'individu et de retourner vers celle-ci (Russo & Nestler 2013).

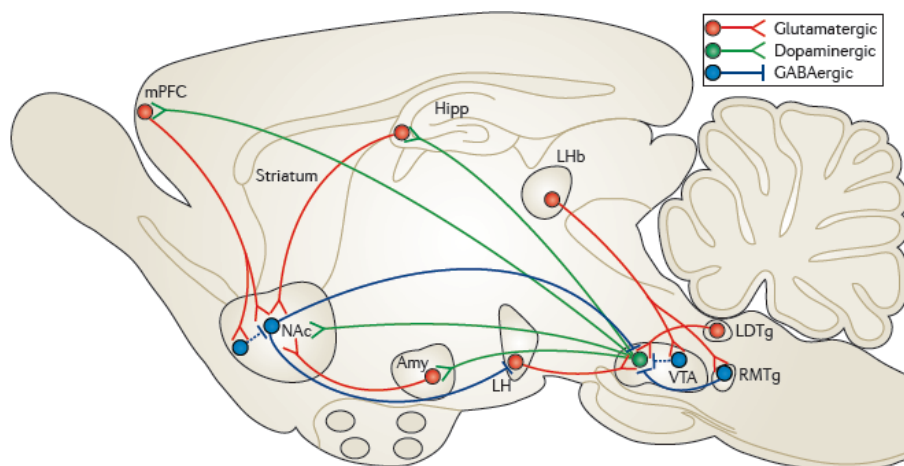


Figure 4 : Représentation schématique d'un cerveau de rongeur, mettant en évidence les projections neuronales majeures entre les différentes structures connues du circuit de la récompense, à savoir : l'aire tegmentale ventrale (VTA), le noyau accumbens (NAc), le cortex préfrontal médian (mPFC), l'hippocampe (Hipp) et l'amygdale (Amy). Le circuit de la récompense inclut des projections dopaminergiques de la VTA vers le NAc, le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale, qui libèrent de la dopamine en réponse ou par anticipation à une récompense. Ces neurones dopaminergiques sont aussi modulés par des interneurons GABAergiques. Autres abréviations : LDTg, *tegmentum* dorsolatéral; LH, *hypothalamus* latéral; LHb, noyau habénulaire latéral; RMTg, *tegmentum* rostromédial. Adapté de Russo et al. 2013.

<sup>1</sup> (Russo & Nestler 2013)

Des premières hypothèses quant aux structures impliquées dans le circuit de la récompense ont été proposées lors d'expériences d'autostimulation électrique de cerveau chez le rat. En effet, Olds et Milner ont découvert, au début des années 50, qu'en fonction de la position de l'électrode dans le cerveau, les rats pouvaient exercer une pression accrue du levier délivrant la décharge électrique (Olds & Milner 1954). Ceci mettant en évidence l'aspect « récompensant » de ces stimulations et les similitudes avec la recherche de récompenses naturelles telles que l'eau ou la nourriture suggérant l'activation d'une circuiterie commune de la récompense (Wise 1996).

Le *striatum* ventral peut également être subdivisé en deux régions : le cœur (« core ») et l'enveloppe (« shell »). Ces deux régions possèdent des afférences et des efférences différentes (Buot & Yelnik 2012) ainsi qu'une morphologie neuronale et des propriétés biochimiques différentes (Meredith et al. 2008). Sur le plan fonctionnel, le « core » participe aux comportements dirigés vers un but (Burton et al. 2015) et le « shell », à l'effet renforçant des psychostimulants (Veeneman et al. 2015).

### 1.2.2. Voies directe/indirecte du *striatum*

Le *striatum* peut également être organisé en une voie directe et indirecte qui se superposent au *striatum* dorsal et ventral. Dans le cas du *striatum* dorsal, cette dichotomie participe au contrôle de l'activité motrice. En effet, le *striatum* comme structure d'entrée du système des ganglions de la base, intègre les afférences d'origine corticale et exerce, par l'intermédiaire de ces voies directe et indirecte, des effets opposés sur le *thalamus* qui communique avec l'aire motrice supplémentaire. Ainsi, la voie directe est composée de neurones inhibiteurs qui projettent vers la SNr et le GPi et qui lorsqu'elle est activée aboutit à la levée d'inhibition exercée par ces neurones sur le *thalamus*, facilitant l'exécution du mouvement. Par opposition, l'activation de la voie indirecte, composée de neurones inhibiteurs projetant vers le GPe, aboutit à la levée d'inhibition exercée par le NST sur le GPi. Ceci induisant, dans ce cas, une inhibition du *thalamus* et de l'action motrice (Gerfen & Surmeier 2011; Lanciego et al. 2012; Bahuguna et al. 2018) (Figure 5).

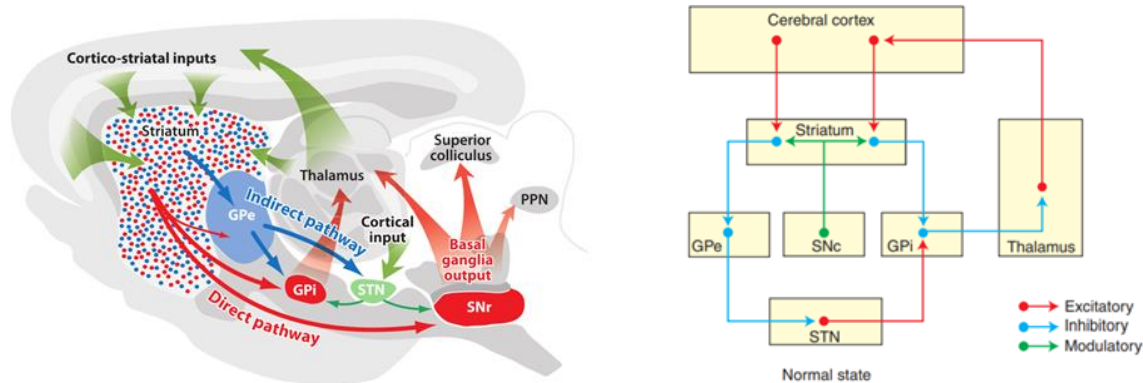


Figure 5 : Représentation schématique du système des ganglions de la base décrivant les voies directe et indirecte issues du *striatum*. Les afférences glutamatergiques excitatrices originaires du cortex et du *thalamus* induisent l'activation des neurones de la voie directe (en rouge) et indirecte (en bleu). Les neurones de projection de la voie directe inhibent alors le *globus pallidus* interne (GPI) et la substance noire *pars reticulata* (SNr) tandis que les neurones de la voie indirecte inhibent le *globus pallidus* externe (GPe), inhibant à son tour le noyau sous-thalamique (STN), qui possède des projections excitatrices vers les noyaux de sortie. Les noyaux de sortie projettent sur le *thalamus*, qui est en connexion par l'intermédiaire de synapses excitatrices avec le cortex. La libération de dopamine par la substance noire *pars compacta* (SNc) module également l'activité de la voie directe et indirecte. Adapté de Gerfen & Surmeier 2011 (gauche) et Lanciego et al. 2012 (droite).

Cependant, l'activation des neurones de la voie directe et indirecte du *striatum* dorsal n'induit pas toujours des effets opposés comme observé par Kravitz et al. (2010) lors de la stimulation optogénétique de ces deux populations. En effet, des expériences par imagerie calcique permettant d'étudier l'activité neuronale, montrent une activation des deux populations lors de l'acquisition d'habitudes (O'Hare et al. 2016) ou lors de l'initiation du mouvement ; ceci suggérant plutôt une forme de coopération entre les deux voies. Cette activation serait nécessaire à la sélection de l'action à réaliser en permettant la mise en place du mouvement désiré et l'inhibition des mouvements parasites (Cui et al. 2013).

### 1.2.3. Organisation striosomale et matricielle du *striatum*

Un dernier type d'organisation du *striatum*, qui se superpose aux précédentes a été décrit dans les années 70 (Graybiel 1978), il s'agit des striosomes et de la matrice.

Dans ce cas, cette organisation se définit comme des amas de neurones, les striosomes, baignant dans une mer matricielle qui constitue à elle seule 80% du volume du *striatum*. Rien ne permet de distinguer visuellement les deux compartiments, si ce n'est un immunomarquage de molécules exprimées différemment dans ces deux compartiments



(Figure 6). Ainsi, l'acétylcholine-estérase, la calbindine ou la Choline-O-acétyltransférase sont plus abondantes dans la matrice tandis que le récepteur  $\mu$ -opioïde, la substance P ou le récepteur hormonal nucléaire Nur77 sont présents en majorité dans les striosomes (Brimblecombe & Cragg 2017).

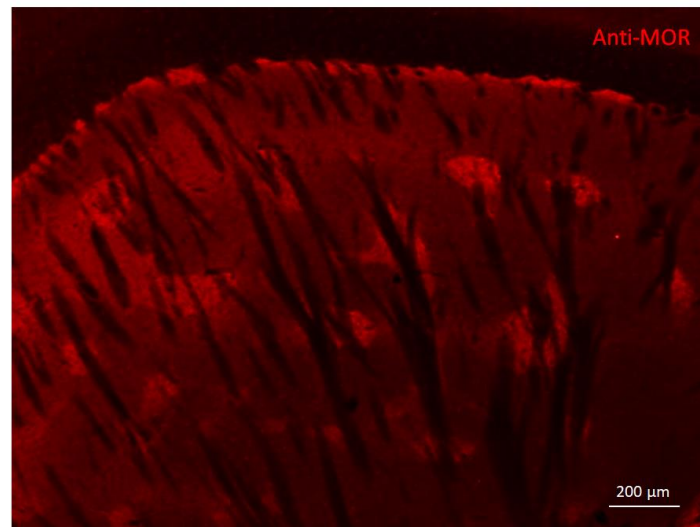


Figure 6 : Coupe parasagittale de *striatum*, immunomarquée pour le récepteur  $\mu$ -opioïde (MOR) permettant de visualiser les striosomes au sein de la matrice (Acquisition personnelle).

En plus de l'expression différentielle de ces molécules, il semble que les deux compartiments possèdent des afférences et des efférences distinctes, qui pourraient être à l'origine de différences fonctionnelles entre ces deux compartiments. En effet, il est proposé que les striosomes régissent les aspects limbiques du comportement tandis que les aspects sensorimoteurs seraient gérés par le compartiment matriciel (Crittenden & Graybiel 2011). Des études récentes de rétro-marquage, dans des lignées de souris exprimant la Cre recombinase dans les striosomes ou la matrice, remettent partiellement en cause ces distinctions fonctionnelles en montrant que la matrice et certains striosomes reçoivent à la fois des informations limbiques et sensorimotrices (Smith et al. 2016). Néanmoins, les études fonctionnelles confirment l'implication limbique des striosomes en démontrant l'importance de la connexion cortex prélimbique-striosomes lors d'un test de prise de décision nécessitant d'évaluer le rapport coût-bénéfice (Friedman et al. 2015) ou l'activation des neurones des striosomes en prédiction d'une récompense (Yoshizawa et al. 2018).

### 1.3. Dysfonctionnement des noyaux de la base

Comme mentionné, il est avéré qu'un dysfonctionnement du système des ganglions de la base peut être associé à de nombreuses pathologies. Par exemple, la chorée de Huntington ou la maladie de Parkinson se caractérisent par une dégénérescence d'un ou plusieurs composants de ce système et sont à l'origine des troubles moteurs et cognitifs observés chez les patients. Un dysfonctionnement des noyaux de la base est également impliqué dans plusieurs troubles neuropsychiatriques, tels que l'assuétude aux drogues, les troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité ou la schizophrénie.

Ce chapitre vise plus particulièrement à décrire l'implication du système des noyaux de la base dans les troubles moteurs et neuropsychiatriques associés à la chorée d'Huntington, la maladie de Parkinson ou à l'assuétude aux drogues.

#### 1.3.1. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative progressive causée par la perte graduelle des neurones dopaminergiques de la SNc. D'un point de vue symptomatique, la maladie se caractérise par une bradykinésie (lenteur du mouvement), une rigidité musculaire et des tremblements au repos. La maladie est également associée à des symptômes non-moteurs, variables dans le temps et d'un patient à l'autre, tels que l'anxiété, la dépression, des troubles du sommeil ainsi qu'une détérioration progressive des fonctions cognitives (Wichmann 2018). Cette dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc est à l'origine d'un déséquilibre entre la voie directe et la voie indirecte du *striatum*. En effet, en temps normal, ces afférences dopaminergiques ont pour effet d'activer la voie directe et d'inhiber la voie indirecte, facilitant ainsi le mouvement. En leur absence, les MSNs de la voie directe vont donc devenir hypoactifs tandis que les MSNs de la voie indirecte sont suractivés. Ceci va avoir pour conséquence une stimulation accrue des structures de sorties et une diminution de l'activité des neurones thalamo-corticaux et des aires corticales motrices, résultant en un dysfonctionnement dans la sélection, l'initiation et l'exécution des mouvements (Lanciego et al. 2012).

A l'échelle cellulaire, la dégénérescence des neurones dopaminergiques est associée à une accumulation de la protéine  $\alpha$ -synucléine formant des agrégats anormaux toxiques et

constituants des structures appelées corps de Lewy. Une surexpression de l' $\alpha$ -synucléine dans certains modèles murins est d'ailleurs associée à cette dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc (Blesa & Przedborski 2014). Cependant, l'origine de cette accumulation est encore à l'étude, bien que l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux soit aujourd'hui impliquée (Kalia & Lang 2015).

Actuellement, aucun traitement curatif n'a encore été mis au point. Le traitement classique de la maladie de Parkinson consiste à ce jour à administrer de la L-DOPA, le précurseur de la dopamine, afin de combler le manque de dopamine. Cependant, ce traitement n'a qu'un effet symptomatique et est associé à long terme au développement d'effets secondaires qui se caractérisent par des dyskinésies (mouvement anormaux) (Gerlach 1977). D'autres approches visent, entre autre, à administrer des agonistes des récepteurs de la dopamine (De Keyser et al. 1995) ou encore à réaliser des stimulations cérébrales profondes du noyau sous-thalamique (Deuschl et al. 2006).

### 1.3.2. La chorée de Huntington

La chorée d'Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire qui résulte d'une mutation dominante dans le gène codant pour l'Huntingtine qui se caractérise par une expansion du triplet de nucléotide CAG. Le nombre de répétition de ce triplet est inversement corrélé à l'âge de l'apparition de la maladie (Reiner & Deng 2018).

La maladie d'Huntington se caractérise par des mouvements involontaires et saccadés (une chorée) et les patients peuvent présenter des troubles psychiatriques et cognitifs. Cette maladie est causée par une dégénérescence des neurones de projection épineux du *striatum* et il semble que les neurones de la voie indirecte présentent une plus grande vulnérabilité et dégénèrent plus rapidement que les neurones de la voie directe. Les patients atteints présentent par conséquent une diminution de l'inhibition du GPe et une augmentation de l'inhibition du GPi et cette perte d'activité du GPi résulte en une suractivation du *thalamus* à l'origine des troubles moteurs de la maladie (Mitchell et al. 1999). Actuellement, aucun traitement curatif n'a vu le jour (Kiebertz et al. 2018).

### 1.3.3. L'assuétude aux drogues

L'assuétude aux drogues se définit par « la perte de contrôle et la prise compulsive de drogue et ce, malgré les conséquences néfastes »<sup>2</sup>. La synergie observée lors d'expériences de stimulations électriques et d'injections simultanées de drogues ont mis en évidence que le circuit de la récompense (=voie mésocorticolimbique) constitue une cible commune aux drogues addictives telles que la cocaïne ou l'amphétamine (Wise 1996). En effet, il est maintenant avéré que les drogues dites addictives agissent comme des récompenses et activent le circuit, en libérant une grande quantité de dopamine dans le NAc par des mécanismes distincts d'une drogue à l'autre, et induisant un renforcement artificiel (Figure 7). Ce renforcement artificiel entraîne une prise répétée et peut être à l'origine du phénomène d'assuétude (Wise 1996; Hyman & Malenka 2001; Nestler 2002; Lüscher & Ungless 2006).

Par exemple, la cocaïne, cible les transporteurs de monoamines régulant la recapture et la concentration extracellulaire de ces neurotransmetteurs. Plus précisément, la cocaïne bloque la recapture de la dopamine en agissant sur le transporteur de la dopamine (DAT) localisé sur la membrane du neurone dopaminergique, augmentant ainsi la concentration en dopamine dans le *striatum* et dans la VTA (Lüscher 2016).

---

<sup>2</sup> (Lüscher & Ungless 2006)

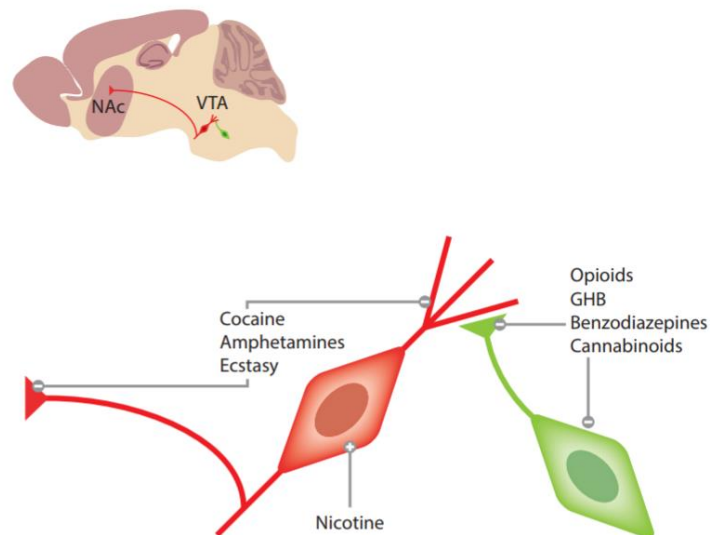


Figure 7 : Représentation schématique de la voie de la récompense où les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) envoient leurs projections vers le noyau accumbens (NAc). Les drogues induisant une assuétude sont à l'origine d'une augmentation de la concentration en dopamine dans le NAc. Cette augmentation de dopamine est le résultat de trois types de mécanismes différents. La nicotine dépolarise directement les neurones dopaminergiques tandis que la cocaïne, l'ecstasy et les amphétamines bloquent la recapture de la dopamine en agissant au niveau de la région pré- et post-synaptique des neurones dopaminergiques. Finalement, les opioïdes, l'acide  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB), les cannabinoïdes et les benzodiazépines exercent un effet inhibiteur sur les neurones GABAergiques qui projettent sur les neurones dopaminergiques, résultant en une levée d'inhibition sur les neurones dopaminergiques de la VTA. Adapté de Lüscher 2016.

Une première prise de drogue est donc associée à un sentiment de plaisir artificiel et est le résultat d'une libération massive de dopamine dans le NAc en communication avec le système limbique (Nestler 2005). Considérée comme une récompense, la drogue peut alors entraîner des prises répétées et ce, afin de pouvoir à nouveau ressentir ces effets positifs (Hyman & Malenka 2001).

Ces prises répétées, qui sont sous l'influence de la libération de dopamine dans le système mésocorticolimbique peuvent *in fine* aboutir à une perte de contrôle et à une prise compulsive de drogues, qui elle, apparaît plutôt être le résultat de multiples adaptations neuronales pouvant par exemple affecter la transcription de gènes, la morphologie des neurones ou encore leur excitabilité (Kauer & Malenka 2007; Madsen et al. 2012; Walker & Nestler 2018).

En effet, le développement d'assuétudes semble, entre autre, être causé par la formation de souvenirs durables de plaisirs intenses procurés par la drogue ainsi que de

différents éléments tels que les endroits, les personnes, ... associés à cette prise de drogue (Nestler 2005). C'est pourquoi la probabilité de rechute, même après une longue période d'abstinence, est élevée et qu'une exposition à un signal associé à la prise de drogues, pouvant rappeler ces souvenirs, peut déclencher le désir de reprendre de la drogue. L'assuétude peut dès lors être considérée comme une forme pathologique de mémoire et d'apprentissage (Kauer & Malenka 2007).

Il apparaît donc que le développement d'assuétudes implique des neuroadaptations d'une grande stabilité et que celles-ci engageraient des mécanismes similaires à ceux rencontrés lors de la formation de la mémoire à long terme (Madsen et al. 2012).

Parmi ces neuroadaptations, comme mentionné ci-dessus, la prise de drogue peut affecter la transcription de gènes. Par exemple, l'exposition quotidienne à une drogue augmente la synthèse du facteur de transcription  $\Delta$ FosB au niveau des neurones du NAc. (Nestler 2005; Nestler 2008). Cette accumulation entraîne alors une modification de l'expression d'un grand nombre de gènes parmi lesquels CDK5, impliqué notamment dans la régulation du nombre d'épines dendritiques (Meyer et al. 2008) ou encore GluR2, codant pour une sous-unité d'un récepteur du glutamate (AMPA) possédant une conductance réduite pouvant ainsi modifier la réponse glutamatergique.  $\Delta$ FosB participerait donc à l'initiation et au maintien de l'assuétude par sa relative longue durée de vie de plusieurs semaines et ses effets neurobiologiques pouvant affecter la physiologie des neurones à long-terme (Nestler 2008).

Notons également que de nombreuses études ont mis en évidence le rôle des modifications épigénétiques et des miARN dans ce mécanisme de neuroadaptation (Madsen & al., 2012).

Le rôle de la régulation de l'expression génique dans la neuroadaptation induite par les drogues met donc en évidence l'implication importante de la génétique dans le développement des assuétudes, génétique variant d'un individu à l'autre et pouvant expliquer les inégalités face au développement de celles-ci (Walker & Nestler 2018).

## 2. Organisation cytotologique du *striatum*

Le *striatum* est une structure constituée de neurones qui peuvent être subdivisés en deux grandes catégories anatomiques : les neurones de projection épineux et les interneurones non-épineux (Figure 8).

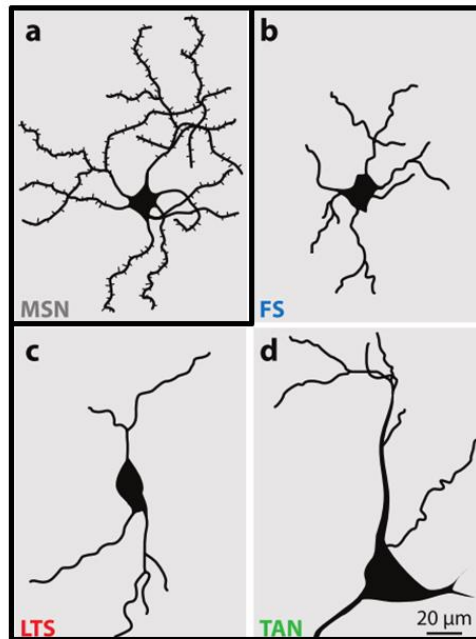


Figure 8 : Représentation schématique des différentes populations de neurones du *striatum*. Parmi celles-ci, on retrouve des neurones de projection (a) et différents types d'interneurones (b,c et d). Abréviations : (a) MSN, neurone épineux de taille moyenne ou « medium-sized spiny neurons »; (b) FS, interneurone de type « fast spiking »; (c) LTS, interneurone de type « low-threshold spiking »; (d) TAN, interneurone toniquement actif. Adapté de Kreitzer 2009.

### 2.1. Les neurones de projection (« medium-sized spiny neurons » ou MSNs)

Les neurones épineux de taille moyenne, également appelés MSNs, composent l'essentiel du *striatum* et comptent pour plus de 95% des neurones striataux (Kreitzer 2009). Ceux-ci constituent la majeure voie d'entrée et de sortie du *striatum*. Ces neurones possèdent un soma ovale ou formant un polygone irrégulier, dont la taille peut varier entre 12 et 20 µm de diamètre. Leur arborisation dendritique est constituée généralement de 7 à 10 dendrites partant du corps cellulaire et des épines dendritiques recouvrent

essentiellement les dendrites tertiaires, avec une plus faible densité à proximité du soma et des extrémités (Gerfen & Bolam 2017) (Figure 9).

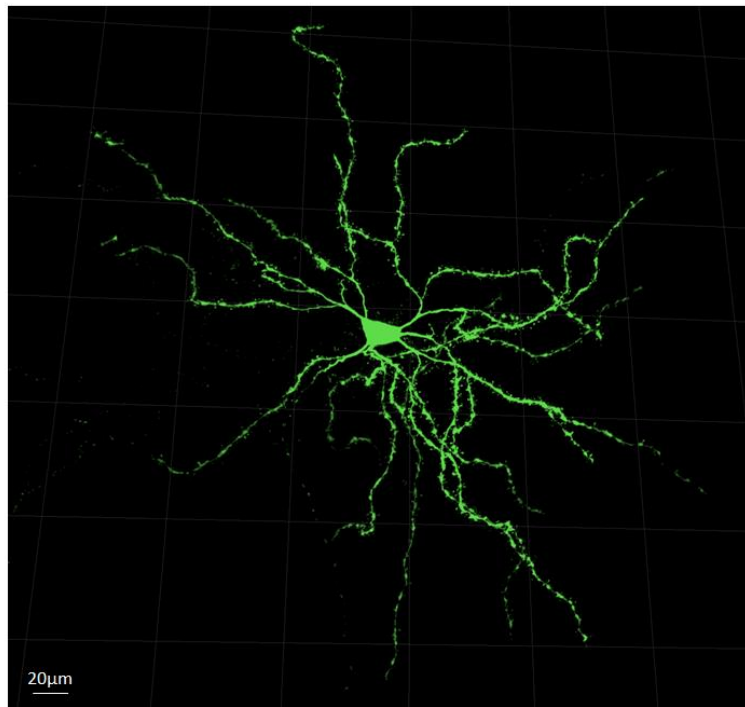


Figure 9 : Projection en z selon l'intensité maximale d'une acquisition confocale d'un neurone épineux de taille moyenne (Acquisition personnelle).

Bien que l'ensemble des MSNs possèdent une morphologie assez similaire (un plus grand nombre de dendrites primaires a tout de même observé dans le cas des neurones de la voie directe (Gertler et al. 2008)), ceux-ci peuvent être classés en deux catégories selon la nature de leur projection axonale. En effet, les neurones épineux sont dits striatonigraux, lorsqu'ils projettent vers la SNr, et striatopallidaux, lorsque ceux-ci ciblent le GPe. Ces deux catégories sont à l'origine, respectivement, des voies directe et indirecte du système des noyaux de la base.

Ces deux populations de neurones sont toutes deux GABAergiques mais diffèrent du point de vue de leur histochimie. Plus précisément, les neurones striatonigraux expriment le récepteur D1 de la dopamine ainsi que le récepteur muscarinique M4 (Kreitzer 2009). De plus, ils sont immunoréactifs pour la substance P et la dynorphine. Les neurones de la voie indirecte expriment le récepteur D2 de la dopamine, le récepteur  $A_{2A}$  de l'adénosine, ainsi que le neuropeptide enképhaline (Durieux et al. 2011). Il est également important de



mentionner que, de par l'expression des récepteurs de la dopamine D1 et D2, l'activité des neurones striatonigraux et striatopallidiaux est modulée par les neurones dopaminergiques issus de la SNc (pour le *striatum* dorsal) et de l'aire tegmentale ventrale (pour le *striatum* ventral). En effet, les récepteurs de la dopamine D1 et D2 sont des récepteurs couplés aux protéines G et appartiennent à deux sous-familles distinctes. La sous-famille « D1-like », à laquelle le récepteur D1 appartient, est couplée aux protéines  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_{olf}$ . Son activation résulte en la stimulation de l'adénylate cyclase, la production d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A. Ceci entraîne la phosphorylation et la régulation de cibles cellulaires, parmi lesquelles des canaux ioniques ou des facteurs de transcription. Par opposition, la sous-famille « D2-like », qui comprend le récepteur D2 de la dopamine, est quant à lui associé aux protéines  $G\alpha_o$  et  $G\alpha_i$ . Celles-ci inhibent la protéine kinase A en bloquant la production d'AMPc par l'adénylate cyclase, et modulent également l'activité cellulaire en stimulant la phospholipase C (PLC) ou en régulant certains canaux ioniques voltage-dépendants. L'activation de la PLC et de ces canaux se fait indépendamment de la voie de l'AMPc (Tritsch & Sabatini 2012). Selon le type de récepteur exprimé, la dopamine exerce donc un effet opposé qui se caractérise par une augmentation de l'excitabilité des neurones exprimant le récepteur D1, à savoir les neurones striatonigraux, et par une réduction de l'excitabilité des neurones exprimant le récepteur D2, à savoir les neurones striatopallidiaux (Planert et al. 2013).

Les différents types cellulaires du *striatum* possèdent des propriétés électrophysiologiques distinctes et caractéristiques, permettant de les identifier grâce à leur activité électrique particulière. Ces propriétés permettent de distinguer aisément les MSNs et les différents types d'interneurones. Dans le cas des MSNs, ils partagent bon nombre de propriétés électrophysiologiques malgré leur hétérogénéité en termes d'expression et de projection (striatonigral/striatopallidal). En effet, les MSNs sont des neurones GABAergiques et possèdent un potentiel membranaire de repos hyperpolarisé (autour de -90mV). De plus, ceux-ci possèdent une faible résistance d'entrée (environ 140 M $\Omega$ ) et une dépolarisation lente retardant le départ de la première décharge (Gittis et al., 2010) (Figure 10). Les MSNs se caractérisent aussi par un passage de leur potentiel membranaire, d'un état hyperpolarisé à un état plus dépolarisé, qui ne sera pas obligatoirement accompagné d'une décharge. Ce passage d'un état à l'autre est la résultante d'une excitation glutamatergique suffisante,

capable de bloquer les canaux potassium Kir, qui limitent la dépolarisation membranaire en temps normal (Kreitzer 2009).

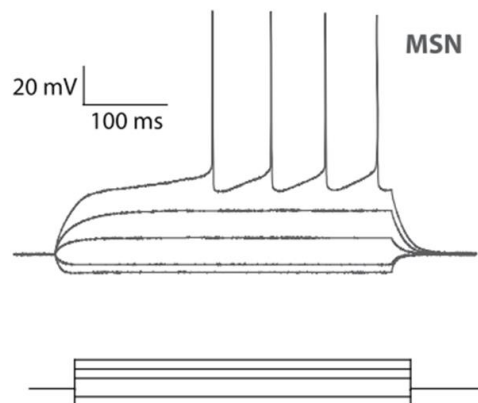


Figure 10 : Enregistrement électrophysiologique en mode cellule entière d'un neurone épineux de taille moyenne (MSN). Lorsqu'un courant est appliqué, le neurone présente une faible résistance d'entrée et un délai avant l'initiation du premier potentiel d'action. Adapté de Kreitzer 2009.

Des distinctions physiologiques modestes mais significatives entre les deux sous-populations de MSNs ont néanmoins été observées, affectant leur excitabilité respective. En effet, il s'avère que les neurones striatopallidaux sont plus excitables que les neurones striatonigraux (Gertler et al. 2008; Planert et al. 2013).

De plus, une étude réalisée au laboratoire a également établi les profils d'expression génique distincts de ces deux sous-populations de neurones à l'aide des techniques de FACS et de microarray, permettant d'identifier plusieurs centaines de gènes spécifiquement exprimés dans l'une ou l'autre de ces populations. Cela a permis d'aborder les différences fonctionnelles qui les caractérisent et qui pourraient jouer un rôle dans la régulation différentielle des voies directe et indirecte (Ena et al. 2013).

## 2.2. Les interneurones du striatum

L'activité des MSNs peut être modulée par de multiples acteurs. Parmi ces acteurs, le rôle de la dopamine a été brièvement évoqué ci-dessus. Nous allons particulièrement nous intéresser aux mécanismes de modulation de l'activité des neurones de projection exercée par les interneurones striataux. En effet, les interneurones du *striatum* présentent une

grande diversité et ont dès lors la possibilité d'influencer les propriétés des MSNs de différentes façons et ce, d'une manière spécifique à chaque population (Tepper & Bolam 2004). Les interneurones, par opposition aux neurones épineux de taille moyenne, constituent seulement 5% du nombre total de neurones du *striatum* chez le rongeur (Straub et al. 2016) et se caractérisent par un faible nombre d'épines dendritiques voire leur absence. Deux grandes catégories d'interneurones peuvent être distinguées par leur morphologie et l'expression de neurotransmetteurs. En effet, des neurones non épineux de grande taille peuvent être observés ainsi que des neurones non épineux de taille moyenne. Il s'agit respectivement des interneurones cholinergiques et des interneurones GABAergiques (Gerfen & Bolam 2017)(Figure 11).

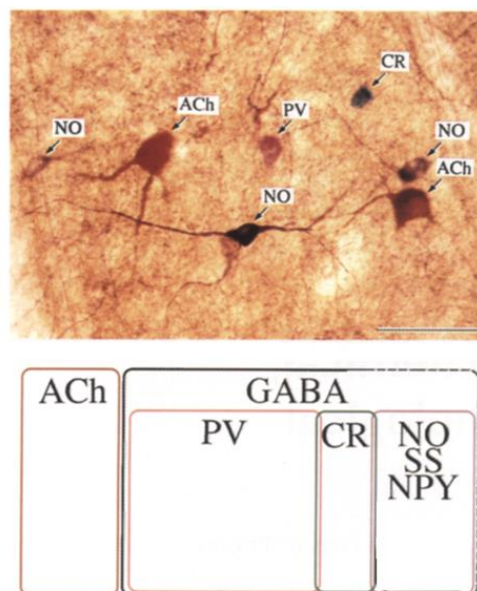


Figure 11 : Classification des interneurones du *striatum*. Une première grande classe d'interneurones exprime l'acétylcholine (marqué ici pour la choline acétyltransférase) tandis que la seconde exprime le GABA. Cette dernière peut elle-même être subdivisée en 3 sous-types : les interneurones exprimant la parvalbumine (PV), ceux exprimant la calrétinine (CR) et ceux qui expriment la somatostatine (SST)/le neuropeptide Y (NPY)/l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) (utilisé dans ce cas comme marqueur). La taille des quadrants est fonction de la proportion de chaque population; l'échelle est de 50  $\mu$ m. Adapté de Kawaguchi 1995.

### 2.2.1. Les interneurones cholinergiques du *striatum* (« Tonicly Active Neuron » ou TAN)

Les interneurones cholinergiques sont présents à hauteur de 0,5 à 1% dans le *striatum* (Kreitzer 2009). Dans un premier temps (1911), Ràmon y Cajal, les a considérés comme étant des neurones de projection, statut qui a entre autre été corrigé dans les années 70 par Grofová (1979) suite aux premières observations de Kölliker, qui les classait déjà parmi les interneurones en 1896. Ces interneurones ont été définis comme étant cholinergiques car ceux-ci expriment l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, à savoir la choline acétyltransférase (Tepper et al. 2010). Ces interneurones se caractérisent par une morphologie particulière. En effet, ils ont un corps cellulaire de grande taille (20-50  $\mu\text{m}$ ), caractéristique qui leur a d'ailleurs valu de se faire appeler « interneurones cholinergiques géants ». Les interneurones cholinergiques possèdent un réseau axonal étendu et font principalement synapse avec les MSNs et d'autres interneurones, tels que les interneurones exprimant la parvalbumine (Apicella 2017). De plus, ceux-ci sont majoritairement localisés dans le compartiment matriciel du *striatum* et plus particulièrement à la frontière des striosomes, semblant leur donner un rôle stratégique dans la communication entre ces deux compartiments (Gonzales & Smith 2015).

Sur le plan électrophysiologique, les interneurones cholinergiques possèdent une signature particulière. En effet, ils présentent des potentiels d'action de longue durée (autour de 2 ms à mi-hauteur de pic) et sont dits « toniquement actifs » (TAN) car ils dépolarisent spontanément. Cette activité est le résultat d'un potentiel membranaire (-60 mV) proche du seuil de dépolarisation et qui se caractérise par une grande sensibilité de ces interneurones à de brèves et discrètes stimulations, même d'un petit nombre d'afférences (Zhang & Cragg 2017) (Figure 12). Ces afférences sont essentiellement glutamatergiques corticales ou thalamiques. Les interneurones cholinergiques reçoivent aussi des projections inhibitrices issues des MSNs et dopaminergiques originaires de la substance noire mais ceci, dans une moindre mesure (Apicella 2017).

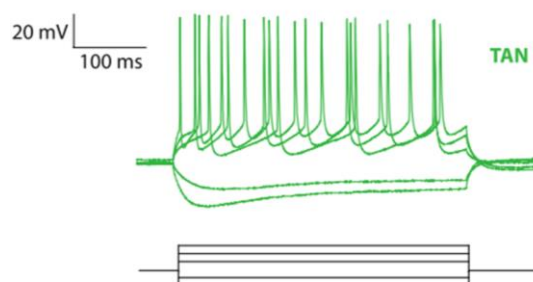


Figure 12 : Enregistrement électrophysiologique, en configuration cellule entière d'un interneurone cholinergique toniquement actif (TAN). Le neurone présente des potentiels d'action suivis d'une profonde hyperpolarisation et des courants induits par l'hyperpolarisation. Adapté de Kreitzer 2009.

Les interneurons cholinergiques participent, via la libération d'acétylcholine, à la modulation de l'activité des MSNs. L'action de l'acétylcholine peut être directe ou indirecte et implique deux types de récepteurs, à savoir les récepteurs nicotiques (nAChR) et les récepteurs muscariniques (mAChR). Les récepteurs nicotiques sont des récepteurs de type canaux ioniques. Ceux-ci exercent une action rapide pouvant induire une dépolarisation directe de la cellule et une augmentation de l'excitabilité. A l'opposé, les récepteurs muscariniques sont des récepteurs couplés à des protéines G, qui exercent donc leur effet à plus longue échelle et dont l'activation peut aboutir à une augmentation ou une diminution de l'excitabilité de la cellule. Il est généralement proposé que les neurones de projection du *striatum* ne possèdent pas de récepteur de type nicotinique et que l'action directe de l'acétylcholine sur les MSNs se fait par l'intermédiaire des mAChR, comme l'on montré des expériences utilisant le carbachol, un agoniste de ces récepteurs, qui augmente l'excitation des MSNs en culture cellulaire ou sur tranche (Lim et al. 2014). Ainsi l'activation du récepteur M1 exprimé par les MSNs induit une augmentation de leur excitabilité intrinsèque (Lv et al. 2017). En plus de cette action directe de l'acétylcholine sur les MSNs, celle-ci peut, comme déjà mentionné, exercer son action de manière indirecte, aboutissant *in fine* à une modification de l'activité des MSNs. Cet effet indirect impliquerait, par exemple, des populations de neurones GABAergiques exprimant les récepteurs nicotiques tels que les interneurons parvalbumine ou encore les interneurons NPY-NGF, classe d'interneurones caractérisée par English et al. (2012). En effet, un courant post-synaptique inhibiteur est induit dans les MSNs, lors de l'activation des neurones cholinergiques par optogénétique, et ce courant est inhibé par des agents bloquant ce type de récepteurs (English et al. 2012;

Faust et al. 2016). Tout aussi récemment, une excitation directe et indirecte des interneurons somatostatine (SST) par l'acétylcholine a également été décrite (Elghaba et al. 2016). Finalement, l'acétylcholine pourrait exercer son effet neuromodulateur et modifier l'activité des MSNs et la sortie striatale en agissant au niveau pré-synaptique sur les terminaisons glutamatergiques (originaires du cortex et du thalamus) et dopaminergiques du *striatum* ce à la fois via des récepteurs nicotiniques et muscariniques (Lv et al. 2017). Au vu des divers effets que l'acétylcholine peut exercer, il semble important de préciser qu'une modification de l'activité des interneurons cholinergiques par leurs différentes afférences pourra entraîner une série de cascades complexes, pouvant donc affecter *in fine* la réponse striatale (Tepper & Bolam 2004; Kreitzer 2009; Lim et al. 2014).

### 2.2.2. Les interneurons GABAergiques du *striatum*

Les interneurons GABAergiques constituent 3 à 4% des neurones du *striatum* et ont été identifiés comme tels pour la première fois en 1983 (Bolam et al. 1983). De plus, les études histochimiques, qui ont directement suivi, ont révélé que les neurones fortement marqués pour l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamate décarboxylase (GAD), ne co-exprimaient pas la substance P ou l'enképhaline, caractéristiques des neurones de projection. Ceci a donc permis de conclure qu'il existait une autre population de neurones GABAergiques qui ne correspondait pas aux neurones de projections épineux.

Des études immunohistochimiques ultérieures ont ensuite permis de subdiviser cette grande famille d'interneurones. En effet, les interneurons GABAergiques sont classiquement subdivisés en trois grandes catégories différentes qui expriment des marqueurs histochimiques différents. Il s'agit des interneurons qui expriment la parvalbumine, des interneurons qui expriment la calrétinine ou des interneurons qui expriment des combinaisons différentes de somatostatine, neuropeptide Y (NPY) et d'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) (Gerfen & Bolam 2017).

#### 2.2.2.1. Les interneurons exprimant la parvalbumine (« Fast Spiking Interneurons » ou FSI)

Une première classe d'interneurones GABAergiques exprime la protéine de liaison au calcium parvalbumine (PV). Les interneurons parvalbumine sont les premiers interneurons

GABAergiques du *striatum* qui ont été caractérisés et ceux-ci constituent la catégorie la plus fréquemment étudiée. Cette population constitue environ 0,7% des neurones du *striatum* dorsal chez le rat et il semble qu'ils soient plus abondants dans la région latérale que dans la région médiane du *striatum* (Tepper et al. 2010). Toutefois, on les retrouve aussi bien dans le compartiment matriciel que dans le compartiment striosomal, leurs prolongements traversant librement la frontière qui sépare ces deux compartiments (Crittenden & Graybiel 2011). Ces interneurons possèdent un soma de taille moyenne (16 à 18  $\mu\text{m}$  de diamètre) et se caractérisent par une arborisation dendritique assez dense et ramifiée. Certains interneurons parvalbumine-positifs présentent un soma plus grand et une arborisation dendritique plus étendue et moins ramifiée suggérant que les interneurons parvalbumine ne constitueraient donc pas un type cellulaire homogène (Tepper et al. 2010).

Sur le plan électrophysiologique, les interneurons parvalbumine se distinguent des autres types d'interneurones. En effet, ils ont la particularité de décharger rapidement lorsque du courant est injecté et cela, avec une fréquence de décharge élevée, pouvant être supérieure à 200 Hz (Figure 13). Ils sont dès lors dénommés « Fast Spiking interneurons » (FS(I)) (Berke 2011). Ces caractéristiques électrophysiologiques sont également observées pour les interneurons PV-positifs du cortex et de l'hippocampe (Freund & Gulyás 1997; Galarreta & Hestrin 2002).

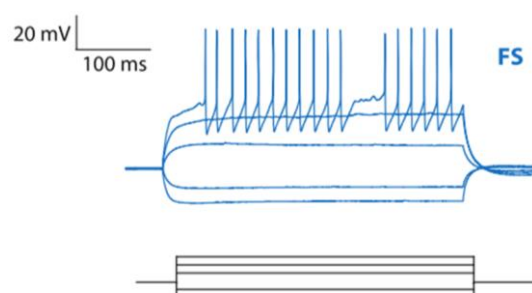


Figure 13 : Enregistrement électrophysiologique, en configuration cellule entière, d'un interneurone parvalbumine de type « Fast Spiking » (FS). Lorsqu'un courant est appliqué, le neurone présente une faible résistance d'entrée et un schéma de décharge rapide. Adapté de Kreitzer 2009.

De plus, des enregistrements électrophysiologiques récents décrivent que les interneurons PV du *striatum* possèdent une différence d'excitabilité intrinsèque selon qu'ils

se trouvent dans la région dorsomédiane ou dorsolatérale et que celle-ci associée à une différence d'arborisation dendritique (Monteiro et al. 2018).

Les afférences excitatrices des FSI sont essentiellement corticales. Les interneurons parvalbumine induisent une puissante inhibition des MSNs, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, lors d'une activité corticale accrue (Berke 2011) et ces interneurons constituent l'une des composantes majeure de l'inhibition striatale (Tepper et al. 2008). Notons également que des observations au microscope électronique ont révélé que les interneurons PV peuvent réaliser des jonctions de type « gap » entre eux. Ces jonctions qui connectent le cytoplasme de deux neurones suggèrent que les interneurons PV peuvent former un réseau et exercer une inhibition synchrone, suite à l'intégration à plus grande échelle d'entrées excitatrices (Fukuda 2009). De plus, des études combinant stimulation optogénétique et enregistrements électrophysiologiques décrivent que les connexions FSI-MSN s'observent entre des neurones se trouvant à proximité les uns des autres et que les interneurons ciblent la région proximale somato-dendritique des MSNs (Straub et al. 2016). Une approche similaire a récemment suggéré le rôle prépondérant de ces interneurons dans l'inhibition des MSNs du DLS par opposition au DMS plutôt sous le contrôle des interneurons SST (Fino et al. 2018).

#### 2.2.2.2. Les interneurons exprimant la calrétinine

Les interneurons positifs pour la calrétinine (CR) représentent 0,5% des neurones du *striatum* dorsal chez le rat et constituent le type majoritaire chez les primates et chez l'Homme, par opposition aux interneurons parvalbumine, type d'interneurons GABAergiques le plus abondant chez le rat (Petryszyn et al. 2018). Les interneurons calrétinine expriment, comme leur nom l'indique, la calrétinine qui est une protéine de liaison au calcium (Rymar et al. 2004). Chez le rat, ce groupe d'interneurons se caractérise par un soma de taille moyenne (12-20  $\mu\text{m}$ ) et possède un petit nombre de dendrites ramifiés de façon très sporadique (Tepper & Bolam 2004). Notons que d'autres caractéristiques ont été observées, aussi bien chez les primates que chez les rongeurs, révélant qu'il y aurait différents types morphologiques d'interneurons calrétinine-positifs (Wu 2000; Rymar et al. 2004; Petryszyn et al. 2018). Pour finir, des études du schéma de distribution de ces neurones chez le rat, les primates, dont l'Homme, ont mis en évidence une répartition selon



un gradient rostro-caudal chez le rat tandis que ce gradient ne s'observe pas chez l'Homme et chez les primates non-humains. Les interneurones calrétinine sont néanmoins plus abondants dans le noyau caudé de l'Homme et des primates non-humains (Rymar et al. 2004).

D'un point de vue physiologique, l'activité électrique de ces interneurones n'a pas encore été bien définie jusqu'à présent et les informations concernant cette population neuronale proviennent essentiellement d'études immunohistochimiques (Petryszyn et al. 2018)

#### 2.2.2.3. Les interneurones exprimant la somatostatine, le Neuropeptide Y et la nNO synthase (« Persistent and Low Threshold Spike » interneurons ou PLTS)

Des études immunocytochimiques ont mis en évidence une population de neurones qui co-exprime la somatostatine (SST), le neuropeptide (NPY ou polypeptide pancréatique aviaire) et l'enzyme oxyde nitrique synthase neuronale (n(NOS)) ou NADPH diaphorase (Vincent et al. 1983; Vincent & Johansson 1983) mais pas la parvalbumine ni l'acétylcholinestérase. Ces observations sont à l'origine de l'identification d'une nouvelle sous-catégorie d'interneurones exprimant ces trois marqueurs (Dimova et al. 1980; Vincent et al. 1983; Kita et al. 1990).

Ces interneurones représentent 0,6 à 0,8% des neurones du *striatum*, des différences pouvant être observées selon le type de marqueurs utilisé (SST vs NPY) (Larsson et al. 2001; Tepper et al. 2010). En effet, des études montrent que ces marqueurs ne sont pas toujours co-exprimés et que différents sous-groupes exprimant un ou plusieurs de ces trois marqueurs peuvent dès lors être identifiés (Gittis et al. 2010; Ibáñez-Sandoval et al. 2011).

Leur nature GABAergique a longtemps été matière à discussion, suite à l'absence d'expression visible de l'ARNm codant pour la glutamate décarboxylase (GAD), l'enzyme de synthèse du GABA (Chesselet & Robbins 1989), ou d'immunomarquage pour GAD<sub>67</sub> ou pour le GABA (Kubota et al. 1993). Des études de microscopie électronique ont mis fin au débat en 2000 (Kubota & Kawaguchi 2000) lorsqu'une immuno-positivité pour le GABA a été mise en évidence dans les terminaisons de ces neurones. Notons qu'une première expérience

réalisée par Vuillet et son équipe (Vuillet et al. 1980) avait déjà suggéré cette hypothèse. En effet, ce groupe a observé qu'un prétraitement des rats avec de la colchicine, une substance bloquant le transport axonal et permettant par conséquent d'accumuler les protéines dans le corps cellulaire, rendait les cellules immunoréactives pour la GAD dans les neurones striataux exprimant le NPY.

Sur le plan morphologique, ces interneurons possèdent un corps cellulaire allant de 9 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et pouvant être rond, polygonal ou fusiforme. Ceux-ci constituent le deuxième groupe le plus grand en termes de taille, après les interneurons cholinergiques. Leur arborisation dendritique est assez simple (3 à 5 dendrites) et leurs dendrites, dépourvus d'épines dendritiques, présentent des renflements plus abondants dans les portions distales du neurone (DiFiglia & Aronin 1982; Tepper et al. 2010). Notons que, malgré le faible niveau de ramification de l'axone, celui-ci est très long et peut atteindre jusqu'à 1 mm (Kawaguchi 1993). Il a même été observé que certains de ces interneurons pouvaient présenter deux axones partant des deux pôles opposés du soma (Tepper et al. 2010).

Les interneurons SST sont présents dans le *striatum* dorsal ainsi que dans le NAc (Beal et al. 1986) et ce avec une distribution similaire entre le DMS et le DLS (Fino et al., 2018). De plus, des études comparatives ont révélé qu'ils étaient plus abondants dans la partie rostrale du *striatum* chez le rat alors qu'aucune différence n'est observée chez le singe ou l'Homme (Wu 2000). Une différence de distribution, selon le compartiment striosomal et matriciel, peut également être observée. En effet, celle-ci se caractérise par une projection des interneurons SST, essentiellement vers la matrice, bien que leur corps cellulaire puisse être localisé dans les deux types de compartiments (Gerfen & Bolam 2017).

Leurs propriétés électrophysiologiques sont bien définies. En effet, les neurones SST sont communément appelé (P)LTS, en référence à leurs décharges à bas seuil et à l'apparition d'un plateau de dépolarisation, qui se maintient de façon prolongée à la fin de l'injection d'un courant dépolarisant ou lors d'un EPSP important. De plus, les neurones présentent une résistance d'entrée élevée (autour de 750  $\text{M}\Omega$ ) lorsque le potentiel est maintenu et que du courant est injecté, un potentiel membranaire de repos relativement dépolarisé (-60 mV), un potentiel d'action de 1.3 ms à mi-hauteur de pic (Tepper et al. 2010;

Ibáñez-Sandoval et al. 2011) et une activité spontanée qui est probablement associée à une libération tonique de neuropeptides (Elghaba et al. 2016) (Figure 14).

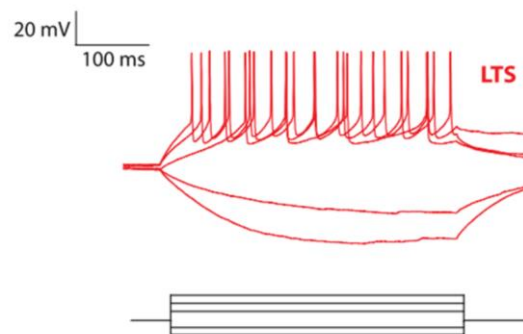


Figure 14 : Enregistrement électrophysiologique, en configuration cellule entière, d'un interneurone de type « Low Threshold Spiking » (LTS). Le neurone présente une haute résistance d'entrée et un plateau qui persiste après la fin de l'injection de courant. Adapté de Kreitzer 2009.

Les interneurons SST reçoivent essentiellement des afférences glutamatergiques du cortex et du *thalamus* (Gittis et al. 2010). Des projections GABAergiques sur les interneurons SST et provenant du *globus pallidus* ont également été décrites ainsi que des connexions cholinergiques et dopaminergiques (Tepper et al. 2010). Ils expriment, entre autres, le récepteur D5 de la dopamine dont l'activation se caractérise par une dépolarisation des PLTS et par une augmentation des décharges. Ces neurones expriment également les récepteurs muscariniques M1 et M2 (Kreitzer 2009).

#### 2.2.2.3.1. *Neuropeptides et enzyme spécifiques*

La somatostatine également nommée « Somatotropin Release Inhibitory Factor » (SRIF), est un peptide cyclique qui peut être composé de 14 ou 28 acides aminés, suite au clivage post-traductionnel d'un précurseur d'une centaine d'acides aminés, la pré-pro-somatostatine (Vécsei & Widerlöv 1990). La forme de 14 acides aminés a été isolée et caractérisée, à partir de l'*hypothalamus* d'ovins, en 1973, par Brazeau et al. (Brazeau et al. 1973), qui a proposé que ce peptide diminue la libération d'hormone de croissance *in vitro* et *in vivo* chez le rat. En effet, il est maintenant avéré que la SST est impliquée dans le système hypothalamo-hypophysaire et que celle-ci inhibe la libération d'hormone de croissance par la glande pituitaire (Reichlin 1983).

En plus de son rôle bien documenté dans le contrôle endocrinien de l'adénohypophyse, les neurones exprimant la SST sont distribués dans de nombreuses structures du système nerveux central tels que le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, les bulbes olfactifs, le *striatum*, ... (Finley et al. 1978; Johansson et al. 1984; Bou Farah et al. 2016; Hu et al. 2017). Les premières études neuropharmacologiques ont mis en évidence que la forme de 14 acides aminés possède des propriétés dépressives sur le système nerveux central (Vécsei & Widerlöv 1990). Dans le cas plus précis du *striatum*, il a été observé que la SST peut par exemple inhiber la libération de GABA par les MSNs lors d'expériences *in vitro* (Lopez-Huerta et al. 2008) ou augmenter, au contraire, celle de dopamine (Hathway et al. 2004) ou d'acétylcholine (Rakovska et al., 2002) *in vivo*.

L'action de la SST est médiée par un ensemble de 5 récepteurs (sst1-5) appartenant à la famille de récepteurs couplés aux protéines G (Hoyer et al. 1995). Ceux-ci sont différemment distribués dans l'ensemble du système nerveux central. Le récepteur sst-3, par exemple, est observé dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, le cervelet ou encore l'*hypothalamus* tandis que le récepteur sst-5, quant à lui, n'a pu être localisé que dans la partie antérieure de l'hypophyse. Ces différentes observations ont pu être faites grâce à une série d'anticorps spécifiques pour chaque sous-type de récepteur, mis au point par l'équipe de Höllt (Schulz et al. 2000).

Le neuropeptide Y (NPY) est un peptide composé de 36 acides aminés, présent en abondance dans le cerveau et appartenant à la famille du même nom, avec le peptide YY et le polypeptide pancréatique. Il est exprimé dans l'ensemble du système nerveux central (cortex, tronc cérébral, hippocampe, *hypothalamus*, amygdale, *thalamus*, ...) ainsi que dans le système nerveux périphérique et dans les cellules de la glande surrénale. Le NPY est connu pour ses fonctions dans le contrôle de la prise de nourriture, du rythme circadien et de l'homéostasie énergétique ainsi que pour son rôle cognitif (White 1993; Reichmann & Holzer 2016).

Le NPY exerce son action par l'intermédiaire de 5 récepteurs : Y1, Y2, Y4, Y5 et y6, bien que le récepteur y6 soit absent chez le rat et non-fonctionnel chez l'Homme. Les récepteurs Y1 et Y2 possèdent une expression plus étendue que les récepteurs Y4 et Y5 (Wolak et al. 2003).

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule gazeuse, qui peut être produite par différents types cellulaires neuronaux ou non et qui peut diffuser sur de longues distances et à travers les membranes. Il est produit par une enzyme de synthèse qui est l'oxyde nitrique synthase. Cette enzyme peut être codée par différents gènes dont la forme neuronale nNOS est exprimée constitutivement et est notamment localisée dans des petites populations de neurones du cervelet, de l'hippocampe, du cortex, des bulbes olfactifs, du *striatum*, du prosencéphale basal et du tronc cérébral ainsi que dans certains noyaux de l'*hypothalamus*, dans la région postérieure de la glande pituitaire et dans la médullaire surrénale. Son activité est  $Ca^{2+}$ /calmoduline dépendante. L'oxyde nitrique peut exercer son action par l'intermédiaire de la voie de signalisation de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qu'il est capable d'activer, induisant des effets biologiques divers et variés (Philippu 2016). L'oxyde nitrique participe, par exemple, à la modulation du flux sanguin (Kawaguchi et al. 1995) et à la plasticité synaptique dans le *striatum* en induisant une dépression à long terme (LTD) des MSNs (Calabresi et al. 1999) ou à une relaxation des muscles lisses dans le système nerveux périphérique (Huang et al. 1993).

#### 2.2.2.3.2. Connexions avec les MSN

Sur le plan histologique, des observations au microscope électronique après marquage immunocytochimique pour le NPY ont permis de mettre en évidence la présence de synapses entre les terminaisons axonales des interneurons SST/NPY/nNOS et le soma ainsi que les dendrites des neurones épineux (Vuillet et al. 1989). De plus, des enregistrements électrophysiologiques réalisés sur des MSNs ont révélé que l'addition de SST dans le milieu baignant les tranches de cerveau en survie avait un effet sur leur activité électrique. Plus particulièrement, en présence de SST, l'amplitude ainsi que la durée de l'AHP sont modifiées, aboutissant *in fine* à une modification temporelle du schéma de décharge.

Des expériences de RT-PCR réalisées sur ces mêmes neurones enregistrés ont d'ailleurs montré que 93% d'entre eux expriment le récepteur sst-2 de la somatostatine (Galarraga et al. 2007). D'autre part, des expériences d'immunofluorescence pour les différents composants de la voie de signalisation de la guanylate cyclase ciblée par le NO, ont révélé leur présence dans les neurones épineux du *striatum* (Ariano 1983). Ces différentes observations peuvent donc, par extrapolation, laisser envisager une connexion

active entre les neurones libérant la SST, le NPY et/ou du NO tels que les interneurons SST/NPY/NOS du *striatum*, et les MSNs.

Cependant, des enregistrements appariés réalisés par Gittis et al. entre des PLTS et des MSNs localisés dans un rayon de 250  $\mu\text{m}$  n'ont révélé qu'un très petit nombre de connexions fonctionnelles (Gittis et al. 2010). En effet, seuls deux évènements synaptiques ont été observés sur les 60 enregistrements effectués (Figure 15), reflétant, d'après les auteurs une présence de projections faibles et/ou très éparses des PLTS sur les MSNs. Ces auteurs concluent que les interneurons SST du *striatum*, de par les neuropeptides qu'ils libèrent, n'induiraient pas une inhibition directe des MSNs mais moduleraient plutôt le schéma spatio-temporel de la transmission synaptique au sein du *striatum* (Gittis et al. 2010).

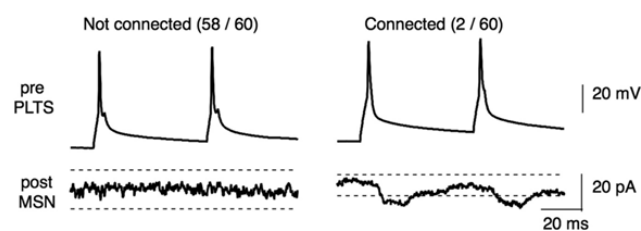


Figure 15 : Etude de connectivité entre un interneurone de type PLTS et un MSN. L'enregistrement apparié de MSNs lors de la stimulation des PLTS ne met pas de connexion fonctionnelle en évidence dans 58 cas des 60 testés. Les lignes pointillées représentent le seuil de détection d'un évènement synaptique. Adapté de Gittis et al. 2010.

Les expériences d'enregistrements appariés réalisées par Ibáñez-Sandoval et al. (2011) ont mené aux mêmes observations d'un petit nombre d'IPSCs induits par l'activation des PLTS dans les MSNs. Par contre, celles-ci ont aussi mis en évidence que certains neurones exprimant le NPY mais possédant, dans ce cas, des caractéristiques électrophysiologiques, morphologiques et neurochimiques différentes de celles classiquement retrouvées parmi les PLTS, pouvaient bien induire des courants inhibiteurs dans les MSNs (de l'ordre de 25 IPSCs sur les 29 enregistrements réalisés). Cette observation est à l'origine de leur proposition d'une nouvelle catégorie d'interneurones striataux exprimant uniquement le neuropeptide NPY : les interneurons NPY-neurogliaform ou NPY-

NGF. En effet, des études de colocalisation par immunofluorescence ont révélé que ces interneurons n'expriment ni la SST ni la NOS et que ceux-ci constituent environ 21% des interneurons exprimant le NPY.

Il faut attendre la publication plus récente de Straub et al. en 2016 pour refaire pencher la balance du côté d'une connexion fonctionnelle entre PLTSs et MSNs. En effet, ces auteurs observent bien des IPSCs dans les MSNs lors de la stimulation lumineuse du *striatum* de souris SST-Cre exprimant le gène Chr2 Cre recombinase-dépendant. Cependant, des expériences de marquage *trans*-synaptique dans des souris D1-Cre, à l'aide de virus de la rage Cre-dépendant mettent en évidence que ces connexions impliquent des interneurons SST localisés en moyenne à 570  $\mu\text{m}$  de leur MSN de départ (Figure 16), distance rendant les IPSCs difficilement mesurables lors des expériences d'enregistrements appariés de Gittis et al. (Gittis et al. 2010). Ceci va également de pair avec l'observation initiale de Kawaguchi et al. qui avait décrit l'axone des PLTSs comme pouvant s'étendre jusqu'à 1 mm (Kawaguchi 1993). Il semble donc que les interneurons SST réalisent bien des connexions fonctionnelles avec les neurones épineux du *striatum* mais que celles-ci impliquent des MSNs relativement éloignés (distance supérieure à 250  $\mu\text{m}$ ). Notons également que cette connexion engage les régions distales des dendrites des MSNs (Straub et al. 2016).

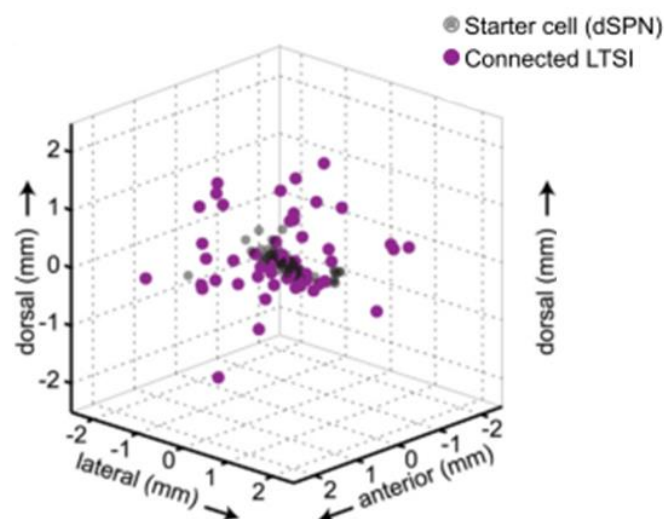


Figure 16 : Représentation 3D de la position des différents neurones striatonigraux (gris) et des interneurons somatostatine connectés (violet). Adapté de Straub et al. 2016.

### 2.2.2.3.3. Les interneurones SST au sein de la circuiterie striatale

Le maintien de la circuiterie striatale apparaît comme essentiel au vu de l'association qui existe entre certaines pathologies et l'altération de celle-ci (voir 2.2.2.5) (Gittis et al., 2010). Il existe deux types de circuits GABAergiques inhibiteurs au sein du *striatum*. Le premier circuit est composé des MSNs et de leurs interconnexions et constitue une inhibition de type « feedback ». Le second est constitué de différents types d'interneurones GABAergiques qui reçoivent des afférences excitatrices du cortex et qui exercent une inhibition monosynaptique sur les MSNs : il s'agit de l'inhibition de type « feedforward ». La majorité de l'inhibition GABAergique est médiée par ce deuxième type de circuit (Tepper et al. 2008). De par ses afférences corticales issues de la couche V du cortex et de par la libération de GABA, les interneurones SST participent à cette inhibition de type « feedforward ». En effet, en plus d'exercer une inhibition directe des MSNs, affectant la sortie striatale et l'activité des neurones de la SNr, ceux-ci contrôlent l'intégration de l'information corticale par les MSNs et favorisent ainsi la sommation de stimuli corticaux lorsque les MSNs sont à l'état de repos. Ceci est observé plus spécifiquement dans le DMS où les interneurones SST y présentent une excitabilité accrue par rapport à la région du DLS (Fino et al. 2018).

A ce rôle dans l'inhibition striatale et dans l'intégration de la réponse corticale, s'ajoute un rôle tout récemment mis en évidence dans l'intégration de l'information thalamique. Plus précisément, les interneurones SST semblent également constituer une voie d'entrée du système thalamocortical. En effet, une inhibition de ceux-ci est observée après stimulation optogénétique du noyau parafasciculaire du *thalamus* et ce par une inhibition disynaptique via les interneurones TH (voir 2.2.2.4). Ceci pourrait ainsi mettre les interneurones SST au centre de la réponse des noyaux de la base aux stimuli liés à l'attention (Assous et al., 2017).

Finalement, comme déjà mentionné, les interneurones SST semblent posséder une connexion mutuelle avec les interneurones cholinergiques (Elghaba et al., 2016) dans lesquels ils peuvent induire des courants post-synaptiques inhibiteurs (Straub et al., 2016).



#### 2.2.2.4. Les autres types d'interneurones GABAergiques

A ces trois sous-types d'interneurones GABAergiques classiquement reconnus peuvent s'ajouter d'autres types d'interneurones plus tardivement identifiés, peu nombreux et bien moins caractérisés. Il s'agit, par exemple, de neurones exprimant l'enzyme de synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase (TH) ou encore la cholécystokinine (CCK) ou le peptide vasoactif intestinal (VIP).

Les interneurones TH-positifs ont été initialement observés chez le singe et un petit nombre de ces neurones a également été décrit dans le *striatum* de rat. Ce nombre est augmenté après dénervation dopaminergique (Tashiro et al. 1989; Ünal et al. 2015).

En plus d'exprimer l'une des enzymes clés dans la synthèse de la dopamine, leur nature GABAergique a été confirmée par l'expression de l'enzyme de synthèse du GABA et le déclenchement de potentiels post-synaptiques inhibiteurs dépendant des récepteurs GABA dans les MSNs (Ibanez-Sandoval et al. 2010). La synthèse de dopamine par ces neurones par contre est fortement remise en cause (Tepper et al. 2010; Xenias et al. 2015).

Le développement de lignées de souris transgéniques TH-eGFP (Gong et al. 2003) a permis de cibler ces neurones et d'en étudier la morphologie et la physiologie. Ainsi, quatre types de neurones TH-positifs, différant par leurs propriétés électrophysiologiques ont été caractérisés. De plus, il a été observé que le type I, II et III peuvent induire une dépolarisation des MSNs lors d'enregistrements appariés et que les MSNs peuvent, eux-mêmes induire une dépolarisation des neurones du type I. Ce phénomène est d'ailleurs l'unique cas démontré d'une afférence inhibitrice des MSNs sur une population d'interneurones GABAergiques du *striatum* (Ibanez-Sandoval et al. 2010).

Quant aux neurones exprimant la CCK ou le VIP, ceux-ci ont été observés dans le *striatum* de rat ou de chat (pour la CCK) mais leurs propriétés physiologiques restent encore inconnues (Muñoz-Manchado et al. 2018).

#### 2.2.2.5. Implication des interneurons striataux dans les différentes pathologies des noyaux de la base

Comme décrit ci-dessus, malgré leur petit nombre, les interneurons du *striatum* sont capables de moduler substantiellement la réponse striatale. L'implication des interneurons du *striatum* dans les différents dysfonctionnements du système des ganglions de la base est donc à considérer, et quelques études illustrent cette possible implication. Ainsi, il a pu être observé que les *striatum* de patients atteints de la maladie d'Huntington présentent, en plus d'une mort principale des MSNs, une réduction du nombre d'interneurons PV et une modification de la fonctionnalité et de la connectivité des interneurons cholinergiques et SST (Reiner & Deng 2018) ; que les patients atteints du syndrome de Gilles de la Tourette présentent une réduction de la densité des interneurons parvalbumine-positifs et cholinergiques dans le *striatum* (Kataoka et al. 2010) ou encore que la stimulation *in vivo* de la connexion excitatrice de l'amygdale basolatérale sur les FSIs du NAc favorise l'auto-administration de cocaïne (Yu et al. 2017). Sur base de ces observations, Gittis (2012) propose de considérer ces interneurons PV comme cible thérapeutique dans certains troubles du mouvement, illustrant l'importance que l'on peut porter aux interneurons inhibiteurs. La maladie de Parkinson, la chorée de Huntington, les dystonies ou encore le syndrome de Gilles de la Tourette résultent d'un déséquilibre des voies directe et indirecte. Ainsi, la suractivation de la voie indirecte favorise des troubles caractérisés par une réponse motrice insuffisante comme observé dans la maladie de Parkinson tandis que la suractivation – absolue ou relative – de la voie directe, résulte en des troubles caractérisés par une réponse motrice excessive comme dans la maladie d'Huntington, le syndrome de Gilles de la Tourette ou les dystonies. Il faut noter qu'une répression des interneurons PV, qui ciblent préférentiellement les neurones de projection de la voie directe, déclenche un phénotype de type dystonique via une levée d'inhibition (Gittis et al. 2011). Ces interneurons pourraient donc être une cible de choix et permettre un contrôle de la balance entre les voies directe et indirecte (Gittis 2012). Au-delà de leur caractérisation fonctionnelle qui fait l'objet du présent travail, des analyses similaires de l'intervention des interneurons SST ou PLTS dans différents modèles de pathologies apporteraient indubitablement de nouvelles données et pourraient identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

# CHAPITRE 2 :

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

Comme décrit dans l'introduction, le *striatum* est composé de deux grandes populations de neurones : les neurones de projection épineux, qui composent la majorité de la structure, et les interneurones. Les interneurones du *striatum* participent à la modulation de l'activité des neurones épineux selon un *modus operandi* propre à chaque population. Les interneurones exprimant la somatostatine, le NPY et la nNOS constituent l'une de ces populations d'interneurones et n'ont encore été que brièvement caractérisés d'un point de vue fonctionnel. Des données récentes de la littérature mettent néanmoins déjà en évidence que les interneurones somatostatine peuvent induire des courants post-synaptiques inhibiteurs dans les neurones de projection.

L'objectif de ce travail de thèse est donc de caractériser la fonction des interneurones somatostatine du *striatum* en utilisant une approche basée sur la perte de fonction. Cette étude fonctionnelle sera réalisée sur un modèle de souris ayant subi une ablation spécifique et ciblée des neurones somatostatine dans le *striatum*. A l'aide de ce modèle, que nous avons développé, trois types d'analyses vont être réalisées et constituer trois parties distinctes du travail.

La première partie va s'intéresser aux fonctions de ces interneurones à l'échelle cellulaire et ce, dans le contexte de leurs connexions avec les neurones de projection du *striatum*. Plus particulièrement, nous allons étudier l'effet de la perte de ces interneurones dans le *striatum*, sur l'activité électrique des neurones de projection. Ceci sera réalisé au moyen de la technique de patch-clamp.

Le second chapitre étudiera également, à l'échelle cellulaire et dans ce même contexte de connexion interneurone-MSN, l'effet de la perte des interneurones somatostatine du *striatum* sur la morphologie des neurones de projection et ce, au moyen d'une reconstruction en trois dimensions des MSNs.

Enfin, la dernière partie va considérer le rôle des interneurones, à une échelle systémique, en étudiant leur rôle sur le comportement de la souris. Ceci sera réalisé à l'aide d'une batterie de tests comportementaux ciblant les comportements dans lesquels les noyaux de la base, et plus spécifiquement le *striatum*, sont impliqués.

L'ensemble de ces résultats devrait nous permettre de préciser les fonctions des interneurones somatostatine du *striatum*.

# CHAPITRE 3 :

## MATÉRIEL ET METHODES

## 1. Composition des différentes solutions utilisées

Avertin 1.25% :

- 2,2,2-tribromoéthanol (Sigma-Aldrich) : 44 mM
- 2-méthyl-2-butanol (Sigma-Aldrich) : 230 mM
- H<sub>2</sub>O

Celle-ci se compose d'un mélange de 2-méthyl-2-butanol et de 2,2,2-tribromoéthanol, chauffé dans un premier temps au bain marie durant 3 heures (50°C), puis placé dans un incubateur à 37°C pour la nuit. Ce mélange est ensuite dilué 40x dans de la solution saline 0.9%, filtré à 0.2µm, et mis à pH 5. Celui-ci peut être conservé durant 1 mois à 4°C.

Cocaïne :

- Chlorohydrate de cocaïne (1, 5 ou 20mg/kg) (Hôpital Erasme)
- Solution saline 0.9%

Gel d'agarose 1.5%:

- 1.5% d'agarose (Sigma-Aldrich)
- Bromure d'éthidium (Sigma-Aldrich) : 1.3 µg/ml
- Tampon TAE 1x

L'agarose est mélangé au tampon TAE et le tout est chauffé au micro-onde jusqu'à dissolution de celui-ci. Une fois le mélange légèrement refroidi, le bromure d'éthidium est ajouté.

Gel de séparation 10% :

- Tris-HCl (pH 8.8) : 0.38 M
- 8% Acrylamide/Bis-acrylamide (Sigma-Aldrich)
- 0.1% SDS (Sigma-Aldrich)
- 0.1% APS (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Sigma-Aldrich)

Gel de concentration :

- Tris-HCl (pH 6.8) : 0.68 M
- 5% Acrylamide/Bis-acrylamide (Sigma-Aldrich)
- 0.1% SDS (Sigma-Aldrich)

- 0.1% APS (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Sigma-Aldrich)

Halopéridol :

- Halopéridol (0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg ou 0.3 mg/kg) (Janssen Cilag)
- Solution saline 0.9%

Hoechst :

- 1/5000 d'Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific #H3570)
- PBS 0.01 M

Liquide céphalorachidien artificiel (aCSF, pH 7,2-7,4, 330 mOsm/L) :

- NaCl (Merck) : 126 mM
- KCl (Merck) : 2.5 mM
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) : 1.25 mM
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) : 1 mM
- CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) : 2 mM
- NaHCO<sub>3</sub> (Merck) : 26 mM
- D-Glucose (MP Biomedicals) : 10 mM

NHS 10%-PBS-TritonX 0.1%-azide 0.1% :

- 10% de NHS (ThermoFisher Scientific)
- 0.1% PBS-Triton-X-100 (Sigma-Aldrich)
- 0.1% de sodium azide (Sigma-Aldrich)

Paraformaldéhyde 4% :

- 4% de Paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich)
- NaOH (Merck) : 2 M
- Tampon phosphate (pH 7.4)
- H<sub>2</sub>O

Le PAF est chauffé à 60°C dans une petite quantité d'eau. Lorsque la solution est à bonne température, quelques gouttes de NaOH 2M sont ajoutées jusqu'à dissolution du



paraformaldéhyde et le pH est rééquilibré à l'aide de tampon phosphate. La solution est alors mise au trait et conservée à 4°C.

PBS 0.01 M (pH : 7.4):

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck) : 22.67 mM
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck) : 80.3 mM
- NaCl (Merck) : 154 mM
- $\text{H}_2\text{O}$

PBS-azide 0.1% (pH: 7.4):

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck) : 22.67 mM
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck) : 80.3 mM
- NaCl (Merck) : 154 mM
- $\text{N}_3\text{Na}$  (Sigma-Aldrich) : 15.4 mM
- $\text{H}_2\text{O}$

PBS-TritonX 0.1% :

- 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich)
- PBS : 0.01 M

SKF-38393 :

- ( $\pm$ )-SKF-38393 hydrochloride (10mg/kg) (Sigma-Aldrich)
- Solution saline 0.9%

Solutions d'amplification :

	Rosa26-LoxP-stop-LoxP- iDTR	SST-Cre
Eau MilliQ	64%	60%
Tampon 10x (Qiagen)	10%	10%
dNTP 10 mM (Invitrogen, Life Technologies)	2%	2%
Amorces 5 $\mu$ M (Eurogentec)	4%	4% de chaque amorce
Taq polymerase (production maison)	4%	4%
ADN	12%	12%

Tableau 1 : Tableau récapitulatif reprenant la composition des différentes solutions d'amplification selon le transgène à identifier.

Solution de blocage :

- 50% PBS-Tween 0.1%
- 50% Odyssey Blocking Buffer (Li-COR)

Solution de coupe (Patch clamp) :

- Chlorure de choline (Sigma-Aldrich) : 140 mM
- KCl (Merck) : 2.5 mM
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) : 1.25 mM
- NaHCO<sub>3</sub> (Merck) : 25 mM
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) : 7 mM
- CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) : 0.5 mM
- D-glucose (MP Biomedicals) : 14 mM

Solution de lyse :

- Tris-HCl (pH 7.5) : 50 mM
- NaCl (Merck) : 150 mM
- EDTA (Merck) : 1 mM
- 1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich)

- 0.1% SDS (Sigma-Aldrich)
- Halt protease and phosphatase inhibitors cocktail (ThermoFisher Scientific)

Solution de révélation pour Western Blot :

- PBS 0.01 M
- 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich)
- streptavidine-fluorophore

Solution intracellulaire (pH 7.2-7.3) :

- $K_2SO_4$  (Sigma-Aldrich) : 125 mM
- $MgCl_2$  (Sigma-Aldrich) : 4 mM
- $CaCl_2$  (Sigma-Aldrich) : 0.022 mM
- HEPES (Sigma-Aldrich) : 10 mM
- EGTA (Sigma-Aldrich) : 0,1 mM
- Phosphocreatine (Sigma-Aldrich) : 5 mM
- $Mg_2ATP$  (Sigma-Aldrich) : 4 mM
- $Na_2GTP$  (Sigma-Aldrich) : 0,5 mM
- 0.5% biocytine (Sigma-Aldrich)

Solution saline :

- NaCl (Merck) : 154 mM
- $H_2O$

Tampon Laemmli :

- HCl (Sigma-Aldrich) (pH 6.8) : 25 mM
- DTT (Sigma-Aldrich) : 50 mM
- 1% SDS (Sigma-Aldrich)
- 2.5% glycérol (Sigma-Aldrich)
- 0.1% bleu de bromophénol (Sigma-Aldrich)

Tampon de lyse A (pH 12):

- NaOH (Merck) : 25 mM
- EDTA (Merck) : 0.2 mM

Tampon de lyse B (pH 5):

- TrisHCl (Merck) : 40 mM
- H<sub>2</sub>O

Tampon de migration :

- Trizma Base (Sigma-Aldrich) : 0.25 M
- Glycine (Sigma-Aldrich) : 1.92 M
- 1% SDS (Sigma-Aldrich)

Tampon phosphate (pH 7.4):

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) : 22.67 mM
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) : 80.3 mM
- H<sub>2</sub>O

Tampon TAE 1x :

- Tris (Merck) : 40 mM
- Acide acétique glacial 100% (Merck) : 19 mM
- EDTA (Merck) : 1 mM
- H<sub>2</sub>O

Tris-HCl (pH 6.8) :

- Trizma-Base (Sigma-Aldrich) : 1 M
- H<sub>2</sub>O

Tris-HCl (pH 8.8) :

- Trizma-Base (Sigma-Aldrich) : 1,5 M
- H<sub>2</sub>O

## 2. Lignées transgéniques

### 2.1 Lignée SST-Cre

La lignée SST-Cre (B6 ; Sst<sup>tmt2.1(cre)Zjh</sup>/J (SN 013044)) a été obtenue auprès du « Jackson Laboratory ». Celle-ci permet l'expression spécifique dans les populations cellulaires, dont certains interneurons exprimant la somatostatine, et a été mise au point à l'aide de la technique de « knock-in » (Taniguchi et al. 2011). Plus précisément, la séquence codante pour la Cre recombinase a directement été insérée à la suite du codon stop du gène codant pour la somatostatine. L'expression de la Cre recombinase ne se fait donc que lorsque le promoteur de la somatostatine est actif et que la somatostatine est exprimée. Ceci permet une reconstitution de l'environnement spatio-temporel de l'expression de la somatostatine, qui rendra optimale l'expression de la Cre recombinase au sein de la lignée SST-Cre.

Pratiquement, un vecteur a été mis au point à partir d'un chromosome bactérien artificiel (BAC) et ce, de manière à contenir une séquence IRES, la Cre recombinase, une séquence poly-A ainsi qu'une cassette néomycine flanquée de sites frt. Cette construction a ensuite été intégrée dans la région 3'UTR du *locus* de la somatostatine au niveau du chromosome 16, après électroporation en cellules souches embryonnaires (ES). Les cellules sélectionnées, ayant intégrées le transgène, ont alors été injectées dans des blastocystes et les mâles chimériques obtenus ont été croisés avec des femelles d'une souche congénique C57BL/6 Actin-FLPe, afin d'obtenir une descendance débarrassée de la cassette néomycine. Des croisements, pendant deux générations avec des souris C57BL/6 ou entre elles, ont finalement permis d'éliminer le transgène FLPe.

Notons qu'un croisement de la lignée SST-Cre avec des souris rapportrices R26R CAG-boosted EGFP (RCE) a mis en évidence une expression de la GFP dans les cellules de Martinotti du cortex, les interneurons des *stratum Oriens, Lacunosum et Moleculare* de l'hippocampe mais également dans d'autres régions du cerveau telles que le bulbe olfactif, le *striatum*, le noyau réticulaire du *thalamus* le *colliculus* supérieur, différents noyaux du tronc cérébral ainsi que dans le cervelet (bandes de cellules de Purkinje) (Figure 17) (Taniguchi et al. 2011).

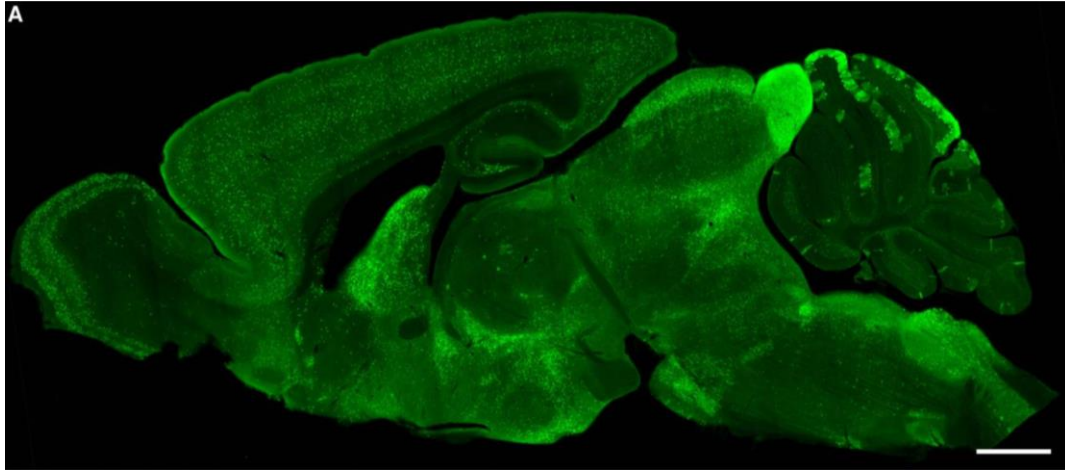


Figure 17: Immunomarkage GFP sur une coupe sagittale d'un cerveau adulte de souris SST-ires-cre::RCE-LoxP. Echelle : 1mm. Adapté de Taniguchi et al. 2011.

---

## 2.2 Lignée iDTR

La lignée Rosa26-LoxP-stop-LoxP-iDTR a été produite par Buch et al. (Buch et al. 2005). Cette lignée se caractérise par l'expression inducible du récepteur simien de la toxine diphtérique. En effet, en présence d'enzyme Cre recombinase, la cassette stop, flanquée de deux sites LoxP, bloquant l'expression du récepteur, est alors excisée, rendant le système sensible à la toxine diphtérique (DT). Notons que le gène codant pour le récepteur se trouve sous le contrôle du promoteur Rosa26, un promoteur ubiquitaire fort, mais que l'expression du récepteur sera confinée aux cellules exprimant la Cre recombinase. Ces cellules, une fois la cassette stop excisée par la présence de la Cre recombinase permettant l'expression du récepteur, seront sujettes à un mécanisme d'apoptose cellulaire en présence de toxine diphtérique (Figure 18), toxine qui bloque la synthèse protéique en inactivant le facteur d'élongation EF2 (Honjo et al. 1971). Cette approche a été utilisée avec succès pour identifier le rôle spécifique de sous-populations de MSNs (Durieux et al. 2009; Durieux et al. 2011).

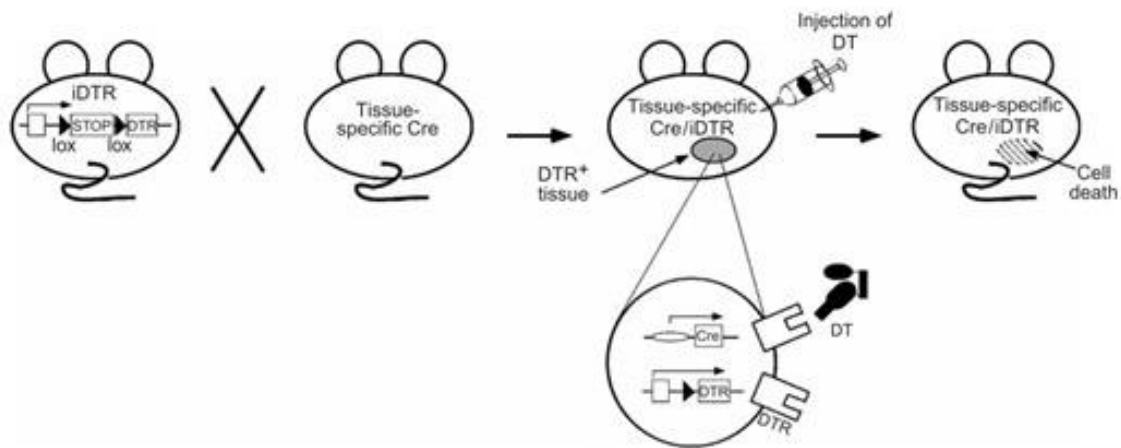


Figure 18 : Schéma général du système iDTR, où la lignée iDTR est croisée avec une lignée exprimant la Cre recombinase dans une population cellulaire voulue, permettant d'éliminer la cassette stop qui bloque l'expression du récepteur simien à la toxine diphtérique. Les cellules, qui expriment alors le récepteur, deviennent susceptibles de mort cellulaire lors de l'injection de toxine diphtérique. Adapté de Buch et al. 2005.

### 2.3. Croisements

Afin de réaliser des ablations spécifiques des interneurons somatostatine dans le *striatum*, des souris SST-Cre hétérozygotes ont été croisées avec des souris de la lignée iDTR homozygote. Ainsi, ces croisements ont permis d'obtenir 50% de souris  $Cre^{+/-} iDTR^{+/-}$ , où l'injection de toxine diphtérique entraînera la mort cellulaire des interneurons somatostatine et 50% de souris  $Cre^{-/-} iDTR^{+/-}$  qui serviront de contrôle.

Notons que des croisements parallèles avec des souris C57BL/6J ont été réalisés afin de maintenir les différentes lignées sur ce fond génétique.

## 3. Procédure générale

### 3.1 Hébergement

Les différentes expériences ont été réalisées sur des souris rassemblées par groupe de 2-4, dans des cages de type conventionnel. Les cages ont été disposées dans une pièce dont la température est fixée à 21.5°C, l'éclairage automatisé (12h luminosité/12h obscurité) et le taux d'humidité maintenu à 50%, tandis que les souris ont reçu de l'eau et de la nourriture *ad libitum*.

### 3.2 Anesthésie

Lors des injections stéréotaxiques et des perfusions transcardiaques, l'anesthésie a été réalisée à l'aide d'Avertin 1.25%, injecté par voie intrapéritonéale (20µl/g). La composition des différentes solutions, qui ont été utilisées au cours des expériences, est décrite dans le chapitre 1 : Composition des différentes solutions.

### 3.3 Suivi

Suite aux injections stéréotaxiques, les plaies ont été désinfectées à l'aide d'isobétadine et les souris placées sur une plaque chauffante, le temps du réveil. L'état de santé de ces souris a alors été suivi quotidiennement et les tests comportementaux ont été entamés deux semaines *minimum* après l'injection.

### 3.4 Aspects éthiques

L'ensemble des procédures chirurgicales et des tests comportementaux ont été effectués selon les directives du comité institutionnel de soin des animaux et ont été approuvés par le comité d'éthique du Pôle Santé de l'ULB.

## 4. Génotypage

Le génotypage des souris, permettant d'observer la présence d'un transgène, a été réalisé à partir d'une biopsie de queue (1-2 mm), chez des souris âgées de 3 semaines: les fragments obtenus ont été traités afin d'en extraire l'ADN. Pour ce faire, deux tampons ont été successivement utilisés : 100 µl d'un tampon de lyse A basique (voir composition des solutions), chauffé à 95°C durant 25 minutes et permettant la lyse cellulaire, suivi de 100 µl d'un tampon B, permettant de neutraliser le pH. Les tubes ont alors été vortexés et centrifugés (VWR MicroStar 17) durant 10 minutes à 16810 g, afin de précipiter les protéines et les débris cellulaires, tandis que l'ADN extrait, présent dans le surnageant, a été prélevé en vue d'une PCR.

Selon les transgènes recherchés, les amorces suivantes ont été utilisées :



	Amorces	Température d'hybridation	Nombre de cycles	Poids moléculaire des bandes
<b>SST :: Cre</b>	Sens : 5' TGG TTT GTC CAA ACT CAT CAA 3' (allèle mutant) ou 5' TCT GAA AGA CTT GCG TTT GG 3' (allèle WT)	56°C	35	WT à 465 pb et mutant à 200 pb
	Anti-sens : 5' GGG CCA GGA GTT AAG GAA GA 3'			
<b>Rosa26 :: LoxP-stop- LoxP-iDTR</b>	Sens : 5' AAA-GTC-GCT-CTG- AGT-TGT-TAT 3'	57°C	39	WT à 650 pb et mutant à 340 pb
	Anti-sens : 5' GCG-AAG-AGT- TTG-TCC-TCA-ACC 3' (allèle mutant) ou 5' GGA-GCG-GGA- GAA- ATG-GAT-ATG 3' (allèle WT)			

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes séquences oligonucléotidiques utilisées, de la température d'hybridation des amorces ainsi que du nombre de cycles d'amplification et du poids moléculaire des différents fragments.

Les produits de l'amplification, résultats d'un mélange de 3 µl de surnageant contenant l'ADN génomique, de tampon 10x, de dNTPs, de Taq Polymérase, d'eau purifiée milliQ et des amorces spécifiques au transgène recherché, ont été déposés sur gel d'agarose en vue d'une électrophorèse. Le gel est lui-même composé de 2% d'agarose, de tampon tris-acétate EDTA (TAE) 1x et d'1.3 µg/ml de bromure d'éthidium et, après chargement des échantillons, un courant de 150V a été appliqué durant environ 30 minutes. La migration des différents fragments d'ADN a alors été observée sous lumière ultraviolette et comparée à un marqueur de poids moléculaire Hyperladder II (Bioline).

## 5. Chirurgies

### 5.1 Stéréotaxie

Afin de cibler spécifiquement une région du cerveau, des injections stéréotaxiques, à l'aide d'un cadre stéréotaxique, ont été réalisées (Cetin et al. 2006). Les différentes coordonnées d'injection ont été établies à partir d'un atlas stéréotaxique du cerveau, reprenant les positions selon les 3 dimensions des différentes régions du cerveau d'une souris C57BL/6 âgée de 3 mois (Franklin & Paxinos, 2007). Dans un premier temps, dans le but de s'assurer que ces injections sont correctement réalisées et permettent bien de cibler le *striatum*, des contrôles ont été opérés, à l'aide d'un système de billes fluorescentes observables au microscope.

Les souris ont donc tout d'abord été anesthésiées et disposées sur un cadre de stéréotaxie (KOPF instruments). Pour ce faire, la tête de la souris est immobilisée grâce à un système de barres d'oreilles placées dans son conduit auditif externe ainsi qu'à l'aide d'une barre d'insertion des incisives supérieures. Une incision d'environ 1 cm de long est ensuite réalisée au niveau du scalp de façon à visualiser le crâne. Le point de coordonnées (0,0,0) est alors positionné au niveau de la bregma correspondant à la jonction des sutures coronales et sagittales du crâne. À partir de ce point de repère, un trou est foré dans le crâne de la souris, à l'aide d'une fraise dentaire aux coordonnées médio-latérale et rostro-caudale correspondant à la structure qui doit être ciblée. Cet orifice permet le passage d'une aiguille d'injection de 34 G (Phymep), elle-même connectée à un tuyau en polyéthylène (Intramedic), qui relie une seringue Hamilton de 10 µl placée dans un pousse-seringue (KDS) assurant l'injection d'un volume déterminé. Notons que la seringue Hamilton, ainsi qu'une large partie du tuyau raccordée à la seringue, sont remplies de tampon phosphate salin (PBS) 0.01 M. L'aiguille, ainsi que le début du tube raccordé à celle-ci sont quant à eux remplis d'une solution de toxine diphtérique (Sigma-Aldrich), diluée au préalable dans du PBS 0.01 M et séparée du PBS par une bulle d'air.

Afin de cibler le *striatum*, l'ensemble des souris utilisées, lors des expériences de patch clamp, de reconstructions morphologiques et de comportement, ont donc reçu au préalable des injections de 0.2 µl de toxine diphtérique (5 pg/µl), injectée à la vitesse de 0.1 µl/minute aux coordonnées : 0.900 antérieur, ± 1.800 latéral et -4.000 ventral. Quinze

minutes après l'injection, l'aiguille a lentement été extraite du cerveau afin de limiter la diffusion de la toxine hors de la zone ciblée et une suture du scalp a finalement été effectuée.

Notons que l'établissement de ce protocole a nécessité des mises au point préalables et que plusieurs sites d'injection et différentes concentrations de la toxine diphtérique a été testé lors de cette mise en point :

Coordonnées	Nombre de sites par hémisphère et volume d'injection	Concentration de la DT (pg/ $\mu$ l)	Vitesse d'injection
Ant : 0.5 ; Lat : 1.8 ; Vent : -3.5 Ant : 1.2 ; Lat : 1.5 ; Vent : -4.5	2 x 0.5 $\mu$ l	100	0.1 $\mu$ l/minute
Ant : 0.9 ; Lat : 1.8 ; Vent : -4	1 x 0.5 $\mu$ l	100	0.1 $\mu$ l/minute
Ant : 0.9 ; Lat : 1.8 ; Vent : -4	1 x 0.2 $\mu$ l	100	0.1 $\mu$ l/minute
Ant : 0.9 ; Lat : 1.8 ; Vent : -4	1 x 0.2 $\mu$ l	16.66	0.1 $\mu$ l/minute
Ant : 0.9 ; Lat : 1.8 ; Vent : -4	1 x 0.2 $\mu$ l	11.11	0.1 $\mu$ l/minute
Ant : 0.9 ; Lat : 1.8 ; Vent : -4	1 x 0.2 $\mu$ l	5.55	0.1 $\mu$ l/minute
Ant : 0.9 ; Lat : 1.8 ; Vent : -4	1 x 0.2 $\mu$ l	5	0.1 $\mu$ l/minute
Ant : 0.9 ; Lat : 1.8 ; Vent : -4	1 x 0.2 $\mu$ l	2.5	0.1 $\mu$ l/minute

Tableau 3 : Tableau reprenant l'ensemble des coordonnées, nombre de sites d'injection, volumes, concentrations et vitesses d'injection de la toxine diphtérique qui ont été testés.

Un marquage pour la somatostatine (comme détaillé au point 6) a ensuite été réalisé, sur les tranches de cerveaux de ces différentes souris (n=1-2), et le nombre de cellules positives pour la somatostatine a été comptabilisé, dans une région délimitée du cortex et du *striatum*. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à ceux des souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (n=2). Le protocole présentant le plus petit nombre de cellules somatostatine-positives dans le *striatum* et le plus grand nombre de cellule positives dans le cortex (Figure 19) a finalement été choisi et une validation de ce protocole sur un plus grand nombre de souris (8 SST<sup>-/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup> vs 8 SST<sup>+/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup>) a été réalisé (voir Résultats).

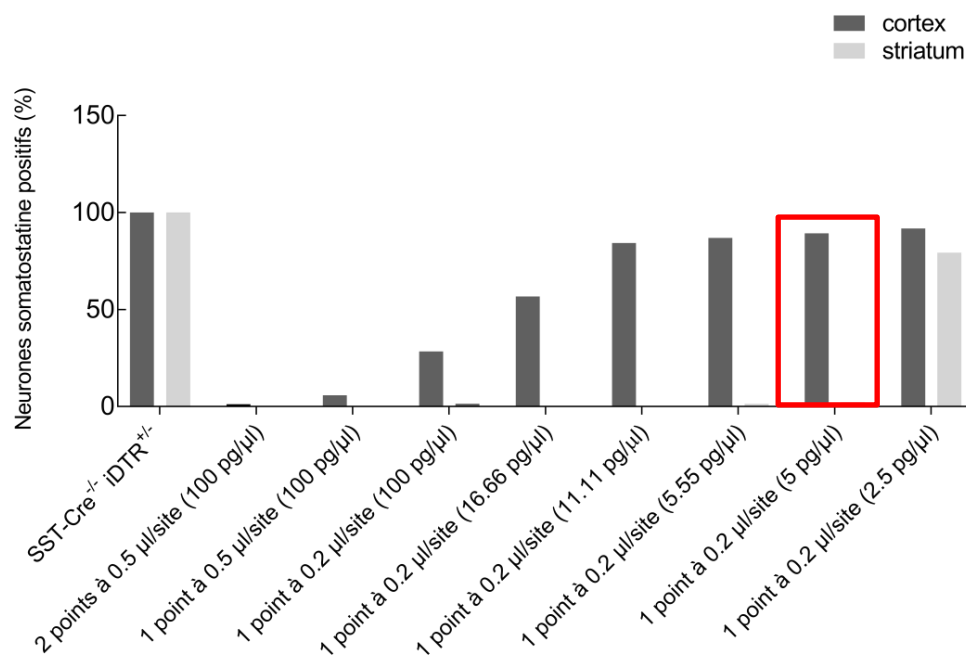


Figure 19: Graphe reprenant le pourcentage de cellules positives pour la somatostatine dans le cortex et le *striatum* de souris injectées avec différents volumes ou concentrations de toxine diphtérique. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux souris contrôles SST-Cre<sup>-/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup>. Le protocole encadré en rouge est celui qui présente le plus petit nombre de cellules SST-positives dans le *striatum* et le plus grand nombre de cellules SST-positives dans le cortex et est celui qui a été choisi.

## 5.2 Perfusion transcardiaque

En vue de réaliser des marquages immunohistochimiques, les souris ont subi une fixation, par perfusion transcardiaque, de paraformaldéhyde (PAF) 4%. Pour ce faire, celles-ci ont tout d'abord été profondément anesthésiées à l'aide d'Avertin 1.25%, injecté par voie intrapéritonéale. Lorsque les animaux ont été considérés comme insensibles (observé par une pression au niveau des pattes et de la queue), ils ont été immobilisés et incisés tandis

que le diaphragme a été découpé, les côtes sectionnées et les vaisseaux clampés. Une aiguille à perfusion (Microflex) a alors été placée dans le ventricule gauche, afin de faire circuler 20 ml de PBS 0.01 M, suivis de 20 ml de PAF 4%, et l'oreillette droite a été percée, permettant l'élimination du sang. La circulation des différentes solutions a été assurée par une pompe péristaltique Watson Marlow 205S (Watson-Marlow Pumps Group). Une fois les tissus fixés (observé par rigidification de l'individu), les animaux ont été décapités, les cerveaux ont été prélevés (par découpe de la boîte crânienne) et post-fixés. Le PAF 4% a finalement été remplacé, après une nuit, par du PBS-azide 0.1%, jusqu'à réalisation des coupes de cerveau.

## 6. Immunofluorescence

Afin d'évaluer l'ablation striatale des interneurons somatostatine de chaque souris utilisée dans les différentes expériences, un immunomarquage, permettant la détection de la somatostatine, a été réalisé sur des coupes de cerveau au niveau du *striatum*. De plus, des marquages pour DARPP-32, ChAT, PV ou CR ont été réalisés afin de confirmer la spécificité de l'ablation.

### 6.1 Coupes flottantes de cerveau

Les coupes coronales de cerveaux ont été réalisées au niveau du télencéphale à l'aide d'un vibratome VT 1000s (Leica). Pour ce faire, la région d'intérêt a été coupée et collée sur une platine, grâce à de la colle cyanoacrylate (Best Klebstoffe), et la platine a été disposée dans une cuve contenant du PBS 0.01 M. Après calibrage de l'appareil, des coupes de 40  $\mu$ m ont été récupérées et disposées dans des plaques multi-puits (Greiner bio-one, Cellstar) contenant du PBS-azide 0.1%. Les plaques ont été conservées à 4°C.

### 6.2 Immunomarquage

Les coupes ont tout d'abord été perméabilisées dans un bain de PBS-TritonX 0.1% durant 30 minutes tandis qu'un second bain de 30 minutes, dans du NHS 10%-TritonX 0.1%-azide 0.1%, a permis de limiter la fixation non spécifique de l'anticorps primaire.

Les coupes ont ensuite été placées pour la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaire. L'excès d'anticorps primaire a été éliminé le lendemain, dans deux bains successifs

de PBS (2 x 5 min), et la solution d'anticorps secondaires, directement couplés à un fluorochrome AlexaFluor488 ou AlexaFluor594, a été ajoutée pendant 1h15 à température ambiante. L'excès d'anticorps secondaires a alors été lavé dans un bain de PBS (5 min) et les coupes ont finalement été mises dans une solution de Hoechst durant 10 min et lavées dans un dernier bain de PBS (5 min), avant d'être montées sur lame. Les différentes coupes ont été montées sur des lames porte-objet Menzel-Gläser (Thermo Scientific), en présence de FluorSave Reagent (Calbiochem, Millipore), et recouvertes d'une lame couvre-objet d'épaisseur 1.5 (VWR International). Les différents anticorps primaires et secondaires utilisés sont repris dans le tableau ci-dessous et notons que les anticorps primaires ont été dilués dans du PBS-TritonX 0.1% tandis que les anticorps secondaires ont été dilués dans du PBS.

Type d'anticorps	Cible	Firme	Dilution utilisée
Primaire (IgG de rat)	SST	Merck (MAB354)	1/200
Primaire (IgG de souris)	DARPP-32	Santa Cruz (sc-271111)	1/200
Primaire (IgG de chèvre)	ChAT	Merck (AB144)	1/200
Primaire (IgG de chèvre)	PV	Swant (PVG-213)	1/500
Primaire (IgG de lapin)	CR	Swant (7697)	1/500
Secondaire (IgG d'âne)	rat	Jackson ImmunoResearch (712-545-153)	1/700
Secondaire (IgG d'âne)	souris	Jackson ImmunoResearch (715-545-151)	1/200
Secondaire (IgG d'âne)	chèvre	Jackson ImmunoResearch (705-585-147)	1/200
Secondaire (IgG d'âne)	lapin	Jackson ImmunoResearch (711-545-152)	1/200

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages

### 6.3 Acquisition et traitement des données

Les résultats de l'immunofluorescence ont été observés à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss AxioImager Z1 (Zeiss) dont les objectifs EC Plan Neofluar 10x/0.3 et Plan Achromat 20x/0.8 ont été utilisés. L'excitation lumineuse a été produite par une lampe HBO de 105W et les filtres #49 (Emission BP 445/50), #38 HE (Emission BP 525/50) ou #43 HE (Emission BP 605/70) ont été employés afin de visualiser les fluorochromes bleus, verts ou rouges. L'acquisition des images a été réalisée grâce à l'AxioCam Mrm (Zeiss), sous forme de fichiers 3 x 12 bit RGB proprietary.zvi (Zeiss), et les fichiers ont été traités par le programme AxioVision (4.9.1) (Zeiss). Le comptage des cellules marquées a été réalisé grâce au logiciel d'analyse d'images ImageJ (N.I.H., Bethesda, MA).

## 7. Western blot

### 7.1. Préparation des échantillons

Des expériences de Western blot ont été réalisées, sur des échantillons provenant de structures cérébrales de souris SST-Cre<sup>+</sup> ou <sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>, ayant reçu des injections saline ou de cocaïne (20 mg/kg) durant 3 jours successifs. Pour ce faire, le *striatum* dorsal et le *striatum* ventral sont prélevés sur des tranches de cerveau de 400 µm d'épaisseur coupées au vibratome et issues de cerveaux d'animaux anesthésiés à l'halothane (Sigma-Aldrich), sacrifiés par dislocation cervicale et immergés dans une solution d'aCSF maintenue à 4°C. L'ensemble des échantillons est congelé dans de l'azote liquide et ceux-ci peuvent être conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

En vue de l'extraction protéique, les différents échantillons sont décongelés sur glace et 250 µl de solution de lyse y sont ajoutés. Les tubes sont ensuite passés à l'homogénéisateur R50D (CAT) pendant plusieurs secondes afin de broyer les structures tissulaires. Ce broyage est poursuivi par aspiration et pression successives, à l'aide d'une seringue pourvue d'une aiguille 21G, dans un premier temps, et d'une seringue montée avec une aiguille 25G, dans un second temps. Ceci est réalisé jusqu'à l'obtention d'un homogénat. Les tubes sont finalement centrifugés (Sigma 3K15 Bioblock Scientific) à 22245 g (4°C), pendant 15 minutes après incubation de 30 minutes sur glace, et le surnageant est prélevé en vue des expériences de Western blot.

## *7.2. Dosage protéique*

Afin de déterminer la quantité de protéines contenues dans les différents échantillons, un dosage à l'aide de réactif de Bradford (Bradford protein assay, Biorad) est effectué selon le protocole proposé par le fabricant. Ce dosage est réalisé en parallèle avec différentes dilutions de protéines BSA de concentrations connues, permettant d'établir une courbe standard et de déterminer la concentration protéique de nos échantillons.

## *7.3. Electrophorèse sur gel*

Avant la migration des protéines sur gel de polyacrylamide, les protéines sont tout d'abord dénaturées dans du tampon Laemmli durant 10 minutes à 70°C. La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire, est ensuite réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10%. Ce gel de séparation est lui-même surmonté d'un gel de concentration et chaque échantillon composé d'eau, de 10 µl de tampon Laemmli et de protéine à hauteur de 100 µg, est chargé dans chaque puit. Un marqueur de poids moléculaire (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) est chargé en parallèle et la migration est réalisée à un courant de 40 mA. La migration est effectuée dans un tampon de migration.

## *7.4. Transfert protéique et révélation des protéines*

Le transfert des protéines, sur membrane de nitrocellulose en vue de la révélation, est réalisé à l'aide du système Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad), selon le protocole décrit par le fabricant.

## *7.5. Révélation*

Avant toute détection protéique, les membranes de nitrocellulose sont incubées avec une solution de blocage durant 1h. Celles-ci peuvent ensuite être incubées à 4°C durant toute la nuit, avec les anticorps primaires voulus, dilués dans cette même solution de blocage. Suite à cette incubation, les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes à l'aide de PBST et ré-incubées à température ambiante 1h durant, avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dilué dans la solution de blocage. Les membranes subissent 3 lavages de



5 minutes dans du PBST et un dernier lavage de 5 minutes dans du PBS, avant d'être séchées entre deux papiers absorbants. La révélation est effectuée à l'aide du dispositif Azure Biosystems c400 et les quantifications sont réalisées grâce au logiciel Image Studio Lite (Bio-Rad). Les différents anticorps primaires et secondaires utilisés sont repris dans le Tableau 5.

Type d'anticorps	Cible	Firme	Dilution utilisée
Primaire (IgG de lapin)	GAPDH	Cell Signaling Technology (2118)	1/1000
Primaire (IgG de lapin)	DAT	Abcam (184451)	1/1000
Primaire (IgG de rat)	D1	Sigma-Aldrich (D187)	1/250
Secondaire (IgG d'âne)	lapin	LI-COR (P/N 925-68073)	1/10000
Secondaire (IgG d'âne)	rat	LI-COR (P/N 925-32219)	1/10000

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés lors des expériences de Western blot

## 8. Enregistrements électrophysiologiques

L'électrophysiologie consiste en l'étude des propriétés électriques des cellules. Celles-ci dépendent essentiellement des propriétés électriques des membranes cellulaires, dépendantes elles-mêmes des propriétés des protéines (canaux ioniques et transporteurs) et des lipides qui la composent. Ces protéines et lipides sont à l'origine d'une différence de potentiel électrique entre le compartiment intra- et extracellulaire (The Axon Guide, 3<sup>rd</sup> edition, 2012).

Des modifications de ce potentiel électrique et des courants électriques à travers les membranes plasmiques peuvent être mesurées à l'aide de la technique de patch clamp. En effet, cette technique permet d'étudier les propriétés biologiques des membranes, en créant un contact hermétique entre celles-ci et une micropipette en verre qui contient une électrode Ag/AgCl (World Precision Instrument).

Deux types d'enregistrements électrophysiologiques sont possibles. Le premier consiste à imposer le potentiel membranaire à une valeur définie (« voltage clamp ») et

permet de mesurer les courants électriques qui traversent la membrane. Le second consiste à imposer le courant (« current clamp »). Dans ce cas, la fixation du courant permet d'observer les variations du potentiel de membrane.

### *8.1. Préparation des tranches de cerveau*

Les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés sur des tranches de cerveaux en survie. Plusieurs groupes d'animaux ont été utilisés, des souris ayant subi une ablation des interneurons somatostatine dans le *striatum* et leurs contrôles, ainsi que des souris porteuses de cette lésion, ayant été traitées ou non de manière chronique à la cocaïne (3 jours d'injections successifs de 20 mg/kg). Les animaux sont anesthésiés à l'halothane (Sigma-Aldrich) et sacrifiés par dislocation cervicale. Le cerveau a rapidement été récupéré et collé sur une platine de vibratome avec de la colle cyanoacrylate. Des tranches épaisses de 220  $\mu\text{m}$  ont été découpées à l'aide du vibratome VT 1000s après que le cerveau ait été immergé dans une solution de coupe maintenue à 4°C. Les tranches ont ensuite été placées, pour un minimum d'une heure, dans une chambre d'incubation contenant un liquide céphalorachidien artificiel maintenu à 34°C et ce, afin de récupérer une activité métabolique normale. Il est important de noter qu'au cours de la préparation des tranches, les différentes solutions utilisées ont été oxygénées en permanence à l'aide d'un mélange de 95% d'O<sub>2</sub> et de 5% de CO<sub>2</sub> et ce, afin d'éviter tout phénomène d'hypoxie.

### *8.2. Enregistrements électrophysiologiques*

Afin de réaliser les enregistrements électrophysiologiques, chaque tranche de cerveau est transférée dans une chambre contenant une solution d'aCSF oxygénée en continu (~1.5mL/min). Une caméra (iXon+, Andor Technology) associée au poste d'enregistrement permet d'observer la tranche avec le grossissement 5x (objectif 5x/0.15 EC PlanNeofluar, Zeiss) du microscope Axio Examiner A1 (Zeiss) tandis que les cellules sont examinées au grossissement 63x (objectif à 63x /0.8W, Zeiss).

Les différents enregistrements réalisés ont été obtenus en configuration « cellule entière », signifiant que le contenu du cytoplasme cellulaire est en continuité avec la solution présente dans la micropipette. Cette micropipette en verre borosilicate de 1 $\mu\text{m}$  de diamètre (Hilgenberg) (résistance de 4-6 M $\Omega$ ) obtenue par étirement d'un capillaire de 1.5 mm de

diamètre à l'aide d'une tireuse verticale (PIP 5, HEKA) est fixée à un micromanipulateur (LN-Mini 25, Luigs & Neumann) et contient, en plus de la solution intracellulaire, une électrode Ag/AgCl connectée à un amplificateur EPC-10 (Molecular Devices), dont le signal est lui-même enregistré par le logiciel Patchmaster (HEKA) tournant sur un OS X iMac. La pointe de la micropipette est déposée au niveau de la membrane plasmique et ce alors qu'une pression positive est exercée dans la pipette afin d'éviter qu'elle ne se bouche. Lorsque la pointe de la pipette est en contact avec la membrane plasmique, une légère pression négative permet d'établir un contact étroit hermétique entre la membrane et celle-ci. Il s'agit du « seal ». Une seconde forte et brève pression négative permet finalement de rompre la partie de la membrane située juste sous la pointe de la micropipette et permet la dialyse rapide du milieu intracellulaire par le contenu de la pipette. Après 2 minutes, la configuration « cellule entière » est atteinte et les enregistrements peuvent commencer. Le signal pour les enregistrements en voltage imposé ont été filtrés à 3kHz et digitalisés à 20 kHz tandis qu'en courant imposé, ceux-ci ont été filtrés à 3 kHz et digitalisés à 10 kHz et ce au moyen d'un filtre passe-bas de Bessel 8 pôles.

### *8.3. Analyse des propriétés passives de la membrane et de l'excitabilité intrinsèque*

L'étude de la capacité membranaire (capacitance) a été réalisée en condition de voltage imposé. Un potentiel de -80 mV, potentiel semblable au potentiel membranaire de repos des neurones du *striatum*, a été imposé et un saut de potentiel de -10 mV a ensuite été appliqué. Ce saut hyperpolarisant induit un courant qui va être analysé afin d'extraire les paramètres de capacitance.

La capacitance est obtenue par l'analyse du pic de courant transitoire observé lors du saut de potentiel. Plus précisément, celui-ci correspond au courant capacitif, la capacité étant définie comme la quantité de charge électrique  $Q$  accumulée par un condensateur, à savoir la membrane plasmique dans notre cas. Lors de ce saut de potentiel, le courant transitoire capacitif est intégré pour obtenir la valeur de  $Q$  et est divisé par la différence de potentiel pour obtenir cette valeur de capacité.

Notons que les résultats obtenus devront être considéré avec prudence car la mesure de la capacitance sous voltage imposé sous-entend que les neurones sont électriquement

compacts et qu'il y a isopotentialité, ceci pouvant entraîner une sous-estimation de la mesure (Breneman et al., 2009).

Le potentiel membranaire de repos et l'excitabilité intrinsèque des neurones sont étudiés en condition de courant imposé. Ainsi, le potentiel membranaire de repos est tout d'abord mesuré à courant nul tandis que des courants d'intensité croissante (par saut de 20 pA toutes les 4s) sont ensuite appliqués, après une première imposition de courant pour amener le potentiel membranaire à -80mV. Ces courants ont pour but d'induire une dépolarisation cellulaire et de déclencher des potentiels d'action à partir desquels différents paramètres sont extraits.

Ainsi, la rhéobase correspond à la quantité de courant à injecter pour voir apparaître le premier potentiel d'action, tandis que le coefficient d'adaptation correspond au rapport entre les trois premiers intervalles inter-événements (« inter-spike interval », ISI) et les trois derniers ISI du quatrième créneau de courant, reflétant la capacité d'adaptation de décharge de la cellule.

Les différents paramètres associés à la forme des potentiels d'action sont extraits, à partir des valeurs observées sur le quatrième potentiel d'action du quatrième créneau de courant, qui suit celui auquel on a observé le premier potentiel d'action (rhéobase). Sur ce potentiel d'action sont extraits : 1) le potentiel seuil : le seuil de potentiel nécessaire pour voir apparaître un potentiel d'action et qui correspond à la valeur de potentiel pour laquelle la dérivée du potentiel en fonction du temps ( $dV/dt$ ) est égale à 5V/s 2) l'amplitude du potentiel d'action calculée à partir du potentiel seuil 3) l'amplitude du potentiel au point le plus hyperpolarisé (« After Hyperpolarization », AHP), également calculée à partir du potentiel seuil 4) la durée du potentiel d'action définie comme la largeur de l'approximation gaussienne du pic à mi-hauteur (Figure 20) et 5) les vitesses de dépolarisation (pente maximale de dépolarisation) et de repolarisation (pente maximale de repolarisation), correspondant aux dérivées de la trace du potentiel d'action par rapport au temps ( $dV/dt$ ). Ces différentes analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel IgorPro 6.3 (Wavemetrics).

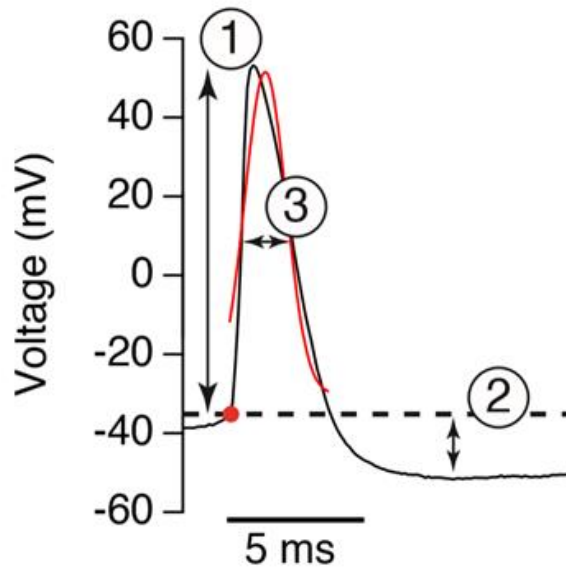


Figure 20 : Potentiel d'action enregistré lors d'un courant imposé. 1) L'amplitude du potentiel d'action correspond à la différence entre la valeur maximale du pic (le potentiel maximal) et le potentiel seuil (point rouge). 2) L'amplitude de l'AHP est mesurée comme la différence entre la valeur minimale atteinte lors de la phase d'hyperpolarisation et le potentiel seuil. 3) la durée du potentiel d'action correspond à la largeur de l'approximation gaussienne du pic à mi-hauteur. Adapté de la thèse de Jean-François De Backer, 2015.

Finalement, la courbe d'excitabilité peut être tracée en représentant la fréquence de décharge des potentiels d'action (qui correspond au nombre de potentiels d'action divisé par la durée entre le premier et le dernier potentiel d'action) en fonction de l'intensité de courant injecté.

Lors des enregistrements électrophysiologiques réalisés sur les souris ayant reçu une dose journalière de 20 mg/kg de cocaïne 3 jours durant, l'effet de 5  $\mu$ M de dopamine au milieu aCSF 15 minutes après l'ajout a également été étudié. L'ensemble des résultats électrophysiologiques ont été obtenus par Daniel Rial.

## 9. Analyse de la morphologie neuronale

La morphologie des neurones enregistrés par la technique de patch clamp a été examinée en parallèle. Pour ce faire, de la biocytine a été ajoutée à la solution intracellulaire de la micropipette. De cette manière, les neurones enregistrés ont pu être reconstruits en trois dimensions par microscopie confocale après fixation et révélation de la biocytine.

### *9.1. Fixation et révélation des neurones enregistrés*

Lorsque l'enregistrement électrophysiologique est achevé, la micropipette est délicatement détachée de la surface cellulaire et la tranche de cerveau est placée, pour la nuit, dans une solution de PAF 4%. La tranche est ensuite rincée au PBS et les membranes des cellules sont perméabilisées grâce à une incubation de 2h dans une solution de PBS-TritonX 0.1%. La biocytine est révélée à l'aide d'une solution contenant de la streptavidine, couplée à un fluorochrome AlexaFluor 488 (2h), et la tranche est montée sur lame à l'aide de milieu FluorSave Reagent, après un dernier bain (10 minutes) de Hoescht, celui-ci permettant le marquage des noyaux cellulaires.

### *9.2. Acquisition au microscope confocal*

Les différentes lames montées, comme décrit au paragraphe précédent, ont ensuite été observées au grossissement 40x (objectif à huile LD C Apochromat 40x/1.2) du microscope confocal LSM 510 (Zeiss) et les neurones marqués ont été imagés à l'aide du logiciel Zen (Zeiss). L'obtention d'une image tridimensionnelle a été permise par l'acquisition de sections optiques sériées (Z-stacks) réalisées tous les 0.45  $\mu\text{m}$  alors que la détection de la biocytine marquée à l'aide du fluorophore AlexaFluor488 a été permise par un filtre laissant passer les longueurs d'onde de 505 à 550 nm après excitation par un laser Argon (488 nm).

### *9.3. Déconvolution*

Des zones floues sur les pourtours des structures fluorescentes suite à la déformation de la lumière traversant le tissu peuvent apparaître lors de l'acquisition au microscope confocal et peuvent être corrigées par déconvolution à l'aide du logiciel Huygens Professional (Scientific Volume Imaging). Ce programme utilise un algorithme itératif (« Classic Maximum Likelihood Estimation »), qui permet d'inverser la distorsion optique, en calculant pour chaque pixel la probabilité statistique de l'origine précise du photon émis par la source fluorescente. Ceci permet, par conséquent, d'améliorer la résolution de l'image et la visualisation de petites structures telles que les épines dendritiques. L'algorithme du logiciel a donc été appliqué sur l'ensemble des images acquises lors de ce travail, avant l'analyse des différents paramètres morphologiques à l'aide du logiciel Imaris (Bitplane).

#### 9.4. Analyse des paramètres morphologiques

Les différents paramètres morphologiques, tels que l'arborisation dendritique et la densité des épines dendritiques, ont été étudiés par l'intermédiaire du logiciel Imaris (Bitplane). En effet, ce logiciel possède une fonction permettant une reconstruction semi-automatique, sur base des points d'intensité maximale, des filaments dendritiques et ce, à partir d'un centre qui peut être défini manuellement au niveau du soma du neurone. La détection des épines peut elle aussi être réalisée par le logiciel. Notons que celle-ci peut être corrigée manuellement au besoin.

Les différents paramètres tels que la longueur, le volume, l'aire, le nombre total d'épines etc., sont ensuite extraits grâce à l'onglet statistique du logiciel. La densité des épines proximales (épines à une distance radiale inférieure à 50  $\mu\text{m}$  du centre du soma) et distales (épines à une distance radiale supérieure à 50  $\mu\text{m}$  du centre du soma) ont été obtenues, en faisant le rapport du nombre d'épines proximales ou distales par la longueur des segments dendritiques correspondants (respectivement de part et d'autre de ces 50  $\mu\text{m}$ ). Le volume et l'aire du soma ont été mesurés à l'aide d'une fonction d'Imaris, permettant la reconstruction semi-automatique de surfaces à partir d'une région d'intérêt délimitée manuellement autour du soma et dont le seuil de détection est ajusté par l'utilisateur, afin de correspondre, tant que possible, à la surface du soma.

## 10. Etudes de comportements

Des études de comportements ont été réalisées sur des mâles SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> ou SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>, âgés de 3 à 6 mois, ayant subi des injections de toxine diphtérique dans le *striatum*.

### 10.1. Comportements moteurs

#### 10.1.1. Test de champ ouvert

Le test de champ ouvert («openfield test») permet d'évaluer différents paramètres tels que l'activité locomotrice spontanée d'un animal ainsi que sa volonté d'explorer son environnement et ce, de manière quantitative. Pour ce faire, l'animal est placé dans un espace délimité par quatre murs (arène) et filmé tout au long de son parcours (Figure 21).

Dans ce cas précis, chaque animal a été disposé dans une arène (40 x 40 cm ; 30 cm de hauteur) dont les murs sont gris et le fond blanc. Ces arènes ont été fermées par un couvercle en plexiglas transparent tandis qu'une caméra a été disposée au-dessus d'un ensemble de 4 arènes. La caméra est connectée au système de « tracking » Ethovision XT (Noldus Information Technology) qui permet, sur base du contraste entre le fond blanc de l'arène et la souris, de déterminer la distance totale parcourue par celle-ci. Chaque souris a alors été filmée durant 60 minutes et ce, durant 3 jours consécutifs. Les souris ont toujours été disposées dans la même arène, possédant une luminosité établie à 15 Lux. Le protocole a été adapté de (Hall & Ballachey 1932).

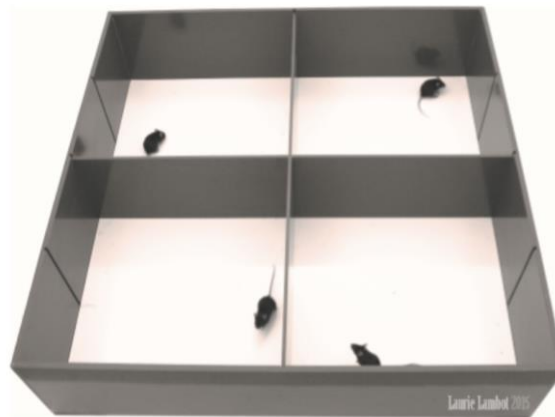


Figure 21: Photographie d'un dispositif d'openfield subdivisé en 4 arènes. Adapté de Laurie Lambot 2015.

---

### 10.1.2. Test de rotarod accélérant

Le test de rotarod (Dunham & Miya 1957) est constitué d'une roue tournant à vitesse constante ou croissante, permettant d'évaluer la coordination motrice ainsi que la capacité d'apprentissage moteur d'un animal, basé sur la volonté de celui-ci à rester sur la roue afin de ne pas tomber (Bearzatto et al., 2005). Le dispositif est composé d'une roue de 3 cm de diamètre séparé en 5 lignes de 5 cm (Ugo-Basile) (Figure 22). Un premier jour d'entraînement a permis aux souris de se familiariser avec le dispositif. Pour ce faire, les souris ont été placées sur la roue tournant à une vitesse constante de 4 rpm et ce, jusqu'à ce qu'elles y restent 60 secondes consécutives. Ce jour d'entraînement a alors été suivi de 5 jours de test. Au cours d'une journée de test, chaque souris a été soumise à 4 essais successifs séparés d'une heure d'intervalle. Au cours d'un essai, la roue passe



progressivement d'une vitesse de 4 rpm à 40 rpm et le moment de la chute est mesuré. En l'absence de chute, le dispositif est arrêté après 300 secondes afin d'éviter l'épuisement des animaux.



Figure 22 : Photographie d'un dispositif de rotarod accélérant. Adapté de Laurie Lambot 2015.

---

### 10.1.3. Single-pellet Reaching Task

Le « single-pellet reaching task » est un test permettant également d'étudier l'apprentissage moteur, en se basant sur la capacité d'une souris à atteindre et récupérer un granule sucré placé à un endroit précis avec leur patte avant dominante (Chen et al. 2014). Cette patte dominante est tout d'abord déterminée grâce à une phase de « mise en place » tandis que l'apprentissage moteur en lui-même est étudié durant la phase d'entraînement.

Afin de motiver les souris à attraper ces granules sucrés, les souris sont placées en restriction alimentaire 10 jours avant le début du test et ce, de manière à leur faire atteindre 90% de leur poids de départ. Pour ce faire, celles-ci reçoivent quotidiennement 0.1 g de nourriture par g de poids corporel. La restriction est maintenue durant toute la durée du test.

Les premiers jours de test consistent en l'acclimatation de la souris au dispositif et en la détermination de la latéralité de la souris. Plus précisément, le premier jour, les souris sont placées deux par deux durant 20 minutes dans le dispositif et ce, en présence d'une vingtaine de granules par souris. Le dispositif est composé d'une chambre en plexiglas

transparent de 20 cm de haut, 15 cm de profondeur et de 8,5 cm de large, dont la face étroite contient 3 fentes verticales de 0.5 cm de large et 13 cm de long dont l'une, centrale, est du côté du dispositif qui servira à la phase de « mise en place » tandis que les deux autres, latérales, sont placées du côté du dispositif qui servira à la phase d'entraînement (Figure 23). Au cours du deuxième jour, les souris sont placées individuellement en présence des granules sucrés. Les derniers jours (variable selon le temps nécessaire à la détermination de la latéralité) de la phase de « mise en place » consistent finalement à déterminer la patte avant dominante. Pour ce faire, la chambre est placée, fente unique vers le bas, et des granules sucrés sont disposés sur un petit plateau positionné du côté extérieur de la fente. Les souris sont alors placées dans la chambre et si celles-ci sont suffisamment intéressées par les granules, elles tenteront de les atteindre dans le distributeur, en passant leur patte avant à travers la fente. La phase de « mise en place » s'achève pour une souris lorsque celle-ci a 1) tenté par 20 fois d'atteindre un granule et ce, en moins de 20 minutes et 2), lorsque 70% de ces tentatives ont été réalisées avec la même patte avant. Les souris ayant nécessité plus d'une semaine pour atteindre cet objectif ont été écartées.

La phase de « mise en place » achevée, les souris passent finalement à la phase d'entraînement. Durant cette phase, la chambre est placée avec les deux fentes vers le bas et un granule est disposé dans un des petits orifices creusés à 0.3 cm des bord les plus longs et à 2.4 cm des bords les plus larges d'une petite plateforme de 8.5 cm de long, 4.4 cm de large et de 0.9 cm de hauteur, elle-même disposée du côté extérieur des fentes. Le choix de l'orifice de gauche ou de droite dépend de la patte dominante de la souris. Une souris est alors placée individuellement dans la chambre et le nombre de succès, de chutes du granule et d'échecs sont comptés selon que la souris a 1) atteint le granule et placé celui-ci directement dans sa bouche 2) atteint le granule mais l'a laissé tomber avant qu'il atteigne sa bouche ou 3) n'a pas atteint le granule ou l'a délogé de la plateforme. Une souris achève une journée d'entraînement lorsqu'elle réalise 30 tentatives avec sa patte dominante ou après 20 minutes. La souris est alors replacée dans sa cage et nourrie avec la quantité de nourriture qui lui a été attribuée selon son poids. Cette phase d'entraînement est répétée sur 8 jours et le taux de succès, ainsi que la vitesse de succès quotidien, sont mesurés sur cette même période de temps.

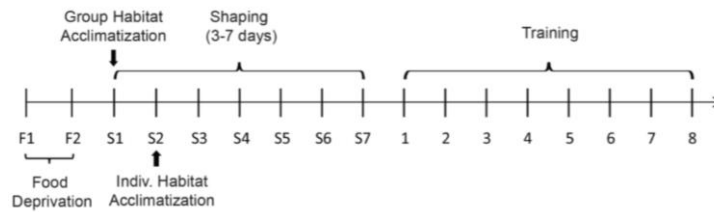


Figure 23 : Ligne du temps des différentes étapes prenant cours au long du test de « single-pellet reaching task » et captures vidéo des étapes d'habituation, de mise en place (« shaping ») et d'entraînement (« training »). Adapté de Chen et al. 2014.

## 10.2. Comportements modélisant l'anxiété ou la dépression

### 10.2.1. Test de préférence au saccharose

Le test de préférence au saccharose (« sucrose preference test ») permet d'étudier l'anhédonie chez la souris, qui correspond à la perte d'intérêt pour toute activité (Der-Avakian & Markou 2012) telle qu'on peut l'observer chez les patients déprimés. Cette perte d'intérêt peut se caractériser par une réduction de la préférence pour une solution sucrée lorsque la souris est mise en présence d'eau et d'une solution de saccharose 2% (Svenningsson et al., 2006). Pour ce faire, les souris sont tout d'abord isolées et placées en présence d'une solution de saccharose 1% pendant 48h tandis que toute boisson est retirée durant les 19 heures suivantes. Deux biberons, l'un contenant de l'eau et l'autre une solution de saccharose 2%, sont ensuite placés dans la cage et la quantité consommée après 1h, de chacune des deux boissons, est mesurée. Ces mesures sont réalisées en pesant les bouteilles avant et après le test. Les quantités d'eau, de saccharose et de liquide total consommés, sont exprimées en grammes et normalisées par le poids de la souris. La préférence pour le saccharose est, quant à elle, calculée en divisant la quantité de saccharose consommée par la quantité totale de liquide consommée. Notons que des souris

contrôles présenteront un intérêt naturel marqué pour la solution sucrée et que l'anhédonie se traduira donc par une réduction de préférence pour le saccharose.

### 10.2.2. Test de nage forcée

Le test de nage forcée (« Forced Swimming Test », FST) est un test permettant, à l'origine, d'étudier l'effet antidépressif potentiel de nouveaux composés lors d'essais précliniques. Celui-ci, ainsi que le test de suspension par la queue (« Tail Suspension Test », TST), ont été décrits comme pouvant également être utilisés pour modéliser la résignation chez les rongeurs. En effet, ce paramètre constitue l'un des symptômes caractéristiques d'un état dépressif chez l'Homme. Ces deux tests se basent donc sur l'étude de l'immobilité induite par l'exposition d'une souris à une situation dont elle ne peut s'échapper et reflètent dès lors sa résignation à cette situation aversive (Porsolt et al. 1977; Cryan et al. 2002).

Plus particulièrement, dans le test de nage forcée, la souris est placée dans un bêcher rempli d'eau (23°C) dont elle ne peut s'extirper (13 cm de diamètre et 24 cm de hauteur avec de l'eau montant jusqu'à 12 cm) (Figure 24). L'immobilité, définie comme l'absence de tout mouvement à l'exception de ceux permettant de maintenir la tête hors de l'eau, est alors mesurée sur une période de 6 minutes. Le protocole est adapté de Porsolt et al. (1977).

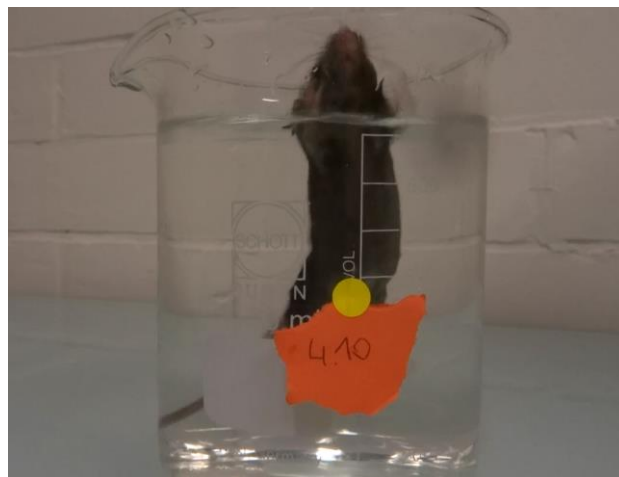


Figure 24 : Capture vidéo prise lors d'un test de nage forcée.

### 10.2.3. Test de suspension par la queue

Le second test, déjà mentionné, correspond au test de suspension par la queue. Celui-ci est, tout comme le test de nage forcée, utilisé afin d'étudier la résignation chez le rongeur et se base sur ce même principe de mesure d'immobilité. Dans ce cas-ci, la souris est pendue, par la queue, à une barre de 0.5 cm de diamètre positionnée à 35 cm du sol (Figure 25) et ce, à l'aide d'un ruban adhésif disposé à 2 cm de l'extrémité de sa queue. Le temps passé immobile est mesuré sur une période de 6 minutes. Adapté de (Steru et al. 1985).



Figure 25 : Capture vidéo prise lors d'un test de suspension par la queue.

### 10.2.4. Elevated Plus Maze

Afin de décrire le niveau d'anxiété chez la souris, un test d'« Elevated Plus Maze » a été réalisé (Pellow et al. 1985). Ce test évalue les risques que la souris est prête à prendre afin d'explorer les bras ouverts d'un dispositif surélevé à 40 cm au-dessus du sol (Figure 26). Le dispositif est constitué d'un ensemble de 4 bras de 30 cm de long disposés en croix dont les 2 bras ouverts et les 2 bras fermés se font face. Les 4 bras se rejoignent au niveau d'une petite plateforme centrale de 7 cm de large. Les murs des bras fermés (17 cm de hauteur) sont composés de plexiglas gris tandis que le sol du dispositif est de couleur blanche et que les bras ouverts possèdent des bords de 5 mm de hauteur (Horii & Kawaguchi 2015). Le dispositif est placé dans une pièce où la luminosité a été établie à 15 Lux. Au cours du test, les souris sont disposées sur la plateforme centrale du dispositif face aux bras ouverts. Le

temps passé dans chacun des bras, ainsi que le nombre d'entrées dans chaque bras et la prise de risque correspondant au passage du museau dans les bras ouverts, est mesuré manuellement au cours d'un enregistrement de 5 minutes. Le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts ou le pourcentage du nombre d'entrées dans les bras ouverts est calculé comme tel : temps passé ou nombre d'entrées dans les bras ouverts divisé par la somme du temps passé dans les bras ouverts et dans les bras fermés ou par le nombre d'entrées dans les bras ouverts et dans les bras fermés multiplié par 100.



Figure 26 : Photographie du dispositif utilisé lors d'un test d'« Elevated Plus Maze ». Adapté de Laurie Lambot 2015.

---

### *10.3. Nociception*

#### 10.3.1. Test des filaments de Von Frey

La nociception a notamment été étudiée à l'aide d'un test des filaments de Von Frey (Figure 27). Celui-ci permet plus particulièrement d'évaluer l'allodynie induite à l'aide de filaments en nylon de diamètre caractéristique.



Figure 27 : Photographie d'un set de filaments de Von Frey utilisé dans l'étude de l'allodynie. Adapté de Ugo Basile Von Frey Hairs.

---

Cette observation est réalisée sur les pattes arrière de la souris et nécessite de placer des souris sur un grillage permettant l'accès facile à la voute plantaire. Les souris sont donc placées sous une boîte en plexiglas déposée sur ce grillage durant 15 minutes afin de les habituer à cet environnement. Ensuite, un premier filament (0.04 g) est appliqué perpendiculairement sur la région mi-plantaire de la première patte arrière pendant 6 à 8 secondes, jusqu'à ce que celui-ci se courbe. Un fort retrait de la patte de la souris sera considéré comme un résultat positif et impliquera le passage à un filament de Von Frey de g inférieur (0.02 g), tandis que l'absence de sensibilité se caractérisera par la montée dans les valeurs de grammes (Dixon 1980). Ceci est réalisé 6 fois pour chaque patte arrière, avec un intervalle de quelques secondes et une valeur seuil est placée à 2 g. La quantification a ensuite été réalisée selon le protocole de Chaplan et al. (1994) qui traduit les 6 résultats obtenus en une valeur de g définie.

### 10.3.2. Test d'hypersensibilité au froid

L'allodynie a également été évaluée à l'aide d'un test d'hypersensibilité au froid. Cette sensation de froid est induite à l'aide d'acétone simplement déposé sur la surface plantaire. Les souris sont, au préalable, placées dans le dispositif déjà présenté au point précédent, 15 minutes avant le début du test et 50  $\mu$ l de solution d'acétone sont ensuite appliqués à l'aide d'une pipette sur la surface des pattes arrière. Une fois la solution déposée, un chronomètre est enclenché et la présence de réaction au cours des 20 premières secondes induit le prolongement de l'expérience à 20 secondes supplémentaires.

Durant ce laps de temps, un score est attribué en fonction du type de réaction observé (1 en cas de retrait rapide de la patte, 2 en cas de retrait prolongé ou lorsque le nombre de retraits est égal ou supérieur à 3 et 3, lorsque les retraits répétés s'accompagnent d'un léchage de la face ventrale de la patte (Fidanboyly et al. 2011). L'absence de réaction sera, quant à elle, associée à un score nul. Cette mesure est réalisée 3 fois pour chaque patte arrière et chaque essai est lui-même effectué en alternance et séparé d'au moins 12 minutes pour la même patte. Les différents scores obtenus sont finalement sommés pour l'ensemble des deux pattes. Un score maximum de 18 peut donc être obtenu par une souris.

#### *10.4. Comportements induits pharmacologiquement*

##### **10.4.1. Test de sensibilité à la cocaïne**

Le test de sensibilité aux drogues a consisté à injecter une certaine quantité de drogue et à observer l'effet de ces injections sur l'activité locomotrice (Kalivas & Duffy 1993). Au cours du test, chaque souris a subi une injection de solution saline 0,9% (par voie intrapéritonéale), durant les 3 premiers jours, et de cocaïne, au cours des 5 jours suivants (1mg/kg le 1<sup>er</sup> jour, 5 mg/kg le 2<sup>e</sup> jour et 20 mg/kg les 3 derniers jours). Les souris ont alors été filmées immédiatement après chaque injection (saline ou de cocaïne) durant 60 minutes ; un « tracking » de 30 minutes a précédé chaque injection. Le « tracking » des souris a été réalisé à l'aide d'une caméra, disposée au-dessus d'un ensemble de 8 arènes (40 x 20 cm ; 30 cm de hauteur) et en connexion avec le système de « tracking » Ethovision XT. Des injections chroniques de cocaïne induisent également des stéréotypies motrices (Kilbey et al. 1979). Au cours de ce test, le nombre de toilettages et de redressements a donc été comptabilisé. Ceci a été réalisé, pour chaque souris, sur les 10 dernières minutes des enregistrements du dernier jour d'injection saline et du 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jour d'injection de cocaïne. L'indice stéréotypique a ensuite été calculé en sommant ces deux paramètres.

##### **10.4.2. Test de préférence de place conditionnée**

Le test de préférence de place conditionnée (« Conditioned Place Preference test », CPP) est réalisé dans un dispositif composé de trois chambres. Plus précisément, celui-ci est constitué de deux grands compartiments de 18x20 cm qui diffèrent de par l'aspect des murs et du sol et qui sont reliés par un petit compartiment de 6x20 cm qui, lui, est transparent



pour le rendre aversif (Figure 28). Avant le début de l'expérience et ce afin d'habituer les souris aux injections qui vont suivre, celles-ci subissent une injection de solution saline. Celle-ci se fait trois jours avant le début de l'expérience et a lieu dans leur cage respective. Ensuite, au jour dit 0, correspondant à la phase de pré-conditionnement, les souris sont placées dans le petit compartiment du dispositif et peuvent se déplacer librement dans les différentes chambres. Un enregistrement de 18 minutes est réalisé et le temps passé dans les différents compartiments est mesuré. Le conditionnement de préférence de place est alors réalisé les 6 jours suivants et nécessite de séparer les souris en deux groupes. Cette séparation se fait de façon complètement aléatoire et implique un premier groupe, qui recevra des injections de solution saline durant tous les jours du conditionnement, et un second groupe qui recevra des injections de cocaïne (20 mg/kg en i.p.) les jours 1, 3 et 5 et des injections saline les autres jours. Les différentes injections de cocaïne seront toujours réalisées dans le même compartiment (attribué comme mentionné, de manière aléatoire pour chaque souris) tandis que les injections saline les jours 2, 4 et 6 seront réalisées dans l'autre compartiment. Les souris restent dans le compartiment où elles ont subi l'injection durant 30 minutes. L'alternance de compartiment est également réalisée pour le groupe recevant uniquement les injections saline. Finalement, le test est réalisé au jour 7 après le conditionnement et consiste en un même enregistrement de 18 minutes, au cours duquel les souris sont placées dans le petit compartiment et pouvant circuler librement. La différence de temps passé dans le compartiment où la drogue avait été injectée, entre ce jour de test et le jour de pré-conditionnement, est alors calculée. Le protocole est adapté de Valjent et al. (2006).



Figure 28 : Photographie du dispositif utilisé lors d'un test de conditionnement de préférence de place. Adapté de Laurie Lambot 2015.

### 10.4.3. Réponse au SKF-38393

Le SKF-38393 est un agoniste du récepteur D1 de la dopamine. Celui-ci induit un comportement de type compulsif et une hyperlocomotion. Des enregistrements vidéo de 60 minutes, après injection saline le premier jour, et de SKF-38393 (10 mg/kg), le deuxième jour, ont été réalisés. La distance totale parcourue lors de l'enregistrement ainsi que la durée du toilettage exprimée comme le temps passé à se nettoyer sur le temps total observé ont alors été calculées. Dans le cas du toilettage, cette observation a été réalisée, sur les enregistrements, par intervalle de 2 minutes toutes les 10 minutes (Zike et al. 2017).

### 10.4.4. Test de catalepsie induite par l'halopéridol

La catalepsie correspond à un état de rigidité et d'immobilité motrice observé lors d'injection d'halopéridol, antagoniste des récepteurs D2 de la dopamine, notamment utilisé dans le traitement de la schizophrénie (Lieberman et al. 2008). Au cours de cette expérience, une première injection saline à 0.9% a été réalisée par voie i.p.. Une heure après l'injection, les souris ont été placées, pattes avant déposées sur une barre à 5 cm du sol, et le temps passé dans cette posture imposée a été mesuré durant les 2 minutes suivantes. Les souris ont été replacées sur la barre à chaque fois qu'elles en descendaient. Ce test a été répété au cours de la même journée avec des doses de 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg et 0.3 mg/kg respectivement à des intervalles d'1h. Le protocole utilisé a été adapté de Shioda et al. 2017.

## 11. Traitement des données

Les analyses statistiques ont été réalisées, à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc), sur les différents résultats obtenus. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne  $\pm$  SEM et une différence est considérée comme significative lorsque la valeur de p est inférieure ou égale à 0.05. Les comparaisons entre deux groupes ont été réalisées à l'aide d'un test t de Student non païré lorsque la normalité est respectée. Dans le cas contraire, un test de Mann-Whitney a été effectué. Dans le cas des expériences évaluant le comportement moteur et les comportements induits pharmacologiquement, des ANOVA à 2 facteurs (à mesures répétées ou non) ont été réalisées tandis que les résultats de Western blot ont tout d'abord été normalisés, en fonction de GAPDH et du groupe SST-cre<sup>-/-</sup>

iDTR<sup>+/-</sup>/salin défini comme valant 100%. Les valeurs obtenues ont ensuite été comparées statistiquement à cette valeur théorique de 100%.

# CHAPITRE 4 :

## RÉSULTATS

## 1. Validation du modèle d'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* après injection striatale de toxine diphtérique

Afin d'étudier le rôle des interneurons SST dans la physiologie striatale, une approche basée sur la perte de fonction a été utilisée. Celle-ci a consisté à réaliser une ablation spécifique de ces neurones par l'expression cellule-spécifique du récepteur simien de la toxine diphtérique. En effet, afin de cibler ceux-ci, une lignée de souris doublement transgéniques, exprimant le récepteur simien de la toxine diphtérique spécifiquement dans les interneurons somatostatine (SST-Cre iDTR), a subi des injections striatales de DT.

Des premières mises au point (Voir 5.1 du matériel et méthodes) nous ont permis de déterminer qu'une injection de 0.2µl de DT à 5pg/µl dans chaque hémisphère cérébral induit une perte quasi complète des interneurons SST dans le *striatum*, 2 semaines après l'injection. Ce protocole a ensuite été validé sur un ensemble de 8 souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et leurs contrôles SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (Figure 29). Nous pouvons ainsi observer que cette ablation se caractérise par une perte de plus de 90% des cellules somatostatine-positives dans le *striatum* dorsal (Figure 29B, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100 p < 0.0001\*\*\*), tout en les préservant dans le cortex cérébral, à une hauteur de 94.2 ± 6.5% (Figure 29A, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100 p = 0.4029). Une perte de plus de 70% des neurones SST est également observée dans le NAc des souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (Figure 29C, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100 p = 0.0004\*\*).

Notons que, pour les différentes expériences réalisées, dont les résultats vont être présentés dans les chapitres suivants, l'efficacité de la lésion a été chaque fois vérifiée par un immunomarquage contre la SST et que les souris présentant une proportion de neurones positifs pour la SST supérieure à 10% dans le *striatum* dorsal, ont été écartées.

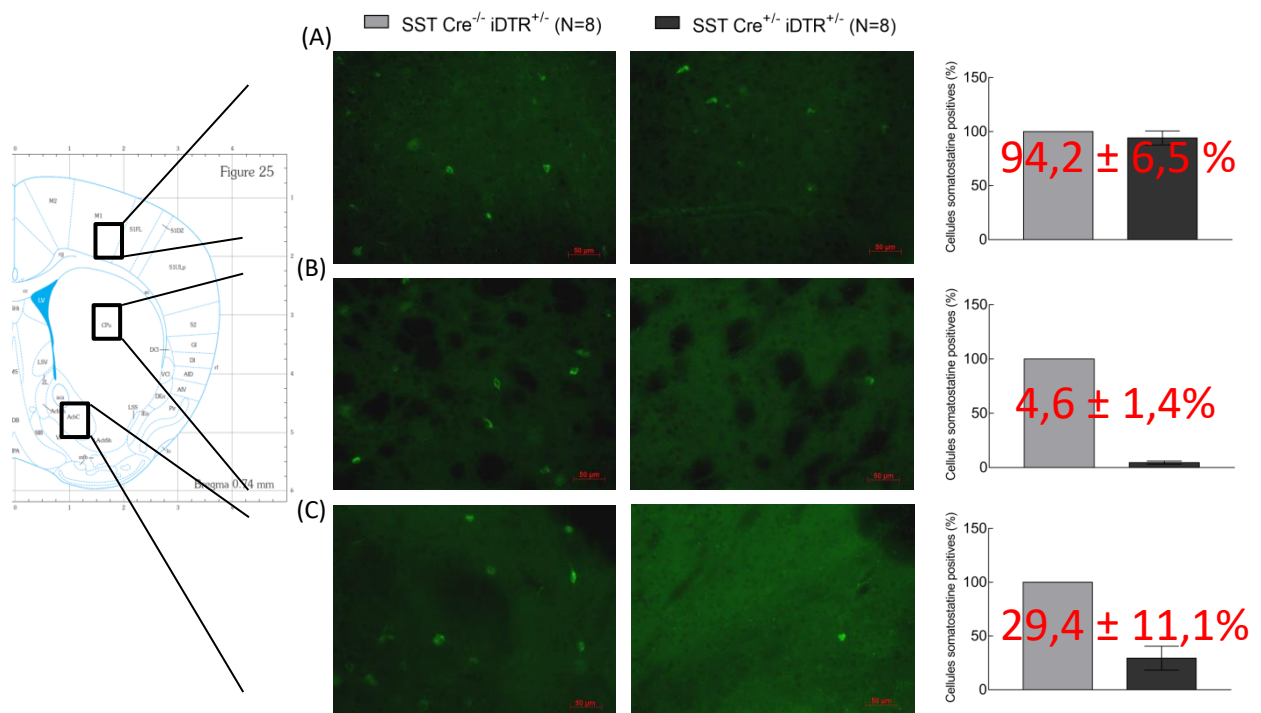


Figure 29 : Validation du modèle d’ablation des interneurons somatostatine après injection striatale de DT dans des souris SST-Cre iDTR. Immunomarquage contre la somatostatine réalisé sur des coupes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>. Le nombre de cellules somatostatine-positives dans le cortex, le *striatum* dorsal et le noyau accumbens de ces souris, après injection striatale bilatérale de DT, est quantifié (n=8 par groupe, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100, p<0.05 pour le *striatum* dorsal et le NAc). Echelle 50  $\mu\text{m}$ . Les résultats ont été normalisés par rapport aux SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. L’acquisition a été réalisée avec l’objectif 20x.

Des immunomarquages contre DARPP-32 (marqueur des MSNs), ChAT, PV et CR ont également été réalisés sur un ensemble de 3 souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et 3 souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>, afin de s’assurer de la spécificité de la lésion. Le nombre de cellules positives pour les différents marqueurs étudiés est similaire entre les deux groupes de souris (Figure 30A-D, test de Student, p>0.05). Ceci nous permet de conclure que l’injection de DT dans le *striatum* n’affecte pas les autres populations neuronales du *striatum*.

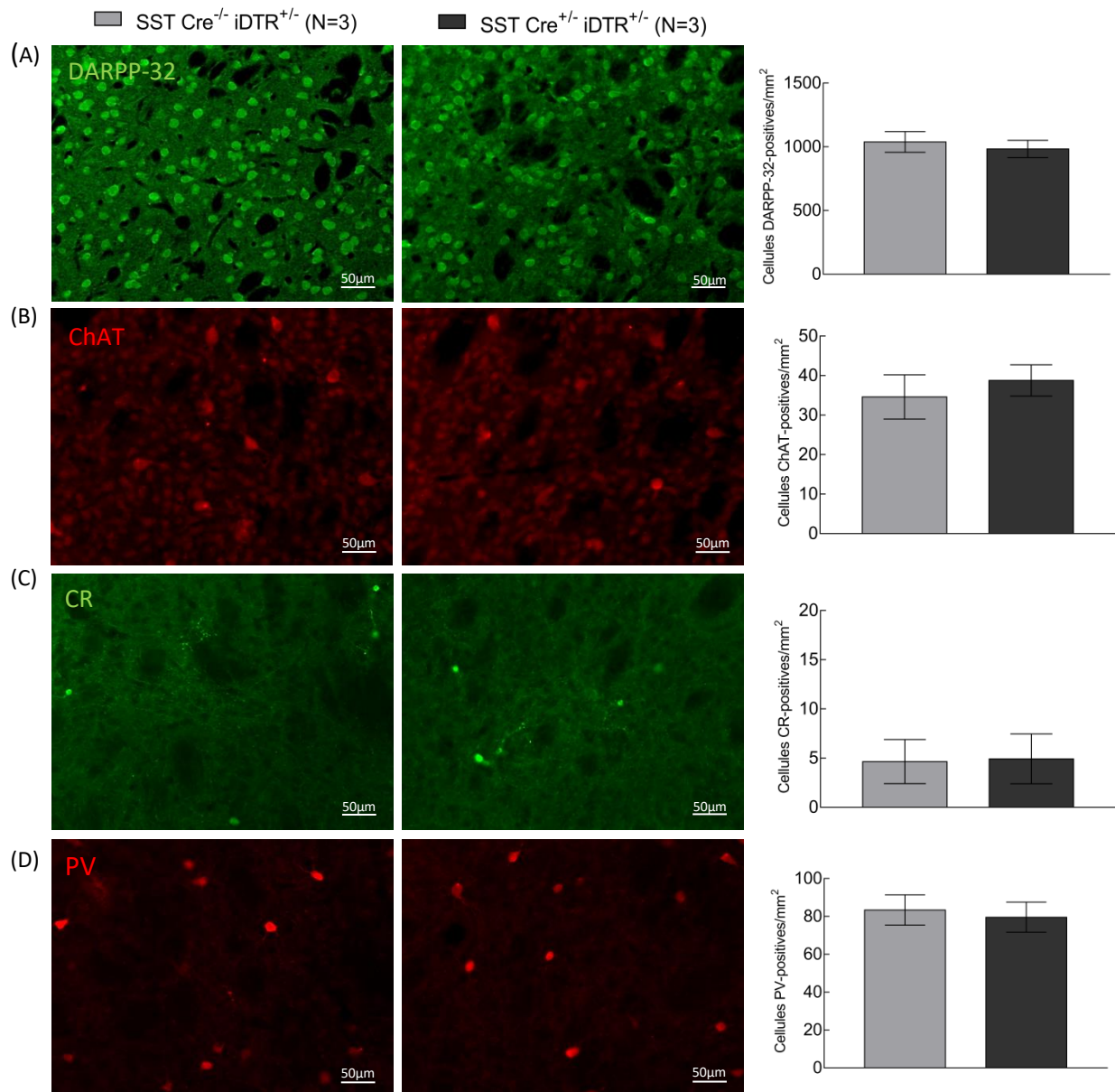


Figure 30 : Préservation des MSNs et des interneurons cholinergiques, parvalbumine et calrétinine du *striatum* après injection de toxine diphtérique dans le *striatum* de souris SST-Cre iDTR. Immunomarquage et analyse quantitative du nombre de cellules positives pour (A) DARPP-32, (B) la choline acétyltransférase (ChAT), (C) la calrétinine (CR) et (D) la parvalbumine (PV) dans le *striatum* de souris SST-Cre iDTR<sup>+/-</sup> injectées avec la DT. Echelle 50  $\mu$ m. Les résultats sont exprimés en moyenne par  $\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$  (A-D, n= 3 par groupe, test de Student  $p>0.05$ ). L'acquisition a été réalisée avec l'objectif 10x.

## 2. Modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones de projection du *striatum*

Des données récentes de la littérature mettent en évidence que les interneurons SST peuvent induire des courants post-synaptiques inhibiteurs dans les neurones de projection, même si ceux-ci semblent impliquer des neurones qui se trouvent à distance

relativement importante l'un de l'autre (Straub et al. 2016). Afin d'étudier les relations entre interneurons SST et MSNs dans le réseau striatal, nous avons analysé l'effet de la perte striatale de ces interneurons sur l'activité électrique des MSNs. Des enregistrements électrophysiologiques permettant d'étudier les propriétés membranaires, l'excitabilité des MSNs et la morphologie de leurs potentiels d'action ont donc été réalisés. L'ensemble des enregistrements électrophysiologiques ont été effectués sur des tranches coronales de cerveau en survie par Daniel Rial.

### *2.1 La perte des interneurons somatostatine du striatum altère le potentiel membranaire de repos et l'excitabilité des MSNs sans modifier la morphologie de leurs potentiels d'action*

L'analyse des propriétés membranaires passives des MSNs n'a pas montré de modification de la capacité membranaire, suite à l'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* (Figure 31A, n=12-21, test de Mann-Whitney, p=0.4712). Cependant, nous observons une augmentation du potentiel membranaire de repos (RMP) des MSNs des souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (Figure 31B, n=12-21, -83,8 mV pour les SST-Cre<sup>-/-</sup> et -78 mV pour les SST-Cre<sup>+/-</sup>, test de Mann-Whitney, p= 0.0069\*\*). Malgré cette augmentation du potentiel de repos, les résultats obtenus en configuration courant-imposé ne montrent pas de différence de la rhéobase, qui correspond à la quantité de courant nécessaire pour voir apparaître le premier potentiel d'action (Figure 31C, n=12-21, test de Mann-Whitney, p=0.3860). Cependant, l'analyse de la courbe d'excitabilité, établie suite à l'injection de courants d'intensité croissante et mettant en relation la fréquence des potentiels d'action en fonction de ce courant injecté, met en évidence une augmentation de l'excitabilité intrinsèque des MSNs chez les souris dépourvues d'interneurons SST du *striatum* (Figure 31D, n=12-21, ANOVA à deux voies, p=0.003\*\* pour l'effet génotype et p<0.0001\*\*\* pour l'effet courant injecté).



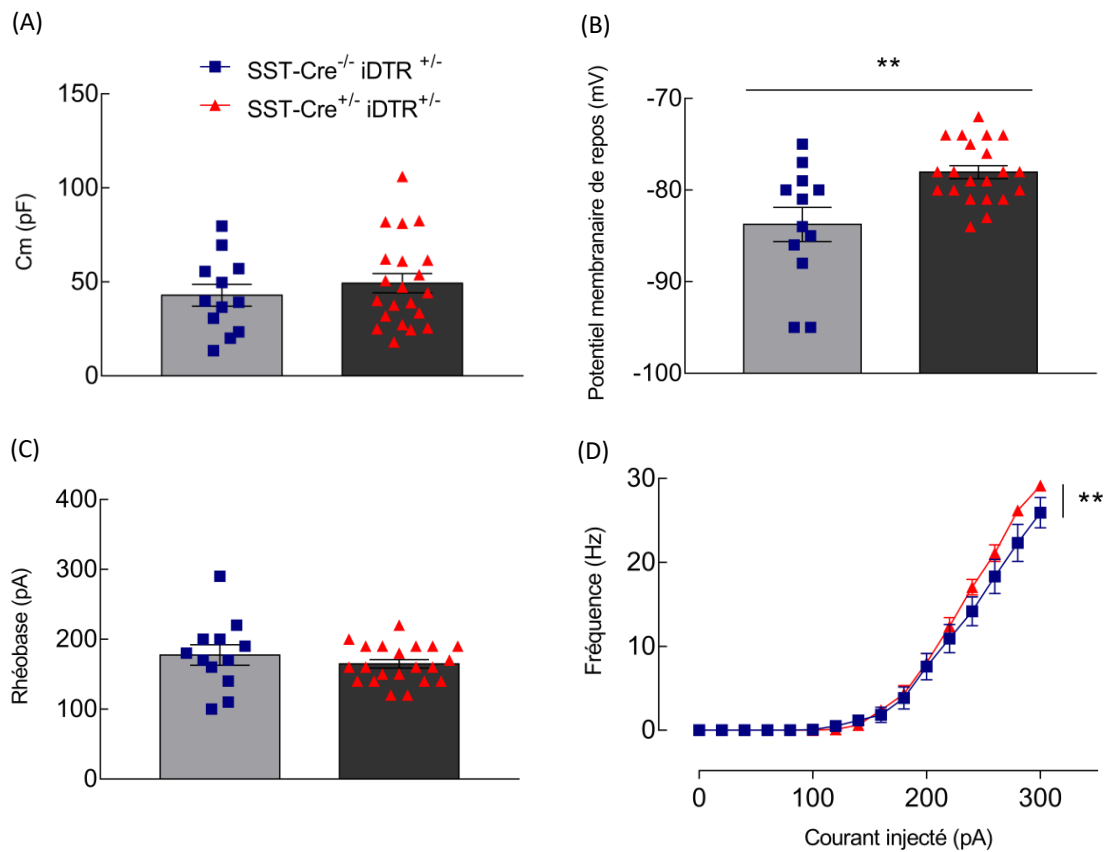


Figure 31 : Les MSNs des souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>, après ablation des interneurons SST, présentent une altération de leur potentiel membranaire de repos et une augmentation de leur excitabilité intrinsèque. Des expériences de patch-clamp, réalisées sur les neurones de projection épineux, ont mis en évidence une augmentation du potentiel membranaire de repos, suite à la perte des interneurons SST dans le *striatum* (A, n=12-21, test de Mann-Whitney, p<0.01\*\*). La capacité membranaire (B) et la rhéobase (C) ne sont, quant à elles, pas modifiées (n=12-21, test de Mann-Whitney, p>0,05) (D) La courbe de fréquence des potentiels d'action en fonction du courant injecté met en évidence une augmentation de l'excitabilité des MSNs (n=12-21, ANOVA deux voies, p=0.003\*\* pour le facteur génotype et p<0.0001\*\*\* pour le facteur courant injecté).

Des analyses plus détaillées de la forme des potentiels d'action ont également été réalisées (Tableau 6). Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes, même si une tendance à la diminution de l'amplitude de l'AHP est toutefois observée (Tableau 6, n=12-21, test de Mann-Whitney, p= 0.0752).

	Cre-/Toxine (N=12)	Cre+/Toxine (N=21)	Valeur de p
V seuil (mV)	-40.11 ± 2.97	-40.16 ± 1.79	p = 0.6714
Coefficient d'adaptation	1.00 ± 0.06	1.05 ± 0.02	p = 0.9266
Amplitude (mV)	115.50 ± 11.00	120.10 ± 8.12	p = 0.8106
V max (mV)	34.78 ± 3.08	38.14 ± 1.92	p = 0.6714
Durée du potentiel d'action (ms)	58.92 ± 2.82	63.29 ± 2.22	p = 0.3121
Amplitude AHP (mV)	-39.37 ± 5.76	-29.66 ± 3.29	p = 0.0752
Vitesse de dépolarisation (mV/ms)	134.90 ± 9.70	142.90 ± 6.45	p = 0.5926
Vitesse de repolarisation (mV/ms)	-59.20 ± 22.63	-34.21 ± 2.18	p = 0.6447

Tableau 6 : Paramètres analysés lors des enregistrements électrophysiologiques des MSNs chez des souris SST-Cre iDTR<sup>+/+</sup> après injection striatale bilatérale de DT.

Les différentes valeurs obtenues chez les souris contrôles sont en accord avec les données de la littérature qui donnent par exemple un potentiel membranaire de repos autour de -80 mV et une rhéobase de 200 pA en moyenne. Il en est de même pour les paramètres des potentiels d'action (Gertler et al., 2008 ; Kim et al., 2011). Les valeurs de capacitance obtenues sont toutefois moindres à celles décrites par Gertler et al. (2008) et pourraient être inhérentes à la mesure en voltage imposé.

Suite à ces différentes observations, nous pouvons conclure que la perte des interneurons SST du *striatum* modifie le potentiel membranaire de repos des MSNs ainsi que leur excitabilité, sans toutefois grandement modifier la morphologie de leurs potentiels d'action.

### 3. Modifications de la morphologie des neurones de projection du *striatum*

De nombreuses études décrivent une corrélation entre la morphologie des neurones et leur activité électrique. Celle-ci est par exemple, décrite pour la connexion cortico-hippocampale des neurones de la région CA1 ou CA2 de l'hippocampe, où les neurones de la région CA2 possèdent des dendrites plus larges et moins ramifié que ceux de la région CA1 facilitant la propagation du potentiel post-synaptique exciteur jusqu'au soma (Srinivas et al. 2017) ou encore, dans le cas d'un modèle d'exposition prénatale à de l'alcool, qui se caractérise par une augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques exciteurs

dans les MSNs de type D1 du *striatum* dorsomédian et ceci, associé à une augmentation de la complexité dendritique dans ces neurones (Cheng et al. 2018).

Suite aux différences électrophysiologiques observées chez les MSNs des souris dépourvues d'interneurones SST et, toujours dans le cadre de l'étude de la relation entre les interneurones SST et les MSN, nous avons donc voulu déterminer si ces différences sont associées à une modification de leur morphologie. Pour ce faire, les neurones enregistrés ont été soumis à une reconstruction tridimensionnelle rendue possible par l'ajout de biocytine dans la solution intracellulaire des neurones enregistrés.

### *3.1 L'ablation des interneurones somatostatine du striatum altère la densité des épines dendritiques distales des MSNs sans modifier l'arborisation dendritique*

Une première série de paramètres cellulaires a été mesurée, à savoir l'occupation dans l'espace des neurones (exprimé en terme d'occupation radiale) ainsi que le volume et l'aire du soma. Aucun de ces paramètres occupation radiale (Figure 32B, n=9-19, test de Student, p=0.9871) volume du soma (Figure 32C, n=9-19, test de Student, p=0.6838) et aire du soma (Figure 32D, n=9-19, test de Mann-Whitney, p=0.9319), ne montre de différence entre les deux groupes. De même, les paramètres tels que la longueur totale de l'arborisation (Figure 32E, n= 9-19, test de Student, p=0.5289) et la longueur du plus long dendrite (Figure 32F, n=9-19, test de Mann-Whitney, p=0.2429) sont similaires.

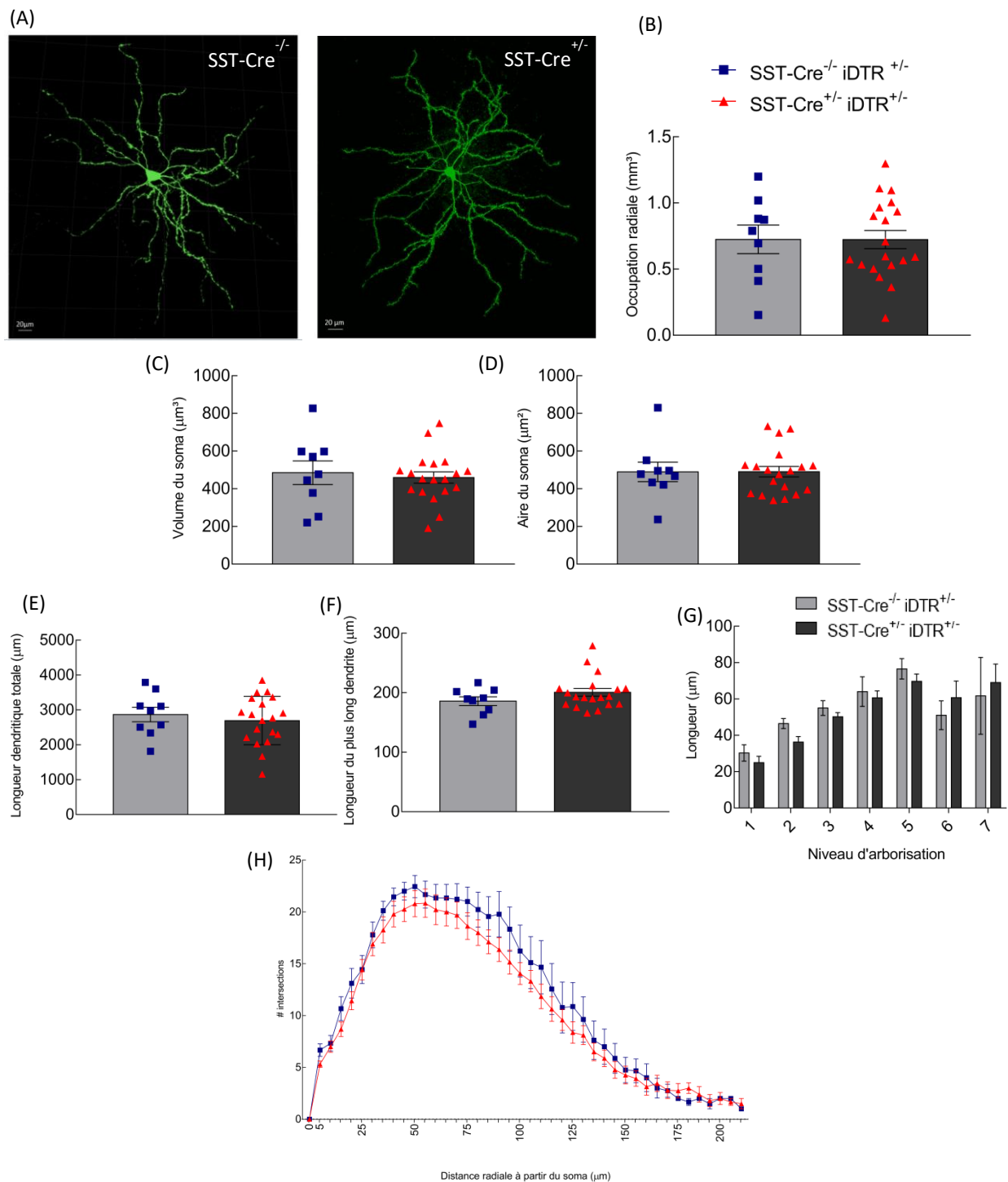


Figure 32 : L'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* n'affecte pas l'arborisation dendritique des MSNs. (A) Projection en z selon l'intensité maximale d'images acquises en microscopie confocale de MSNs de souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> après injection striatale bilatérale de DT. Barre d'échelle : 20 µm. (B-H) L'analyse de l'occupation radiale (B, n=9-19, test de Student, p>0.05), du volume du soma (C, n=9-19, test de Student, p>0.05) de l'aire du soma (D, n=9-19, test de Mann-Whitney, p>0.05) de la longueur totale des dendrites (E, n= 9-19, test de Student, p>0.05), de la longueur du plus long dendrite (F, n=9-19, test de Mann-Whitney, p>0.05), de la longueur des segments dendritiques en fonction de leur ordre hiérarchique (G, n=9-19, test t multiple, p>0.05 pour chaque niveau) ainsi que l'analyse tridimensionnelle de Sholl (H n=9-19, test de Student, p>0.05) des neurones reconstruits ne montre pas de différence entre les groupes.

Ensuite, l'étude de l'arbre dendritique a consisté en une analyse de Sholl, qui vise à comptabiliser le nombre de croisements des dendrites avec des sphères concentriques centrées sur le soma du neurone. Celle-ci n'a pas mis de différence en évidence (Figure 32H, n=9-19, test de Student, p=0.3422). De même, lorsque les dendrites sont classés en différents niveaux selon la position de ceux-ci dans l'arborisation dendritique, la longueur des dendrites des différents niveaux est similaire entre les deux groupes (Figure G, n=9-19, test t multiple, p>0.05 pour chaque niveau). Dans cette analyse, les dendrites directement connectés au soma sont définis comme étant des dendrites de niveau un, tandis que leurs connexions directes sont définies comme étant de niveau deux et ainsi de suite.

Aucune différence significative, en termes de volume dendritique total ou d'aire dendritique totale, n'est observée (Figure 33A-B, n=9-19, test de Student, p>0.05). Il en est de même pour le volume des dendrites en fonction de leur ordre hiérarchique (Figure 33C, n=9-19, test t multiple, p>0.05 pour chaque niveau).

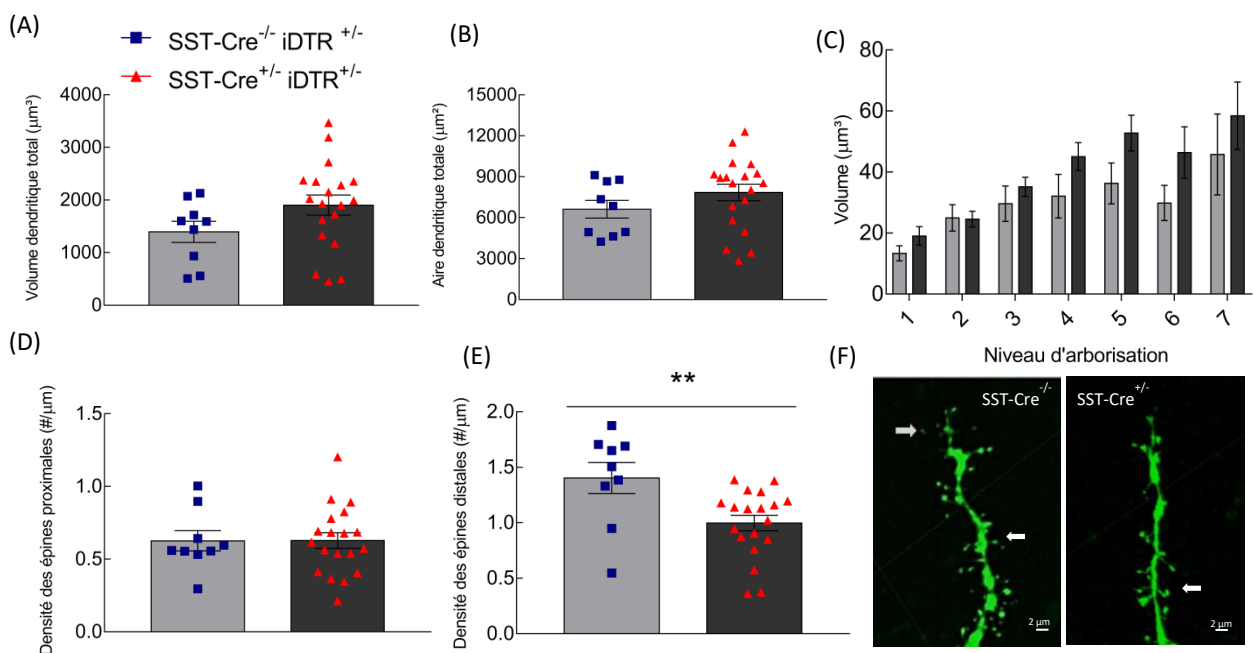


Figure 33 : L'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* induit une modification de la densité des épines dendritiques distales des MSNs sans modifier le volume dendritique. (A) L'analyse du volume dendritique total des MSNs de souris SST-Cre<sup>-/-</sup> et SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> après injection striatale de DT ne montre pas de différence significative (n=9-19, test de Student, p>0.05), de même que pour l'aire dendritique totale (B, n=9-19, test de Student, p>0.05), ainsi que pour le volume des segments dendritiques en fonction de leur ordre hiérarchique (C, n=9-19, test t multiple, p>0.05 pour chaque niveau). (D-F) L'analyse des épines dendritiques montre que la densité sur les portions proximales n'est pas modifiée (D, n=9-19, test de Student, p>0.05), tandis que la densité des portions distales est réduite (E, n = 9-19, test de Mann-Whitney, p=0.0061\*\*) (F) Projection en z selon l'intensité maximale d'images acquises en microscopie confocale d'extrémités dendritiques distales de MSNs. Les flèches indiquent des épines dendritiques. Barre d'échelle : 2 µm.

A une plus petite échelle, le nombre d'épines dendritiques a été comptabilisé sur les portions proximales (correspondant à un rayon de 50  $\mu\text{m}$  autour du soma) et distales (à partir d'un rayon de 50 $\mu\text{m}$  autour du soma) du neurone. Ainsi, nous observons que le nombre d'épines dendritiques sur la partie la plus extrême du neurone est réduit chez les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> par rapport aux souris contrôles (Figure E, n = 9-19, test de Mann-Whitney, p=0.0061\*\*), tandis que la densité des épines proximales n'est pas modifiée (Figure D, n=9-19, test de Student, p>0.05).

Alors que les mesures de longueur sont assez semblables à celles décrites dans la littérature (autour de 2100-2200  $\mu\text{m}$  en moyenne pour la longueur totale des filaments) de même que pour l'analyse de Sholl ou encore la densité des épines (Li et al. 2012), des différences sont toutefois observées pour les valeurs de volume des filaments et du soma. Il semble que ces paramètres soient plus sujets à fluctuation, dépendant même de l'environnement des souris avant l'euthanasie. En effet, dans la littérature, des différences sont déjà observées entre les groupes analysés et ce même avec une procédure standardisée (Bicanic et al., 2017). Des différences liées à la méthode de marquage (imprégnation Golgi-Cox vs biocytine) et au programme de reconstruction peuvent également être envisagées.

#### **4. Comportement moteur, comportement nociceptif et comportements modélisant l'anxiété ou la dépression**

Afin d'appréhender le rôle des interneurons SST du *striatum* à une échelle systémique et afin de déterminer si les différences électrophysiologiques et morphologiques observées pourraient avoir une conséquence sur le comportement de la souris, nous avons étudié l'effet de la perte striatale de ces interneurons au moyen de différents tests comportementaux.

##### *4.1 L'ablation des interneurons somatostatine du striatum n'affecte pas l'activité locomotrice, la coordination motrice ainsi que l'apprentissage moteur.*

De nombreuses expériences, impliquant les différents neuromédiateurs libérés par les interneurons SST, sont associées à des phénotypes moteurs. Tashev et al. (2001), par exemple, mettent en évidence que, lors d'expériences de micro-injections bilatérales de SST

dans le *striatum* dorsal de rats, la locomotion est modifiée : le nombre de mouvements horizontaux et verticaux diminue durant les premières 5 minutes post-injection et augmente ensuite. Tanda et al. (2009), quant à eux, décrivent une augmentation de l'activité locomotrice chez les souris knockout pour le gène n(NOS). La modification de la motricité observée lors de ces expériences ainsi que le rôle important du *striatum*, dans les différents aspects du comportement moteur, justifient l'étude des comportements moteurs après ablation des interneurons somatostatine striataux.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'activité locomotrice spontanée ainsi que l'activité exploratoire à l'aide d'un test de champ ouvert (Figure 34A). Pour ce faire, les souris ont été placées dans une arène et leur activité locomotrice a été enregistrée durant 60 minutes, sur une série de 3 jours consécutifs. La distance parcourue par les deux groupes de souris, lors du premier jour, est similaire, indiquant que la perte striatale des interneurons somatostatine n'affecte pas l'activité locomotrice spontanée (test de Student réalisé sur la distance totale parcourue du premier jour,  $n=10-15$ ,  $p=0.8006$ ). De même, les deux groupes présentent une réduction de leur locomotion les jours suivants, traduisant un phénomène de familiarisation à l'arène où elles ont été placées qui est similaire. Ceci se reflète par un effet du temps lors du test d'ANOVA ( $n=10-15$ , ANOVA à 2 voies à mesures répétées réalisée sur la distance totale parcourue par jour,  $p<0.0001^{***}$  pour le facteur temps). Une familiarisation à l'arène au sein de chaque session est également observé ( $n=10-15$ , ANOVA à 2 voies à mesures répétées,  $p<0.0001^{***}$  pour le facteur temps) et ceci, de manière similaire pour les deux groupes de souris.

La coordination motrice et l'apprentissage moteur ont été étudiés ensuite, à l'aide d'un test de rotarod accélérant (Figure 34B). Ce test consiste à mesurer le temps passé par les souris sur une barre en rotation à accélération constante. Il est réalisé au cours de cinq jours consécutifs, à raison de quatre essais par jour, permettant d'évaluer si les souris apprennent à se maintenir en équilibre au fil du temps. Les résultats obtenus montrent que les deux groupes de souris présentent un même profil d'apprentissage moteur (Figure 34B,  $n=10-15$ , ANOVA à 2 voies à mesures répétées, interaction entre le facteur génotype et le facteur temps :  $p=0,3488$ , où l'apprentissage est caractérisé par un effet du temps  $p<0.0001^{***}$ ). Une coordination motrice similaire, reflétée par une performance similaire,

lors de la session initiale, est également observée entre les groupes (test de Student, n=10-15, p=0.5947).

Finalement, un test de « single-pellet reaching task » a été réalisé, permettant aussi d'étudier l'apprentissage moteur en se basant sur un comportement moteur fin, au cours duquel les souris apprennent à récupérer un granule sucré placé à un endroit précis avec leur patte avant dominante. Les deux groupes de souris ont été soumis à ce test, durant 8 jours successifs. Les résultats obtenus montrent que les deux groupes d'animaux améliorent leurs performances d'une façon similaire (Figure 34C, n=10-15, ANOVA à 2 voies à mesures répétées, interaction entre le facteur génotype et le facteur temps : p=0.9283 où l'apprentissage est caractérisé par un effet du temps p<0.0001\*\*\*) et ce, avec une vitesse similaire (Figure 34D, n=10-15, ANOVA à 2 voies à mesures répétées, interaction : p=0.3119 et p<0.0001\*\*\* pour le facteur temps), confirmant que la perte des interneurons somatostatine du *striatum* n'affecte pas l'apprentissage moteur.



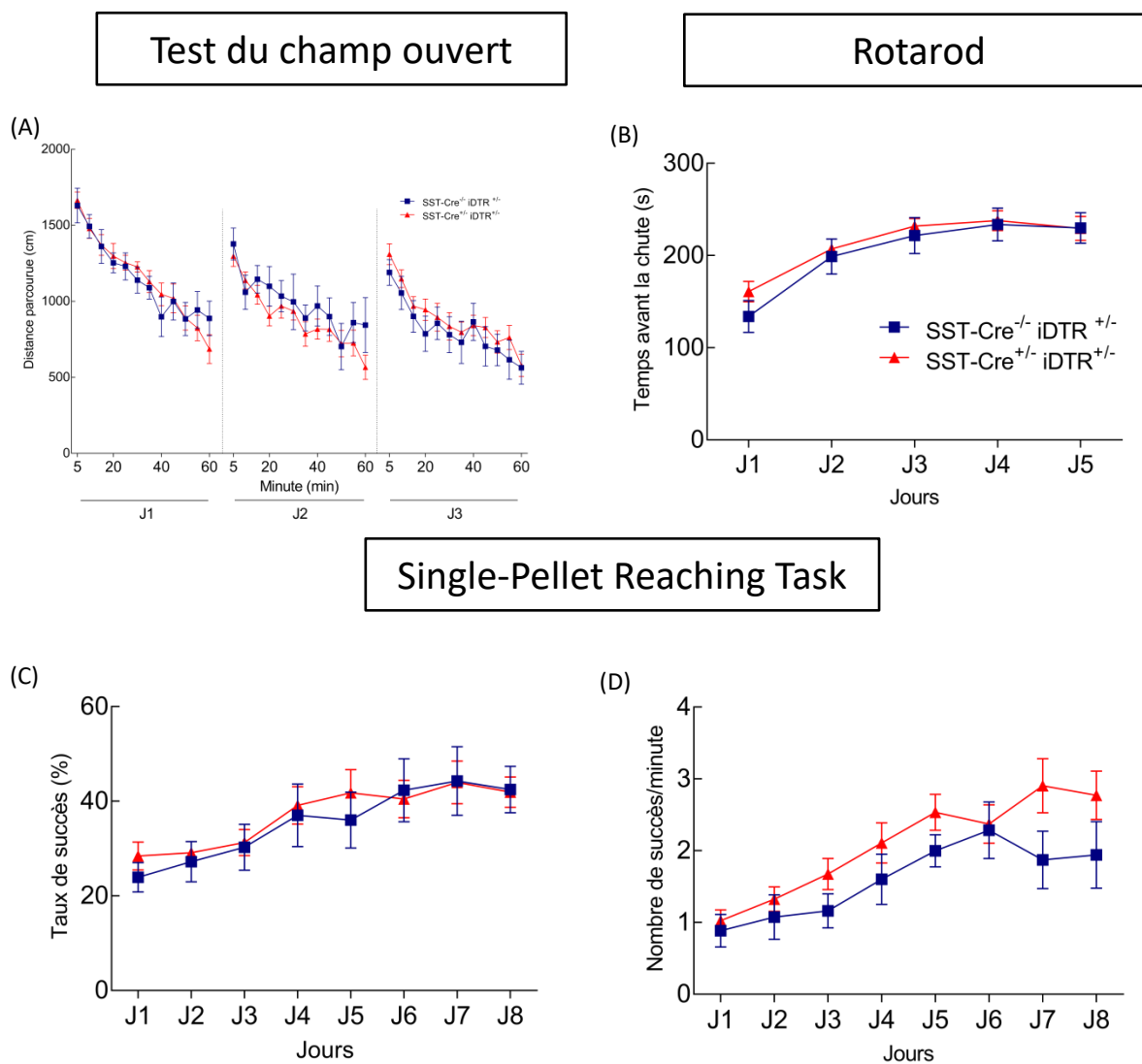


Figure 34 : L'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* n'affecte pas la locomotion et l'apprentissage moteur. (A) Le test du champ ouvert montre que l'activité locomotrice spontanée n'est pas modifiée chez les souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>. De plus, les deux groupes testés présentent un même phénomène de familiarisation à l'arène lors du 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jour de test (réalisé sur la distance totale parcourue par jour, n=10-15, ANOVA à 2 voies à mesures répétées, p<0.0001\*\*\* pour le facteur temps). La représentation de la locomotion par intervalles de 5 min met également en évidence ce phénomène de familiarisation au sein de chaque session (n=10-15, ANOVA à 2 voies à mesures répétées, p<0.0001\*\*\* pour le facteur temps). (B) Les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> présentent des performances similaires au groupe contrôle lorsqu'elles sont soumises au test de rotarod accélérant, aussi bien en terme de coordination motrice (réalisé sur les données de la session initiale, n=10-15, test de Student, p>0,05) que d'apprentissage moteur (réalisé sur l'ensemble des jours, n=10-15, ANOVA à 2 voies à mesures répétées, p<0.0001\*\*\* pour le facteur temps). (C-D) Le test de single-pellet reaching task confirme ces résultats. Les souris ne présentent pas de différence du taux de succès correspondant au nombre de tentatives réussies pour attraper une petite boulette de nourriture sur le nombre total de tentatives (C, n=10-15, ANOVA à 2 voies à mesures répétées, p>0.05), de même que pour la vitesse avec laquelle ces tentatives fructueuses sont atteintes (D, n=10-15, ANOVA à 2 voies à mesures répétées, p>0.05). Les deux paramètres montrent qu'un apprentissage est bien détecté dans les deux groupes de souris, p<0.0001\*\*\* pour le facteur temps lors de l'ANOVA à deux voies.

Considérant les différents résultats obtenus, il apparaît que la perte striatale des interneurons somatostatine n'altère pas les comportements moteurs tels que l'activité locomotrice spontanée, la coordination motrice ou encore l'apprentissage moteur.

#### 4.2 L'ablation des interneurons somatostatine du striatum n'affecte pas les comportements modélisant l'anxiété ou la dépression chez la souris

Un phénotype de type anxiogène caractérise la souris « knockout » pour le gène NPY (Bannon et al. 2000), tandis que l'inactivation du gène codant pour la n(NOS) induit une réduction de l'immobilité mesurée, lors d'un test de nage forcée (Tanda et al. 2009). Compte tenu de ces différents phénotypes observés, lors de l'inactivation de l'un ou l'autre neuropeptide ou enzyme spécifique des interneurons SST et du nombre croissant d'études s'intéressant au rôle du *striatum* ventral dans la symptomatologie de la dépression (Francis & Lobo 2017), nous avons voulu évalué l'implication de la part striatale dans ces phénotypes et déterminer si l'ablation des interneurons induit une augmentation de l'anxiété ou une réduction du phénotype dépressif chez ces souris.

Dans un premier temps, la valeur hédonique liée à l'administration d'une solution sucrée a été évaluée, lors d'un test de préférence au saccharose 2%. Les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> n'ont pas présenté d'augmentation de leur préférence pour le saccharose, en comparaison aux souris contrôles (Figure 35A, n=8-13, test de Student, p=0.4390). De plus, aucune différence n'a été observée quant à la quantité de saccharose (Figure 35B, n=8-13, test de Student, p=0.2220) ou de liquide total (Figure 35C, n=8-13, test de Student, p=0.2690) consommés.

Nous avons ensuite procédé à un test d'« Elevated Plus Maze », qui permet de décrire le niveau d'anxiété chez la souris, basé sur le temps passé dans les bras ouverts d'un dispositif surélevé (Figure 35D, n=8-10, test de Student, p=0.9175), le nombre d'entrée dans ces bras ouverts (Figure 35D, n=8-10, test de Student, p=0.1991) et le nombre de prises de risque (Figure 35E, n=8-10, test de Student, p=0.5245). Cependant, aucune différence n'a été observée pour ces paramètres entre les deux groupes, ne mettant donc pas en évidence d'augmentation de l'anxiété chez les souris dépourvues d'interneurons SST.

Finalement, afin d'évaluer l'effet de l'ablation sur les comportements modélisant la dépression, les deux groupes de souris ont été soumis à un test de suspension par la queue

(TST) et à un test de nage forcée (FST). Ces deux tests consistent à mesurer le temps d'immobilité, reflétant la résignation, lorsque les souris sont exposées à une situation à laquelle elles ne peuvent échapper. Dans les deux tests, les différents groupes de souris ont présenté un temps d'immobilité similaire (Figure F n=8-13, test de Student,  $p=0.1347$ ) pour le TST et (Figure G, n=8-13, test de Student,  $p=0.2005$ ) pour le FST.

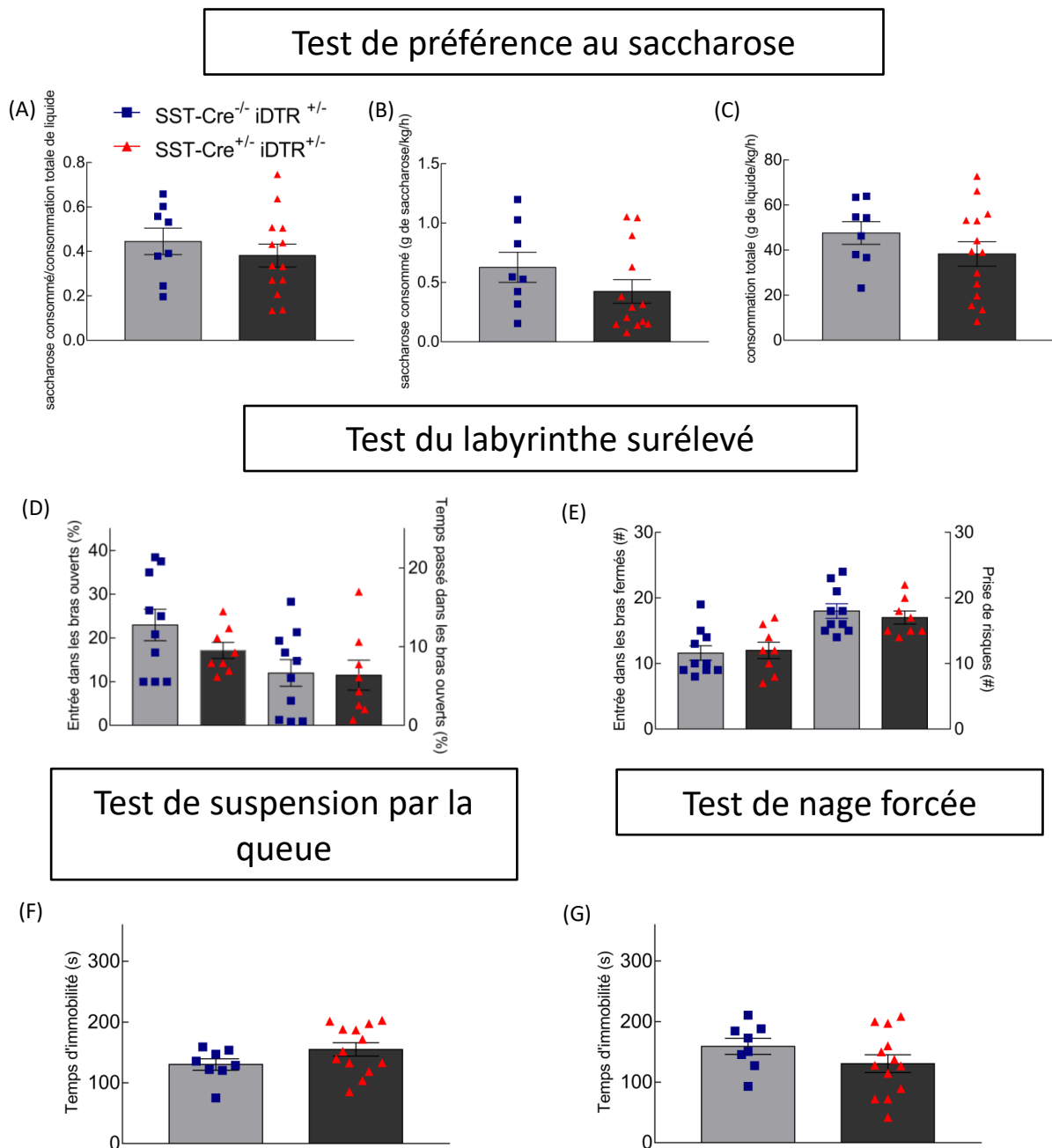


Figure 35 : L'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* n'altère pas les comportements modélisant l'anxiété ou la dépression. (A-C) Le test de préférence au saccharose ne montre pas de différence entre les souris SST-Cre<sup>+/iDTR+/-</sup> et SST-Cre<sup>-/iDTR+/-</sup> quant à leur préférence pour le saccharose (A), leur consommation de saccharose (B) et leur consommation totale de liquide (C) (A-C, n=8-13 test de Student, p>0.05). (D-E) Les souris SST-Cre<sup>+/iDTR+/-</sup> présentent un comportement similaire à celui du groupe contrôle lorsqu'elles sont soumises au test du labyrinthe surélevé (n=8-10, test de Student, p>0.05). (F) Le comportement observé lors du test de suspension par la queue n'est pas modifié en l'absence des interneurons somatostatine PLTS (n=8-13, test de Student, p>0.05) de même que pour le test de nage forcée (G n=8-13, test de Student, p>0.05).

Ces différents résultats nous amènent à la conclusion que l'ablation des interneurons SST du *striatum* n'affecte pas le comportement à caractère hédonique,

anxiogène ou de type dépressif lié à la résignation, comme observé dans certains modèles de dépression.

#### 4.3 L'ablation des interneurones somatostatine du striatum n'affecte pas le seuil à la douleur

Des expériences de micro-injections striatales de SST ou de NPY ont démontré une augmentation du seuil à la douleur chez les animaux injectés (Tashev et al. 2001; Li et al. 2002). Sur base de cela, nous avons évalué le rôle des interneurones somatostatine striataux dans la nociception. Ceci a tout d'abord été réalisé à l'aide du test des filaments de Von Frey, au cours duquel des filaments de nylon de diamètres croissants ont été appliqués sur les pattes arrière des souris révélant un seuil de retrait des pattes semblable dans les deux groupes (Figure 36A, n=10-11, test de Mann-Whitney, p=0.5926). Un seuil à la douleur semblable dans les deux groupes, défini comme le « cold score », a également été observé lors d'un test d'hypersensibilité au froid, qui a consisté en l'application d'acétone sur les pattes arrière (Figure 36B n=10-11, test de Mann-Whitney, p=0.3820).

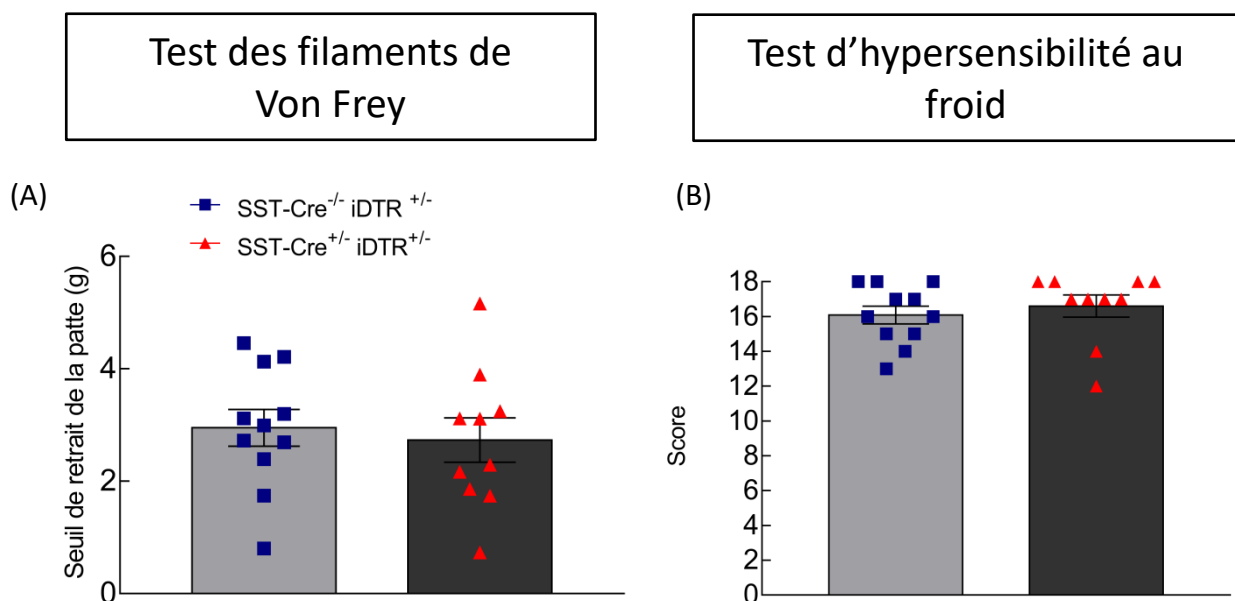


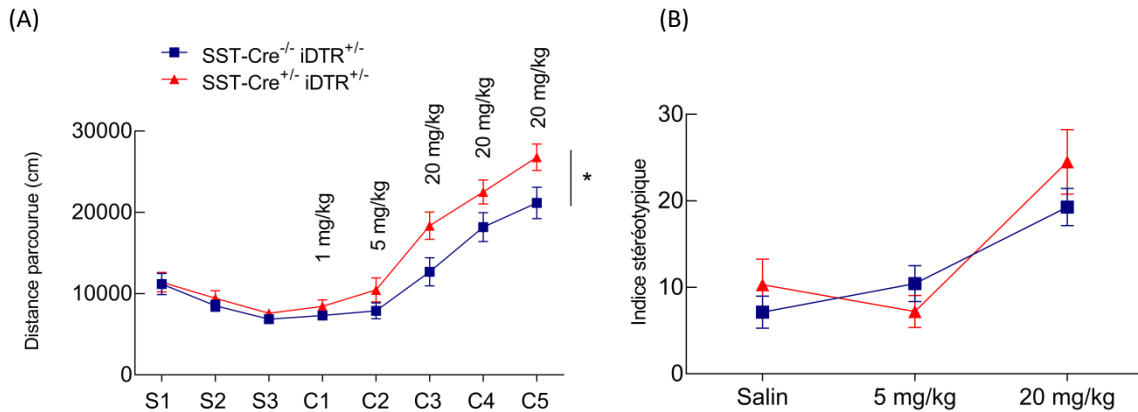
Figure 36 : L'ablation des interneurones somatostatine du *striatum* n'affecte pas la perception algésique. (A) Le test des filaments de Von Frey ne montre pas de différence de seuil à la douleur entre les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (n=10-11, test de Mann-Whitney, p>0.05). (B) Les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> ne sont pas plus sensibles à l'acétone que le groupe contrôle lorsqu'elles sont soumises au test d'hypersensibilité au froid (n=10-11, Test de Mann-Whitney, p>0.05).

## 5. Altérations des comportements induits par la cocaïne

### 5.1 L'ablation des interneurons somatostatine du striatum augmente la locomotion induite par la cocaïne et modifie la sensibilité à la cocaïne sans affecter le nombre de stéréotypies motrices ou la préférence de place conditionnée

Etant donné l'implication du *striatum* dans le phénomène d'assuétude aux drogues, nous avons évalué si la perte des interneurons SST du *striatum* affectait la réponse locomotrice induite par la cocaïne, observée en temps normal lors d'injections de celle-ci. En effet, l'administration de cocaïne résulte en une accumulation de dopamine dans le *striatum*, qui induit une activation des récepteurs dopaminergiques des neurones de projection et une hyperlocomotion. Nous avons réalisé un test de sensibilité, qui a consisté en l'injection d'une dose quotidienne de cocaïne après une première phase d'habituation. Les deux premières injections ont été faites respectivement avec des faibles doses de 1 mg et 5 mg/kg. Ces deux doses n'ont pas induit de différence de la distance parcourue entre les deux groupes de souris, nous permettant de conclure que l'ablation des interneurons SST striataux n'affecte pas la sensibilité à la cocaïne dans le cas d'injections suboptimales (Figure 37A, n=10-14, test de comparaison multiple de Sidak). Au cours des 3 jours suivants, les souris ont reçu une même dose quotidienne de 20 mg/kg et ce, afin d'induire le phénomène de sensibilisation. Ce phénomène, qui se caractérise par une augmentation de la locomotion suite à cette injection répétée de cocaïne, est observable dans les deux groupes, lors de l'analyse par ANOVA à deux voies à mesures répétées qui présente un effet du temps avec une valeur de  $p < 0.0001^{***}$ . Toutefois, nous observons que les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> dépourvues d'interneurones somatostatine striataux présentent un niveau de locomotion supérieur à celui du groupe contrôle (Figure 37A, n=10-14, ANOVA à deux voies à mesures répétées, effet du génotype  $p = 0,0148^*$  et  $p < 0.0001^{***}$  pour le facteur temps et suivie du test de comparaison multiple de Sidak) mais une sensibilisation identique (Figure 37A, n=10-14, ANOVA à deux voies à mesures répétées réalisée sur les données C3-C5, interaction  $p = 0.8165$ ).

## Test de sensibilité à la cocaïne



## Préférence de place conditionnée

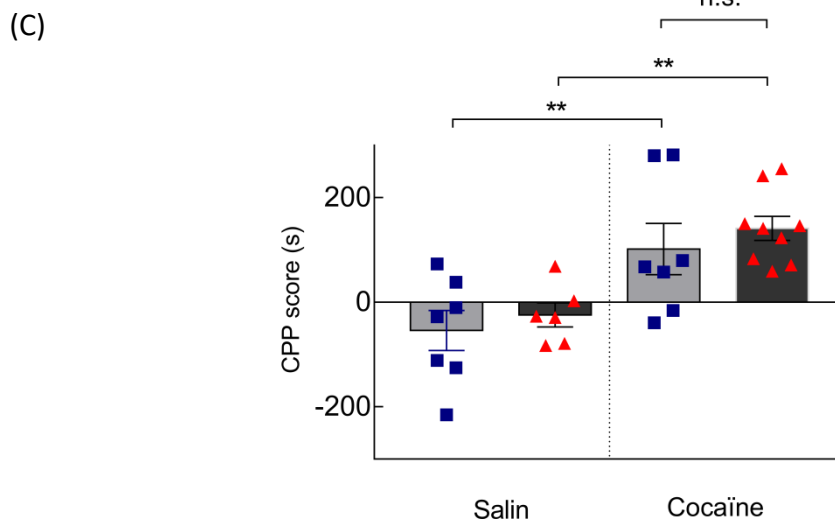


Figure 37 : Les souris dépourvues d'interneurones somatostatine du *striatum* présentent une augmentation de la locomotion induite par la cocaïne sans toutefois présenter de modification de la préférence pour le compartiment où la cocaïne est injectée. (A) Lors du test de sensibilité à la cocaïne, les souris ont été successivement soumises à des injections quotidiennes de solution saline (phase d'habituation, 3 jours), de doses croissantes de cocaïne (1 et 5 mg/kg, phase d'évaluation de la sensibilité à la cocaïne) et enfin de doses constantes de cocaïne (20 mg/kg, phase de sensibilisation, 3 jours). Aucune différence entre les deux groupes n'est détectée lors des phases d'habituation et d'évaluation de la sensibilité à des doses suboptimales de 1 et 5 mg/kg. Une ANOVA à deux voies à mesures répétées, suivie d'un test de comparaison multiple de Sidak, met en évidence une différence significative entre les deux groupes lors de la phase de sensibilisation (n=10-14, avec  $p=0.0148^*$  pour l'effet du génotype,  $p<0.0001^{***}$  pour le facteur temps). (B) Par contre, aucune différence de l'indice stéréotypique n'est observée, lors de l'étude des stéréotypies mesurées sur les 10 dernières minutes des enregistrements vidéos de l'injection saline, de 5mg/kg de cocaïne ou de la première injection de 20 mg/kg de cocaïne (n=10-14, ANOVA à deux voies à mesures répétées où  $p<0.0001^{***}$  pour le facteur temps). (C) Lors du test de préférence de place conditionné, les deux groupes présentent un conditionnement similaire de préférence de place à la cocaïne (n= 6-9, ANOVA à deux voies avec  $p = 0.0001^{**}$  pour l'effet de la cocaïne et  $p>0.05$  pour le facteur génotype et l'interaction génotype x effet de la cocaïne).

L'analyse de l'indice stéréotypique correspondant à la somme des toilettages et des redressements sur les pattes arrière, qui sont réalisés de manière répétée lors de la prise de cocaïne, n'a par contre pas montré de différence entre les deux groupes. L'indice de stéréotypies a été mesuré sur les 10 dernières minutes des enregistrements vidéos de l'injection saline, de l'injection des 5mg/kg de cocaïne ou de la première injection de 20 mg/kg de cocaïne (Figure 37B, n=10-14, ANOVA à deux voies à mesures répétées où  $p < 0.0001^{***}$  pour le facteur temps et  $p = 0.3946$  pour le facteur génotype).

Il semble donc que l'ablation des interneurons SST du *striatum* induit une augmentation de la réponse locomotrice à la cocaïne, aussi bien lors de l'injection aiguë (1<sup>ère</sup> injection de 20 mg/kg, les souris sont donc plus sensibles à cette dose) que lors de l'injection chronique, supérieure à celle naturellement observée chez les souris contrôles, mais que celle-ci n'altère pas la sensibilité aux doses de 1 et 5 mg/kg ni le nombre de stéréotypies.

Afin de déterminer si les propriétés motivationnelles de la cocaïne sont également modifiées par la perte de cette population de neurones, nous avons également procédé à un conditionnement de préférence de place. Ce test consiste à évaluer la préférence d'une souris pour un compartiment (reconnaissable par les motifs au mur et la texture du sol) suite à de multiples injections de cocaïne, réalisées au préalable dans celui-ci (phase de conditionnement). Ceci s'opère après une phase de pré-conditionnement permettant d'évaluer la préférence naturelle pour l'un des deux compartiments et consiste à soustraire ce temps de préférence naturelle au temps qu'elles y ont passé, lors de la phase de post-conditionnement. Les souris SST-Cre<sup>+/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup> et leurs contrôles SST-Cre<sup>-/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup> présentent une préférence pour le compartiment où elles ont reçu la cocaïne (Figure, n= 6-9, ANOVA à deux voies avec  $p = 0.0001^{**}$  pour l'effet de la cocaïne). De plus, cette préférence est similaire entre les deux groupes (Figure 37C, n= 6-9, ANOVA à deux voies avec  $p = 0.3320$  pour l'effet du génotype). Cependant, afin de valider ces résultats, nous avons vérifié que l'activité locomotrice, lors du test de post-conditionnement, était bien semblable dans les deux groupes injectés à la cocaïne, ce qui est bien le cas (graphe non représenté, n=6-9, test de Mann-Whitney,  $p = 0.5360$ ).

Nous pouvons donc conclure que l'ablation striatale des interneurons SST n'altère pas la propriété motivationnelle induite par la cocaïne.



## 5.2 *L'ablation des interneurons somatostatine du striatum n'affecte pas le toilettage ou la locomotion induits par l'agoniste du récepteur de la dopamine D1, SKF-38393, ni la catalepsie induite par l'halopéridol*

Suite au phénotype observé lors du test de sensibilisation à la cocaïne, et sachant que les deux populations de neurones de projection du *striatum*, exprimant respectivement les récepteurs D1 et D2 de la dopamine sont toutes deux impliquées dans l'établissement de la réponse locomotrice induite par l'injection de cocaïne (Chausmer et al. 2002; Hummel & Ellen M. Unterwald 2002; Tobón et al. 2015), des tests faisant intervenir des agents pharmacologiques, ciblant l'un de ces deux récepteurs ont été effectués.

Dans un premier temps, l'analyse de la durée du toilettage ou de la locomotion, lors de l'administration de SKF-38393, un agoniste du récepteur D1, a été réalisée. Plus précisément, ce test a consisté en l'injection d'une dose de 10 mg/kg de SKF-38393 et en la mesure du temps passé à se nettoyer ainsi que de la distance parcourue. En effet, la durée du toilettage et la locomotion sont augmentées lors d'une injection de cet agoniste (Zarrindast et al. 1991; Zike et al. 2017). Nous observons bien une telle augmentation (Figure 38A-B, n=7-9, ANOVA à deux voies avec  $p < 0.05^*$  pour le facteur temps) se présentant avec une durée et une distance semblables entre les deux groupes (Figure 38A, n=7-9, ANOVA à deux voies avec  $p > 0.05$  pour le facteur génotype).

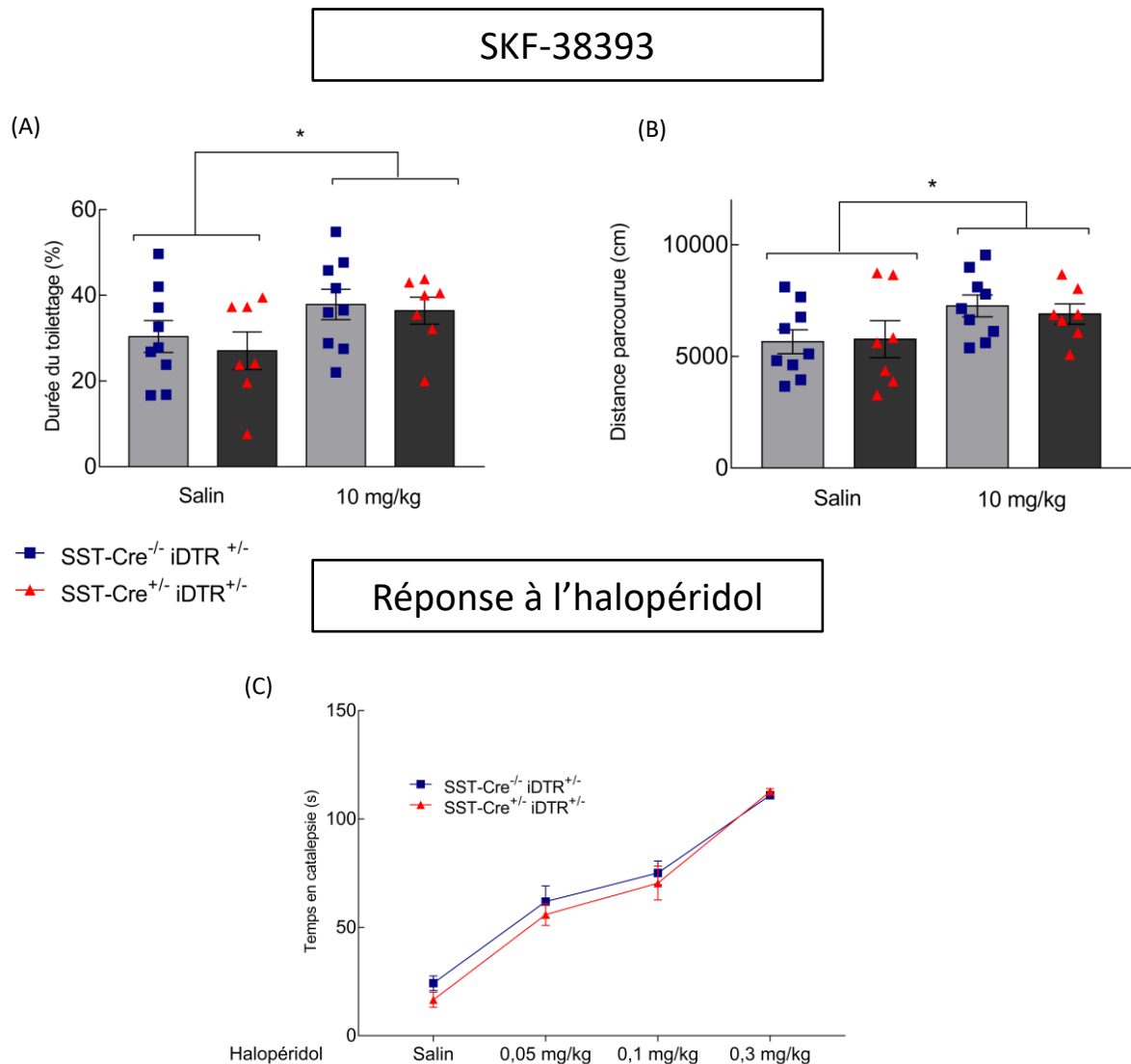


Figure 38 : L'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* ne modifie pas les réponses aux molécules ciblant les récepteurs de la dopamine D1 ou D2, à savoir le SKF-38393 ou l'halopéridol (A) L'injection de SKF-38393, agoniste du récepteur D1, induit un toilettage dont la durée est semblable entre les deux groupes de souris (n=7-9, ANOVA à deux voies avec  $p=0,8053$  pour le facteur génotype et  $p=0.0336^*$  pour le facteur temps). (B) Quant à l'augmentation de la locomotion, celle-ci est également similaire (n=7-9, ANOVA à deux voies avec  $p=0,6861$  pour le facteur génotype et  $p=0.0271^*$  pour le facteur temps). (C) L'effet de doses croissantes d'halopéridol a été évalué en observant le niveau de catalepsie induit chez les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>. Les deux groupes présentent une réponse similaire à l'halopéridol (n=7-9, ANOVA à deux voies à mesures répétées avec  $p<0.001^{***}$  pour le facteur temps).

Un test de catalepsie induite par l'halopéridol a également été réalisé. La catalepsie se définit comme une incapacité pour la souris à corriger une posture imposée, à savoir le placement des pattes antérieures sur une barre horizontale surélevée en verre. Celle-ci peut être déclenchée par une injection d'halopéridol, un antagoniste du récepteur D2 de la dopamine. En effet, en sa présence, le récepteur D2 est bloqué et entraîne un déséquilibre

entre la voie de signalisation initiée par le récepteur A<sub>2A</sub> de l'adénosine et la voie de signalisation du récepteur de la dopamine D<sub>2</sub>, tous deux exprimés par les neurones de la voie indirecte. Il s'en suit une élévation d'AMPC dans ces neurones striatopallidaux qui se caractérise par le développement du comportement cataleptique. Tout comme dans le test de sensibilisation à la cocaïne et ce, afin de mettre en évidence une modification potentielle de la sensibilité à l'halopéridol, les souris ont été injectées avec des doses croissantes d'halopéridol de respectivement 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg et 0.3 mg/kg. La catalepsie induite a alors été quantifiée 1h après chaque injection. Les résultats obtenus nous montrent que les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> présentent une réponse cataleptique à l'halopéridol similaire que celle observée dans le groupe contrôle (Figure 38C, n=7-9, ANOVA à deux voies à mesures répétées avec p=0.4615 pour le facteur génotype et p<0.0001\*\*\* pour le facteur temps). Ceci démontre également que les souris porteuses d'une ablation des interneurons somatostatine du *striatum* présentent une même sensibilité à l'halopéridol, quelle que soit la dose.

Suite à ces deux tests, nous observons que la perte striatale des interneurons SST n'affecte pas les réponses comportementales aux molécules ciblant les récepteurs D<sub>1</sub> ou D<sub>2</sub>.

## **6. Expression protéique de marqueurs dopaminergiques après traitement chronique à la cocaïne**

### *6.1 L'ablation des interneurons somatostatine du striatum modifie l'expression du transporteur de la dopamine*

La perte des neurones SST du *striatum* semblant altérer la réponse à la cocaïne, il a paru intéressant d'étudier l'effet de cette ablation sur l'expression de différents marqueurs dopaminergiques impliqués dans la réponse à la cocaïne. Dans ce but, des expériences de Western blot ont été réalisées à partir de lysats protéiques de *striatum* dorsal et ventral de souris Sst Cre<sup>+/-</sup> et Sst Cre<sup>-/-</sup> ayant toutes subi des injections de toxine diphtérique et ayant reçu ou non des doses répétées de cocaïne (des injections salines ont été réalisées en l'absence d'injection de cocaïne).

Des marquages pour le transporteur de la dopamine DAT et pour le récepteur D<sub>1</sub> de la dopamine ont été réalisés. Les bandes obtenues ont été quantifiées et normalisées par

rapport à la protéine GAPDH pour les différents traitements. Les résultats ont ensuite été normalisés par rapport au niveau obtenu dans les souris contrôles Sst-Cre<sup>-/-</sup> non traitées.

La comparaison des souris non traitées à la cocaïne montre que le niveau d'expression de transporteur DAT est différent entre les groupes de souris Sst-Cre<sup>+/-</sup> et Sst-Cre<sup>-/-</sup>, démontrant que l'ablation des interneurons SST du *striatum* modifie cette expression. En effet, nous observons un niveau d'expression significativement supérieur dans le *striatum* dorsal et une forte tendance dans le *striatum* ventral (Figure 39A-B n= 4-6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100,  $p_{\text{dorsal}} = 0.0457^*$  et  $p_{\text{ventral}} = 0.0671$ ). Aucune différence significative de l'expression du récepteur D1 n'est par contre observée (Figure 39C-D n= 5-6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100,  $p_{\text{dorsal}} = 0.2960$  et  $p_{\text{ventral}} = 0.5889$ ).

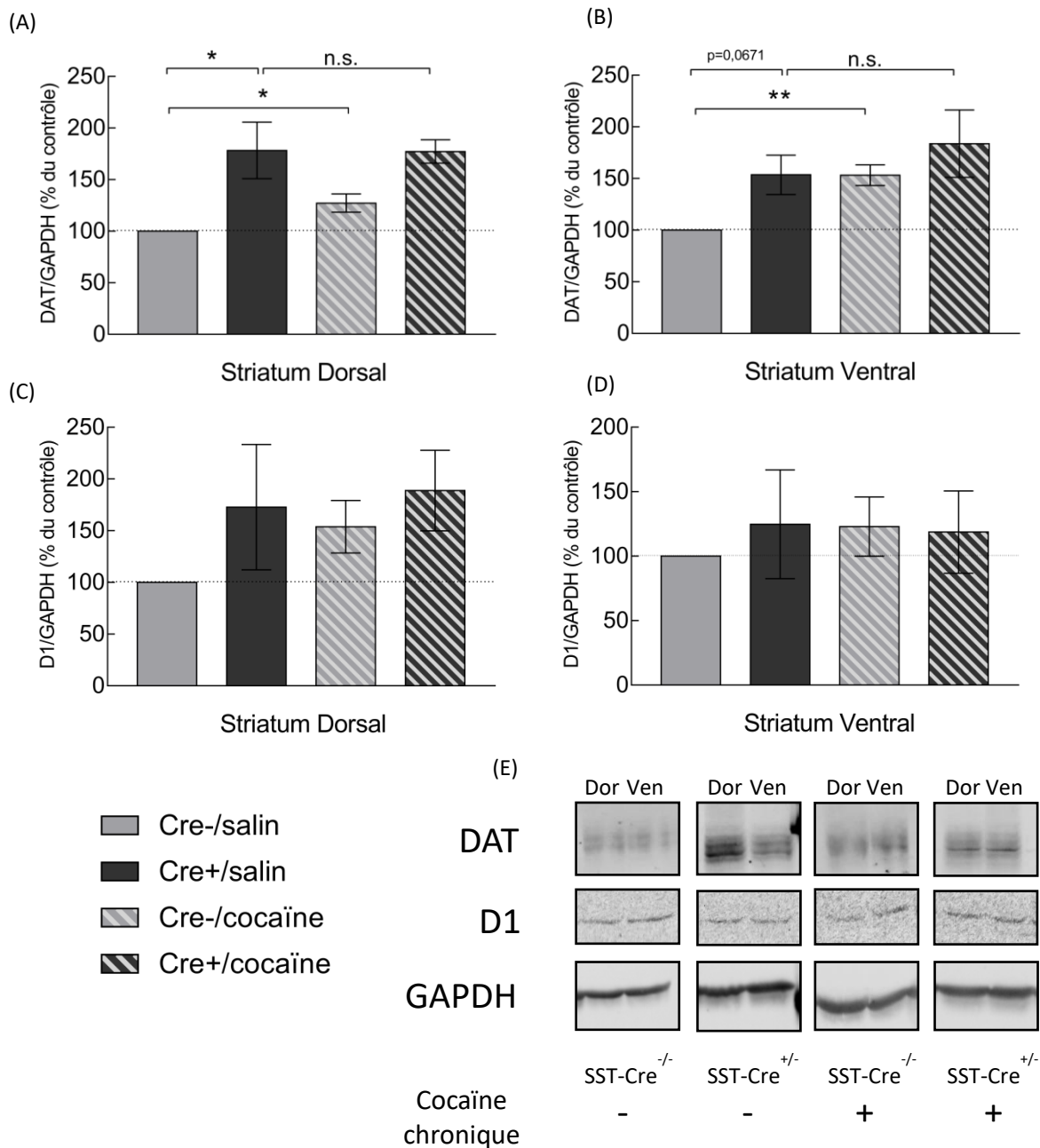


Figure 39 : L'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* modifie l'expression du transporteur de la dopamine DAT. (A-B) Des expériences de Western blot réalisées à partir de lysats de *striatum* dorsal et ventral montrent une augmentation de l'expression de DAT dans le *striatum* des souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> par rapport au SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (n=4-6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100, p<0.05\*). D'autre part, l'unique administration chronique de cocaïne (20 mg/kg) induit aussi une augmentation de l'expression de DAT dans le *striatum* des souris contrôles (n=4-6, test t unilatéral, p<0,05\*, p<0,01\*\*). Cependant, l'administration chronique de cocaïne n'induit pas d'augmentation significative chez les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> par rapport à des souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> non traitées à la cocaïne (n=4-6, test t unilatéral, p>0,05). (C-D) L'expression du récepteur de la dopamine D1 ne montre aucune différence significative entre les échantillons des souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> qu'elles aient été traitées ou non à la cocaïne (n=5-6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100, p>0,05).

Le traitement chronique à la cocaïne (observé en normalisant les quantifications obtenues dans le groupe Sst-Cre<sup>-/-</sup> traitées à la cocaïne avec celles des souris Sst-Cre<sup>-/-</sup> traitées avec une solution saline) augmente l'expression de DAT aussi bien dans le *striatum* dorsal que dans le *striatum* ventral (Figure A-B n=5-6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100,  $p_{\text{dorsal}} = 0.0275^*$   $p_{\text{ventral}} = 0.0060^{**}$ ), confirmant des données préalablement obtenues au laboratoire (Karadurmus D. et al., en soumission). Une tendance non significative à l'augmentation est également observée dans le *striatum* dorsal pour le récepteur D1 (Figure C-D n=5-6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 100,  $p_{\text{dorsal}} = 0.0882$   $p_{\text{ventral}} = 0.3663$ ).

Par contre, l'expression de DAT n'est pas modifiée chez les souris Sst-Cre<sup>+/-</sup> traitées chroniquement par de la cocaïne par rapport aux mêmes souris traitées avec la solution saline (Figure A-B n=6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 178.3  $p_{\text{dorsal}} = 0.9307$  ; et de 153.6  $p_{\text{ventral}} = 0.3965$ ). Il en est de même pour le récepteur D1 (Figure C-D, n=6, test t unilatéral en comparaison à une valeur théorique de 172.8  $p_{\text{dorsal}} = 0,6988$ ; et de 124.8  $p_{\text{ventral}} = 0.8559$ ).

Nous pouvons donc conclure que l'ablation striatale des interneurons somatostatine induit une augmentation de l'expression du transporteur de la dopamine et que celle-ci n'est pas additive avec l'augmentation d'expression induite par la cocaïne.

## **7. Modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones de projection du *striatum* après traitement chronique à la cocaïne**

*7.1 Les MSNs des souris dépourvues d'interneurones somatostatine du striatum chroniquement traitées à la cocaïne présentent une augmentation de la vitesse de repolarisation de leur potentiel d'action et de leur excitabilité en présence de dopamine, sans modification de leurs propriétés passives et des autres paramètres du potentiel d'action.*

L'injection répétée de cocaïne modifie différemment l'activité locomotrice des souris dépourvues de neurones SST par rapport aux souris contrôles (cf. chapitre 5.1 Résultats). Pour tenter d'élucider le mécanisme sous-jacent à cette observation, nous avons voulu déterminer si les propriétés électrophysiologiques des MSNs diffèrent entre les deux groupes de souris sensibilisées à la cocaïne. Dans ce but, nous avons préalablement mimé le

modèle utilisé dans l'étude comportementale par un traitement de 3 jours par 20mg/kg de cocaïne chez des souris dépourvues ou non d'interneurones SST striataux, et prélevé des tranches de cerveau en survie pour les enregistrements électrophysiologiques. En analysant les propriétés membranaires passives et les potentiels d'action, nous observons que la capacité membranaire et le RMP ne sont pas différents entre les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et les souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (Tableau, n=10, test de Mann-Whitney, p>0.05) et que seule la vitesse de repolarisation du potentiel d'action est significativement réduite par rapport au groupe contrôle (Tableau, n=10, test de Mann-Whitney, p=0.0288\*).

Propriétés passives	Cre-/Toxine (N=10)	Cre+/Toxine (N=10)	Valeur de p
Capacitance (pF)	66,89 ± 4,78	69,29 ± 7,40	p = 0,9705
Potentiel membranaire de repos (mV)	-78,70 ± 1,21	-77,7 ± 1,33	p = 0,6649
Propriétés actives	Cre-/Toxine (N=10)	Cre+/Toxine (N=10)	Valeur de p
Rhéobase (pA)	146,00 ± 6,70	158,00 ± 6,30	p = 0,1944
V seuil (mV)	-41,56 ± 2,06	-39,52 ± 2,57	p = 0, 5288
Coefficient d'adaptation	1,02 ± 0,03	0,97 ± 0,04	p = 0,3930
Amplitude (mV)	123,60 ± 13,95	134,20 ± 17,56	p = 0,7253
V max (mV)	42,52 ± 1,67	40,04 ± 2,06	p = 0,5288
Durée du potentiel d'action (ms)	55,90 ± 1,41	59,4 ± 2,51	p = 0,2536
Amplitude AHP (mV)	-40,03 ± 3,01	-36,95 ± 2,45	p = 0,7542
Vitesse de dépolarisation (mV/ms)	103,80 ± 6,20	115,10 ± 12,25	p = 0,5787
Vitesse de repolarisation (mV/ms)	-37,75 ± 2,57	-25,98 ± 3,46	p = 0,0288*

Tableau 7 : Paramètres analysés lors des enregistrements électrophysiologiques des MSNs chez des souris SST-Cre iDTR<sup>+/-</sup>, après injection striatale bilatérale de DT, et traitées à la cocaïne (20mg/kg) durant 3 jours successifs.

De plus, les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> présentent une excitabilité similaire après ce traitement chronique à la cocaïne (Figure 40, n=6-8, ANOVA à deux voies, p=0.7006 pour le génotype et p<0.0001\*\*\* pour le facteur courant injecté).

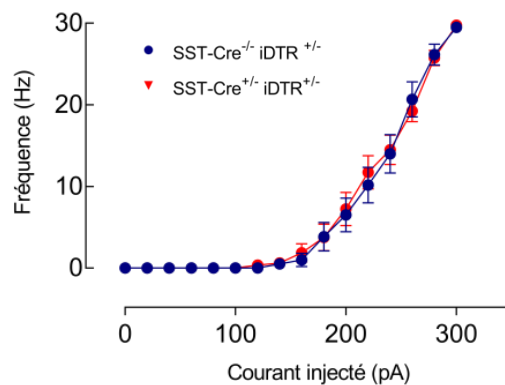


Figure 40 : Les MSNs des souris dépourvues d'interneurones somatostatine du *striatum* et traitées à la cocaïne présentent une excitabilité similaire au groupe contrôle également traité à la cocaïne (n=6-8, ANOVA à deux voies,  $p > 0.05$  pour le facteur génotype et l'interaction et  $p < 0.0001^{***}$  pour le facteur courant injecté)

Sachant que la cocaïne a pour cible le transporteur DAT et donc le système dopaminergique, il nous est apparu intéressant d'étudier l'effet de la dopamine sur ces paramètres en l'ajoutant au milieu extracellulaire. Nous avons dès lors observé que l'ajout de dopamine ne modifie pas la rhéobase des souris contrôles SST<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (Figure 41A, n=6-8, test de Mann-Whitney,  $p=0.5152$ ) mais que celle-ci réduit la rhéobase des souris SST<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> de façon significative (Figure 41B, n=6-8, test de Mann-Whitney,  $p=0.0023^{**}$ ). De plus, la comparaison des deux groupes en présence de 5  $\mu$ M de dopamine met en évidence une différence significative de la rhéobase, celle des SST<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> étant inférieure à celle des SST<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (Figure 41C, n=6-8, test de Mann-Whitney,  $p=0,0190^*$ ). D'autre part, la courbe de fréquence des potentiels d'action en fonction du courant injecté montre une réduction significative de l'excitabilité chez les souris contrôles en présence de 5  $\mu$ M de dopamine (Figure 41D, n=6-8, ANOVA à deux voies,  $p=0.0275^*$  pour le facteur génotype et  $p < 0.0001^{***}$  pour le courant injecté et l'interaction), alors que l'excitabilité est significativement augmentée suite à l'ajout de dopamine, chez les souris dépourvues d'interneurones SST et sensibilisées (Figure 41E, n=6-8, ANOVA à deux voies,  $p < 0.0001^{***}$  pour le facteur génotype, le courant injecté et l'interaction). La comparaison des deux groupes montre que les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> sensibilisées à la cocaïne possèdent des MSNs significativement plus excitables que les MSNs des souris contrôles, en présence de dopamine (Figure 41F, n=6-8, ANOVA à deux voies,  $p < 0.0001^{***}$  pour le facteur génotype, courant injecté et l'interaction).



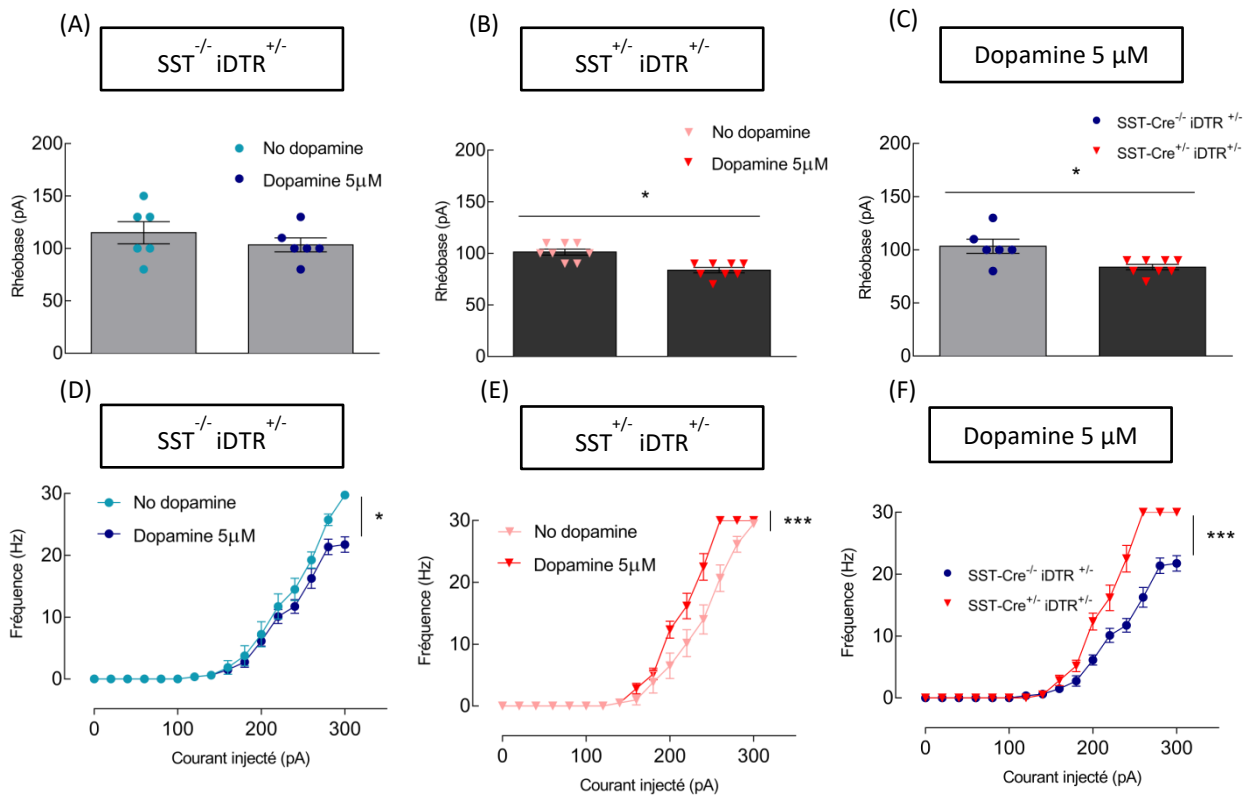


Figure 41 : Les MSNs des souris dépourvues d'interneurones somatostatine du *striatum* et traitées à la cocaïne sont plus excitables suite à l'ajout de dopamine dans le milieu extracellulaire. (A) L'ajout de 5μM de dopamine dans le milieu ne modifie pas la rhéobase des MSNs des souris SST<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> ayant subi une injection de cocaïne durant 3 jours successifs (n=6-8, test de Mann-Whitney, p=0.5152). (B) L'ajout de 5μM de dopamine réduit par contre la rhéobase des MSNs des souris SST<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> sensibilisées (B, n=6-8, test de Mann-Whitney, p=0.0023\*\*). (C) Les MSNs des souris dépourvues d'interneurones somatostatine du *striatum* et traitées à la cocaïne possèdent une rhéobase inférieure à celle des MSNs du groupe contrôle suite à l'ajout de dopamine dans le milieu extracellulaire. (D) L'excitabilité des MSNs, suite à l'ajout de 5 μM de dopamine chez les souris contrôles, diminue (n=6-8, ANOVA à deux voies, p=0.0275\* pour le facteur génotype et p<0.0001\*\*\* pour le courant injecté et l'interaction). (E) L'excitabilité des MSNs, suite à l'ajout de 5 μM de dopamine chez les souris SST<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>, augmente (n=6-8, ANOVA à deux voies, p<0.0001\*\*\* pour le facteur génotype, le courant injecté et l'interaction). (F) Les MSNs des souris dépourvues d'interneurones somatostatine du *striatum* et traitées à la cocaïne sont plus excitables, suite à l'ajout de dopamine dans le milieu que les MSNs des souris contrôles (n=6-8, ANOVA à deux voies, p<0.0001\*\*\* pour le facteur génotype, courant injecté et l'interaction).

Suite à ces différentes observations, nous pouvons conclure que, de manière remarquable, en présence de dopamine, les MSNs des souris dépourvues de PLTS striataux et sensibilisées à la cocaïne, présentent une augmentation de l'excitabilité intrinsèque, excitabilité qui est supérieure à celle des souris contrôle sensibilisées. Par ailleurs, les MSNs des souris dépourvues de PLTS striataux et sensibilisées à la cocaïne présentent des

potentiels d'action se caractérisant par une réduction de la vitesse de repolarisation, sans modification des propriétés membranaires passives.

## **8. Modifications de la morphologie des neurones de projection du *striatum* après traitement chronique à la cocaïne**

Nous avons ensuite voulu savoir si, dans ce modèle de souris dépourvues d'interneurones SST et sensibilisé à la cocaïne, la morphologie des MSNs avait été affectée et pourrait être à l'origine des différences électrophysiologiques observées.

*8.1 Les MSN des souris dépourvues d'interneurones somatostatine du striatum chroniquement traitées à la cocaïne ne présentent pas de différence notable de leur arborisation dendritique mais bien une réduction de la densité des épines dendritiques.*

Nous avons ainsi observé que ces souris injectées de façon chronique à la cocaïne possédaient une arborisation dendritique similaire que les souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup>. Ainsi, l'occupation dans l'espace du neurone, le volume et l'aire du soma, la longueur totale de l'arborisation et la longueur du plus long dendrite sont semblables dans les deux groupes (Figure 41B-F, n=5-7, test de Mann-Whitney, p>0.05). Il en est de même pour la longueur des dendrites des différents niveaux (Figure 41G, n=5-7, test t multiple, p>0.05 pour chaque niveau) et pour l'analyse de Sholl (Figure 41H, n=5-7, test de Mann-Whitney, p=0.8763).

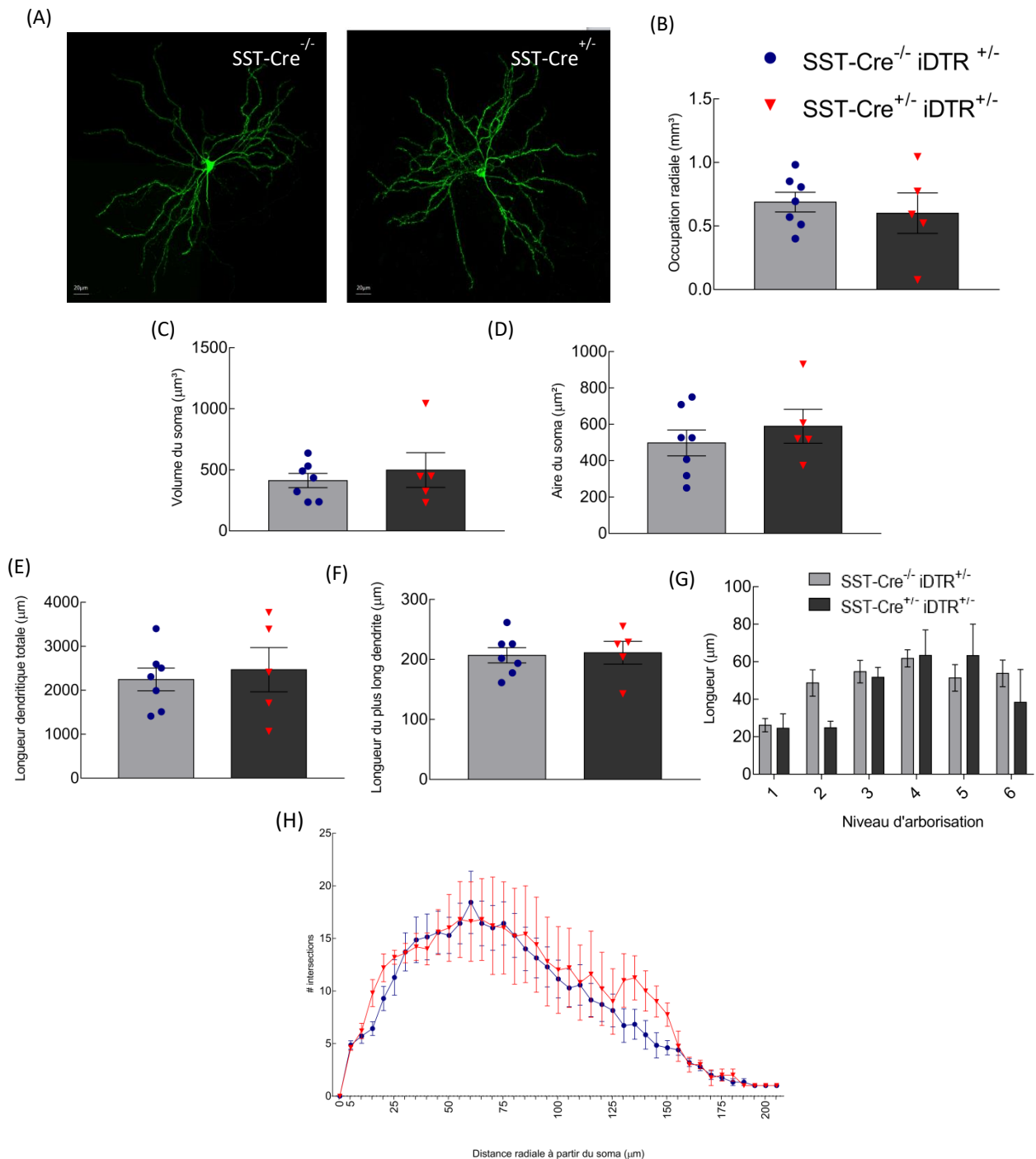


Figure 42 : Les souris ayant subi l'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* ne présentent pas de différence de l'arborisation dendritique des MSNs par rapport à des souris contrôles suite à des injections répétées de cocaïne. (A) Projection en z selon l'intensité maximale d'images acquises en microscopie confocal de MSNs de souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> après injection striatale bilatérale de DT et ayant subi des injections de cocaïne (20 mg/kg) durant 3 jours successifs. Barre d'échelle : 20 μm. (B-H) L'analyse de l'occupation dans l'espace du neurone reconstruit (B, n=5-7, test de Mann-Whitney, p>0.05), du volume du soma (C, n=5-7, test de Mann-Whitney, p>0.05) de l'aire du soma (D, n=5-7, test de Mann-Whitney, p>0.05), de la longueur totale des dendrites (E, n= 5-7, test de Mann-Whitney, p>0.05), de la longueur du plus long dendrite (F, n=5-7, test de Mann-Whitney, p>0.05), de la longueur des segments dendritiques en fonction de leur ordre hiérarchique (G, n=5-7, test t multiple, p>0.05 pour chaque niveau) ainsi que l'analyse tridimensionnelle de Sholl (H n=5-7, test de Mann-Whitney, p>0.05) des neurones reconstruits ne montre pas de différence entre les groupes.

Le volume et l'aire dendritique totale (Figure 42A-B, n=5-7, test de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ) ainsi que le volume des dendrites des différents niveaux (Figure 42C, n=5-7, test t multiple,  $p > 0.05$  pour chaque niveau) sont également similaires. Une différence est toutefois observée à l'échelle des épines dendritiques puisque les densités proximale et distale sont réduites chez les souris dépourvues d'interneurones somatostatine par rapport aux contrôles (Figure 42E, n = 9-19, test de Mann-Whitney,  $p_{\text{proximal}} = 0.048^*$  et  $p_{\text{distal}} = 0.0177^*$ ).

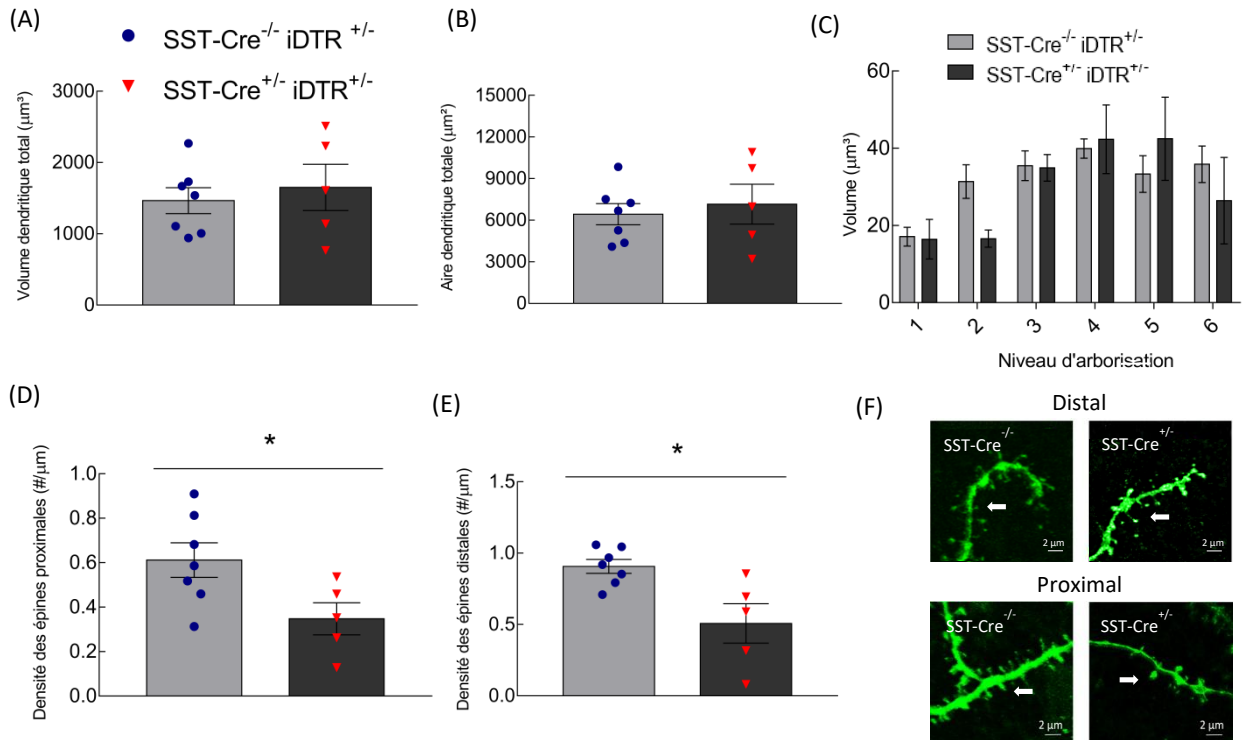


Figure 43 : Les souris dépourvues en interneurones somatostatine du *striatum* présentent une réduction de la densité des épines dendritiques des MSNs par rapport à des souris contrôles lorsque celles-ci sont soumises à des injections chroniques de cocaïne (A-C) L'analyse du volume dendritique total et de l'aire dendritique totale des MSNs de souris SST-Cre<sup>-/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> et SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> après injection striatale bilatérale de DT et traitement chronique à la cocaïne (20 mg/kg) ne montre pas de différence significative (A-B, n=5-7, test de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ). De même, le volume des segments dendritiques en fonction de leur ordre hiérarchique ne diffère pas de façon significative entre les groupes (C, n=5-7, test t multiple,  $p > 0.05$  pour chaque niveau). (D-F) Cependant, la densité des épines dendritiques sur les portions proximales et distales des dendrites est réduite chez les souris SST-Cre<sup>+/-</sup> iDTR<sup>+/-</sup> (D-F, n=5-7, test de Mann-Whitney,  $p < 0.05^*$ ). (F) Projection en z selon l'intensité maximale acquises en microscopie confocale de portions dendritiques distales et proximales. Les flèches indiquent des épines dendritiques. Barre d'échelle : 2 µm.

Les MSNs des souris dépourvues d'interneurones somatostatine du *striatum* et sensibilisées à la cocaïne possèdent donc une arborisation dendritique similaire aux MSNs des souris contrôles et également sensibilisées mais présentent une réduction des densités proximale et distale des épines dendritiques.

# CHAPITRE 5 :

## DISCUSSION

## **1. Validation du modèle d'ablation des interneurons somatostatine du *striatum* après injection striatale de toxine diphtérique**

Afin d'étudier la fonction des interneurons SST striataux, nous avons réalisé une ablation spécifique de ceux-ci dans le *striatum*. La première partie de ce travail a donc visé à valider le modèle. Cette validation a été réalisée à l'aide d'un immunomarquage de la somatostatine qui a permis de comptabiliser le nombre de cellules somatostatine-positives dans le *striatum* et dans le cortex. De la sorte, nous avons pu confirmer que le protocole choisi induit une ablation de plus de 95% des interneurons SST du *striatum* dorsal et d'environ 70% des interneurons SST du *striatum* ventral. De plus, ce protocole n'affecte pas la région corticale sus-jacente au *striatum* où le nombre d'interneurons SST a également été quantifié. Ce même immunomarquage de validation a été utilisé après chaque série d'expériences et a dès lors permis d'éliminer les souris qui présentaient une ablation inférieure à 90% dans le *striatum* dorsal ou non spécifique à la région striatale.

Des immunomarcages (DARPP-32, ChAT, PV et CR), permettant d'identifier les différentes autres populations neuronales du *striatum*, ont également été réalisés et ont confirmé que l'ablation est bien spécifique aux interneurons SST, validant dès lors que les phénotypes observés ne sont pas le résultat de la perte de neurones d'une de ces populations.

## **2. Modifications des propriétés physiologiques et de la morphologie des neurones de projection du *striatum***

Différentes observations suggèrent qu'il existe une connexion fonctionnelle entre les interneurons SST et les neurones de projection du *striatum*. En effet, la présence de synapses entre les terminaisons axonales des interneurons SST et les neurones épineux a été observée au microscope électronique (Vuillet et al. 1989) et des enregistrements électrophysiologiques, réalisés sur des MSNs, révèlent que l'addition de SST sur tranches de cerveau en survie module le patron de décharge de ces neurones (Galarraga et al. 2007). Ceci a été confirmé par de récents enregistrements électrophysiologiques qui mettent en évidence que les interneurons SST peuvent induire des courants post-synaptiques inhibiteurs dans les neurones de projection (Straub et al. 2016). Compte tenu de ces

différentes observations, nous avons étudié l'effet de la perte striatale de ces interneurons sur l'activité électrique des MSNs.

Les enregistrements électrophysiologiques mettent en évidence que l'ablation des interneurons SST du *striatum* augmente le potentiel membranaire de repos des MSNs ainsi que leur excitabilité intrinsèque. Cette observation pourrait être le résultat de la levée d'inhibition que les interneurons SST exercent sur les MSNs par l'intermédiaire du GABA. En effet, il s'avère que les interneurons SST, avec l'aide d'autres types d'interneurons GABAergiques, exercent une inhibition directe, de type « feedforward », sur les MSNs, qui permet de moduler la sortie striatale (Tepper et al. 2008). Cette inhibition GABAergique est la combinaison de deux composantes inhibitrice : l'une rapide et l'autre lente. La composante inhibitrice de type lente contrôle l'excitabilité des MSNs et implique des récepteurs du GABA localisés dans la région extrasynaptique (Luo et al. 2013). De plus, le GABA peut induire une hyperpolarisation du potentiel membranaire, comme mis en évidence lors d'enregistrements de neurones de l'*hypothalamus* (Bhattarai et al. 2011). Ces différents éléments permettent donc de proposer que l'ablation des interneurons SST du *striatum* et la perte de cette inhibition GABAergique puissent être à l'origine des modifications des propriétés électriques observées.

En parallèle, de nombreuses études pharmacologiques, consistant en l'application sur tranche de SST ou de NPY, montrent un effet hyperpolarisant de ces neuropeptides sur les neurones de l'hippocampe (Hu et al. 2017), du *thalamus* (Sun et al. 2001) ou de l'amygdale (Sosulina et al. 2008), ainsi qu'une diminution d'excitabilité de ces trois populations de neurones. Cet effet serait principalement médié par les récepteurs sst-2, pour la somatostatine et Y1, pour le NPY, aboutissant à l'activation de canaux GIRK (pour la SST et NPY) ou Kv7 (pour la SST), augmentant ainsi la conductance pour les ions potassium. Par ailleurs, une expression abondante de récepteurs sst-2 a été mise en évidence dans les MSNs du *striatum* dorsal, par RT-PCR semi-quantitative (Galarraga et al. 2007), tandis que le récepteur Y1 est également exprimé dans le *striatum* et particulièrement dans les MSNs du noyau accumbens (van den Heuvel et al. 2015). Cependant, seule une faible expression de GIRK 1 et 3 est observée dans le *striatum* (Karschin et al., 1996) alors que l'expression des canaux Kv7 a été confirmée par RT-PCR (Shen et al., 2005). Ceci suggérerait donc plutôt un rôle de la SST dans le phénotype observé et ce car la perte des interneurons SST dans le

modèle d'ablation, est probablement associé à une réduction de la quantité de ces neuropeptides dans le *striatum*, menant donc à une diminution de l'activation de ces récepteurs. Celle-ci pourrait dès lors diminuer l'activité des canaux potassiques Kv7 et se traduire par une dépolarisation des MSNs et une augmentation de leur excitabilité, comme nous l'observons dans le modèle d'ablation des interneurons SST. Le rétablissement du potentiel et de l'excitabilité suite à l'addition de SST sur tranches de cerveaux de souris dépourvues d'interneurones et ce en présence ou non de linopirdine, un antagoniste pour les canaux Kv7, permettrait de confirmer cette hypothèse (Hu et al., 2017)

De plus, une étude consistant en l'application de SST sur tranche de *striatum*, met en évidence une modification de l'AHP, accélérant sa composante initiale et réduisant sa composante finale et ceci, en agissant sur des canaux potassium de type SK (= « Small conductance ») et BK (= « Large conductance »). Cette modification pourrait être corrélée avec la tendance à la diminution de l'AHP des potentiels d'action qui est observée dans les MSNs en situation d'ablation des interneurons (Galarraga et al. 2007).

Cependant, il est important de mentionner qu'une connexion fonctionnelle entre les interneurons SST et les interneurons cholinergiques a également été décrite et pourrait donc indirectement affecter les propriétés électriques des MSNs. En effet, l'activation des interneurons SST peut générer des iPSCs dans les interneurons cholinergiques du *striatum* (Straub et al. 2016). Par ailleurs, la stimulation optogénétique des interneurons cholinergiques se caractérise par une réduction de l'AHP et une augmentation de l'excitabilité intrinsèque des MSNs, via le récepteur muscarinique M1 (Lv et al. 2017). L'ablation des interneurons SST striataux pourrait, par conséquent, être à l'origine d'une levée d'inhibition sur les interneurons cholinergiques, qui se traduirait par une activation des interneurons cholinergiques, une libération d'acétylcholine et une augmentation de l'excitabilité des MSNs.

Les données de la littérature nous indiquent donc que, via les différents neurotransmetteurs qu'ils libèrent, GABA, SST et NPY, les interneurons SST peuvent directement réguler le potentiel membranaire de repos des MSNs ainsi que leur excitabilité intrinsèque, les modifications observées en cas d'ablation de ces interneurons ne pouvant toutefois pas être attribuées précisément à l'un ou à l'autre de ces neurotransmetteurs. De



plus, un effet via le NO semble moins probable compte tenu que l'infusion intrastriatale de celui-ci est associée à une augmentation de l'excitabilité des MSNs (Wise & Grace, 1999). Un effet indirect impliquant la connexion entre les interneurons SST et les interneurons cholinergiques pourrait par contre également participer au phénotype observé. Ceci pourra notamment être confirmé par l'enregistrement électrophysiologique des interneurons cholinergiques des souris dépourvues d'interneurons SST et par le retour à une excitabilité semblable à celle des contrôles en présence d'un antagoniste du récepteur M1.

Les différences électrophysiologiques observées s'accompagnent de modifications morphologiques démontrées par reconstruction tridimensionnelle des neurones. Celle-ci montre une réduction de la densité des épines dendritiques distales des MSNs des souris SST<sup>+/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup>, qui pourrait être le résultat d'un mécanisme d'homéostasie synaptique. En effet, les épines dendritiques constituent le principal site d'entrées synaptiques se caractérisant par une importante plasticité (Fiala et al. 2002; Adrian et al. 2014). Elles sont la cible de la majorité des afférences excitatrices des MSNs (Lanciego et al. 2012) et peuvent être sous l'influence d'un mécanisme d'homéostasie, permettant de maintenir l'activité du réseau dans un état optimal. Ainsi, une levée d'inhibition peut se voir compensée par une réduction du nombre de synapses excitatrices, sous la forme d'une diminution du nombre d'épines dendritiques qui reçoivent ces afférences (Tian et al. 2010). Etant donné l'effet inhibiteur exercé par les interneurons SST sur les MSN (Straub et al. 2016), la perte des interneurons SST et des synapses inhibitrices qu'ils forment avec les MSNs pourrait donc causer cette réduction de la densité des épines.

### **3. Comportement moteur, comportement nociceptif et comportements modélisant l'anxiété ou la dépression**

Les études électrophysiologique et morphologique prises dans leur ensemble suggèrent que l'ablation des interneurons SST pourrait altérer la circuiterie et la sortie striatale, ceci pouvant se traduire par un effet sur le comportement. Compte tenu de l'implication du *striatum* dans le contrôle moteur et sachant qu'une micro-injection bilatérale de SST dans le *striatum* dorsal de rats modifie la locomotion (Tashev et al. 2001), nous avons donc tout d'abord étudié l'effet de l'ablation des interneurons SST sur les

paramètres du comportement moteur. Cependant, aucun de ces paramètres (locomotion spontanée, coordination motrice ou apprentissage moteur) n'a présenté d'altération.

La démonstration d'un rôle antinociceptif de la SST par une action intrastriatale (Roman Tashev et al. 2001) nous a ensuite orienté vers des tests permettant d'évaluer la nociception chez les souris dépourvues d'interneurones SST. Ces tests n'ont toutefois pas montré non plus d'altération du seuil à la douleur.

La concentration de somatostatine mesurée dans le *striatum*, par microdialyse (Mathé et al. 1993) ou par radioimmunoassay (Kobayashi et al. 1977), a longtemps été uniquement reliée à la présence des interneurones SST striataux. Cependant, une connexion fonctionnelle entre les neurones somatostatine du cortex et le *striatum* dorsal a été récemment décrite (Rock et al. 2016) et pourrait y contribuer. Ceci est d'ailleurs appuyé par la particularité qu'ont ces interneurones de posséder des axones allant jusqu'à 1 mm et de réaliser des connexions longue distance (Kawaguchi 1993; Straub et al. 2016). Le maintien de cette population de neurones SST corticaux, dans le modèle d'ablation des interneurones SST striataux, pourrait dès lors constituer une source de somatostatine dans la région dorsale du *striatum* et ceci pourrait expliquer l'absence de phénotype comportemental dans ce modèle. Cependant, les altérations du phénotype électrophysiologique, que nous avons observées chez les souris dépourvues d'interneurones SST dans le *striatum*, indiquent qu'il faut nuancer l'importance de cette source de somatostatine. Un dosage de la somatostatine dans les différentes régions du *striatum* de ces souris dépourvues d'interneurones permettrait de répondre à cette question.

Le *striatum* ventral constitue actuellement une nouvelle cible de choix dans l'étude de l'anxiété (Lago et al. 2017) et la dépression (Francis & Lobo 2017) de par ses connexions avec les différentes structures impliquées dans ces pathologies. De plus, l'inactivation complète du gène NPY se caractérise par un phénotype de type anxigène chez la souris (Bannon et al. 2000) et l'inactivation du gène codant pour la n(NOS) induit une réduction de l'immobilité mesurée lors d'un test de nage forcée (Tanda et al. 2009). Pour ces raisons, nous avons réalisé un test d'« Elevated Plus Maze », un test de préférence au sucre, un test de nage forcé et un test de suspension par la queue (Cryan & Mombereau 2004; Walf & Frye 2007). Cependant, nous n'avons pas observé de phénotype particulier, à l'aide de ces

différents tests chez les souris dépourvues d'interneurones SST striataux, ceci suggérant que cette population d'interneurones, exprimant également le NPY ou la n(NOS) au sein du *striatum*, ne joue pas un rôle majeur dans les phénotypes liés à l'anxiété ou à la dépression.

#### **4. Effets de la cocaïne chez des souris dépourvues d'interneurones somatostatine dans le *striatum***

Les drogues addictives telles que la cocaïne ou l'amphétamine induisent une libération importante de dopamine dans le NAc, qui participe au développement de l'assuétude pour ces drogues (Lüscher 2016). Compte tenu de l'implication du *striatum* dans ce phénomène d'assuétude, nous avons procédé à un test de sensibilité à la cocaïne en deux phases. Lors de la première phase, nous observons que les doses de 1 mg et de 5 mg/kg, qui sont subliminaires, n'induisent pas de différence d'hyperlocomotion entre les souris contrôles et les souris SST<sup>+/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup>. Ceci démontre que les souris dépourvues d'interneurones SST striataux ne sont pas plus sensibles à de faibles doses de cocaïne. Par contre, à la dose de 20mg/kg de cocaïne, les deux groupes de souris présentent une augmentation de la locomotion ainsi qu'une sensibilisation lors des injections répétées. Alors que la sensibilisation est identique entre les deux groupes, les souris dépourvues d'interneurones présentent une réponse motrice qui est significativement plus importante que celle de leur contrôle, tant lors de la première injection que lors des injections répétées. L'ablation des interneurones SST dans le *striatum* induit donc une augmentation de la réponse locomotrice à la cocaïne, suggérant un rôle de ces interneurones dans la réponse psychomotrice à la cocaïne. Notons toutefois que, compte tenu de la sensibilisation similaire, ceci laisse suggérer que c'est plutôt la sensibilité à la dose de 20 mg/kg qui est altérée, lors de l'administration répétée de cette drogue chez les souris dépourvues d'interneurones SST striataux.

Afin de déterminer si le rôle des interneurones SST se limiterait uniquement à cette stimulation psychomotrice, nous avons également réalisé un test de préférence de place conditionnée, qui permet de se focaliser sur l'aspect récompensant de la cocaïne. Le test de CPP montre que la cocaïne induit une préférence de place pour le compartiment où elle est injectée, sans qu'aucune différence de préférence ne soit observée entre le groupe expérimental et le groupe contrôle.

Ces deux tests permettent donc de conclure que l'ablation des interneurons SST striataux affecte uniquement la composante motrice de la cocaïne, sans affecter sa composante motivationnelle, et que les interneurons SST participent à la stimulation psychomotrice de la cocaïne. L'absence de différence de l'indice stéréotypique entre les deux groupes semble de plus indiquer que ce rôle dans la composante psychomotrice est strictement limité à l'aspect locomoteur. Bien qu'une augmentation des stéréotypies a été rapportée lors de l'injection striatale de somatostatine (Rezek et al. 1977), aucun lien entre activité des interneurons SST et stéréotypies induites par la cocaïne n'a été décrit à notre connaissance. Une étude plus détaillée des stéréotypies devra néanmoins confirmer nos résultats car la mesure de l'indice stéréotypique n'a tenu compte que du nombre de redressements et de toilettages, qui sont les comportements plus facilement observables, dans le large champ imposé par le suivi des souris lors du test de sensibilisation. Ces stéréotypies pourraient également se manifester par d'autres comportements (reniflements, léchages, mouvement de la tête, ...), qui nécessitent un autre type de méthodologie d'analyse.

La réponse locomotrice déclenchée par la cocaïne est le résultat d'une accumulation de dopamine dans le *striatum* et d'une suractivation des récepteurs dopaminergiques des neurones de projection. Les récepteurs D1 et D2 de la dopamine ont un effet prépondérant dans ce phénomène, comme le montrent des expériences d'inactivation du gène codant pour le récepteur D1 (Xu et al. 2000) ou pour le récepteur D2 (Kharkwal et al. 2016), qui se caractérisent par une réponse locomotrice atténuée lors d'injections de cocaïne. Cependant, alors que le récepteur D1 semble être un médiateur direct de cette réponse locomotrice, la nature exacte de la fonction du récepteur D2 est beaucoup moins claire (Hummel & Ellen M Unterwald 2002). Au vu de l'importance jouée par les récepteurs D1 et D2 de la dopamine dans la réponse locomotrice induite par la cocaïne, nous avons utilisé deux approches pharmacologiques permettant de les cibler distinctement. L'injection d'une dose de 10 mg/kg de SKF-38393, un agoniste du récepteur D1, induit comme attendu, une hyperlocomotion et une augmentation de la durée du toilettage. Toutefois, les résultats ne montrent pas de différence entre les deux groupes de souris. Il en a été de même, lors du test ciblant les récepteurs D2 à l'aide d'injection d'halopéridol. En conclusion, ces deux tests

ne permettent donc pas d'établir une interaction spécifique des interneurons SST avec les voies de signalisation des récepteurs D1 et D2.

Néanmoins, le découplage de l'effet moteur et motivationnel de la cocaïne, comme mis en évidence dans le modèle d'ablation des interneurons SST striataux, est également observé lors de l'invalidation complète du gène codant pour le transporteur de la dopamine. En effet, les souris « knockout » pour le gène DAT se caractérisent par l'absence d'hyperlocomotion lors d'injections de cocaïne, sans toutefois éliminer l'effet récompensant de la cocaïne, étudié lors du CPP (Giros et al. 1996; O'Neill et al. 2014), comme nous l'avons observé en cas d'ablation des interneurons SST. Ceci pourrait suggérer l'existence d'une perturbation du transporteur de la dopamine dans ce contexte. L'examen, par Western blot, de l'expression de différents marqueurs dopaminergiques associés à la réponse à la cocaïne, appuie cette hypothèse. En effet, cette analyse, réalisée sur des lysats protéiques de *striatum* dorsal et ventral de souris Sst Cre<sup>+/-</sup> et Sst Cre<sup>-/-</sup> sensibilisées ou non à la cocaïne, révèle effectivement une augmentation du niveau d'expression de base de DAT dans le *striatum* dorsal des souris Sst<sup>+/-</sup>;iDTR<sup>+/-</sup> ainsi qu'une très forte tendance à l'augmentation dans le *striatum* ventral. L'absence de signification statistique dans le *striatum* ventral pourrait être mise en relation avec l'ablation incomplète des interneurons SST dans cette région, qui se caractérise par le maintien d'environ 30% de cellules somatostatine-positives. De plus, il est important de relever que l'injection de cocaïne n'induit pas d'augmentation supplémentaire de l'expression de DAT chez les souris dépourvues d'interneurons SST striataux, alors que, comme attendu, cette même injection de cocaïne augmente l'expression de DAT chez les souris contrôles. Ceci suggère qu'il n'y pas d'additivité des deux processus – augmentation d'expression induite par la cocaïne et augmentation d'expression induite par la perte des neurones SST - mais bien une occlusion, démontrant que la capacité de surexpression de DAT semble avoir atteint un maximum.

Les modifications d'expression du transporteur DAT, localisé au niveau des terminaisons dopaminergiques issues de la SNc et de la VTA, peuvent être mises en lien avec l'activité des neurones dopaminergiques (Padmanabhan et al. 2013). En effet, une dépolarisation soutenue de ces neurones se traduit par une diminution de l'expression du transporteur (Padmanabhan & Prasad 2009). Une réduction de l'activité des neurones dopaminergiques serait donc associée à une augmentation de l'expression de DAT. Or, il

s'avère que la SST, le NPY, le GABA ou encore le NO libérés dans le *striatum* modulent tous la libération de dopamine striatale (Smolders et al. 1995; West et al. 2002; Hathway et al. 2004; Adewale et al. 2007) suggérant une modification de l'activité des neurones dopaminergiques. Néanmoins, la libération de dopamine peut être médiée par deux mécanismes : l'un via un contrôle présynaptique des terminaisons dopaminergiques dans le *striatum* et l'autre via diverses afférences sur les neurones dopaminergiques. Ces afférences peuvent être directement originaires du *striatum* comme mis en évidence par rétro-marquage à l'aide de virus injectés dans la SNc de souris DAT-Cre (Watabe-Uchida et al., 2012) ou encore provenir des neurones GABAergiques de la SNr, eux même ciblés par la voie directe et indirecte issue des MSNs (West et al., 2002). Cependant, l'effet indirect via la SNr aurait pour conséquence d'activer les neurones dopaminergiques dans un cas et de les inhiber dans l'autre et ce alors qu'aucun effet différentiel des interneurons SST sur les MSNs n'a encore été observé, ceux-ci pouvant induire des IPSCs dans les MSNs de la voie directe et de la voie indirecte (Straub et al., 2016). Il apparaît donc que la connexion monosynaptique entre les MSNs et les neurones dopaminergiques associée à l'augmentation de leur excitabilité observée dans le modèle d'ablation puisse dès lors être une explication plus plausible à la réduction de l'activité des neurones dopaminergiques. Quant au contrôle présynaptique des terminaisons dopaminergiques, régulant la libération de dopamine, ce mécanisme ne semble pas altérer l'activité des neurones dopaminergiques. En effet, alors que la présence d'auto-récepteurs D2 de la dopamine dans la région somato-dendritique de la VTA et de la SNc participe à l'auto-régulation et à la diminution de l'excitabilité des neurones dopaminergiques, leur présence au niveau des terminaisons axonales dans le *striatum* ne semble avoir qu'un effet local (Ford 2014). Nous pouvons par conséquent supposer que ce mécanisme présynaptique qui n'entraîne pas de modification de l'activité des neurones dopaminergiques, ne pourrait donc pas mener à l'élévation du niveau d'expression de DAT, qui est observé dans le *striatum* des souris dépourvues d'interneurones SST.

Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent donc que l'ablation des interneurons SST est à l'origine d'une augmentation de l'expression du transporteur DAT dans le *striatum* dorsal et dans le *striatum* ventral et que cette augmentation pourrait participer au phénotype hyperlocomoteur observé et ce, par l'augmentation du nombre de

cibles de la cocaïne qui permettrait d'accroître son effet. Cependant, il apparaît qu'un modèle de surexpression du transporteur DAT chez la souris n'a pas montré de potentialisation de l'effet hyperlocomoteur de la cocaïne (Salahpour et al., 2008) ni de libération supérieure de dopamine striatale par rapport à celle naturellement observée lors d'injection de cocaïne (Calipari et al., 2015). Ceci laisse donc imaginer qu'une surexpression de DAT ne peut expliquer à elle seule le phénotype locomoteur observé chez les souris dépourvues d'interneurones SST et qu'une augmentation du niveau basal de dopamine striatale puisse être envisagée. En effet, comme mentionné, le GABA, la SST, le NPY et le NO striatal modulent tous la libération de dopamine. Cependant, alors que la SST, le NPY et le NO l'augmentent, seul le GABA l'inhibe. La réduction du GABA striatal suite à l'ablation des interneurones SST pourrait donc induire une augmentation du niveau de dopamine dans le *striatum*. De plus, cette inhibition se ferait par une action directe sur les terminaisons dopaminergiques (Lopes et al., 2018) qui n'implique pas de modulation de l'activité des neurones dopaminergiques et qui ne s'oppose donc pas au mécanisme proposé via l'inhibition monosynaptique par les MSNs pour expliquer l'expression supérieure de DAT observée. Finalement, il semblerait que la perte de plus de 70% des neurones somatostatine du *striatum* ventral soit suffisante pour voir apparaître ce phénotype hyperlocomoteur, sachant que le NAc est la région du *striatum* associée à la réponse locomotrice induite par les psychostimulants, alors que la région dorsale du *striatum* participe plutôt aux stéréotypies induites par la cocaïne (Wise & Bozarth 1987; Perrine et al. 2015). Afin d'aller plus loin dans le mécanisme impliqué dans ce phénotype hyperlocomoteur, il serait également intéressant d'étudier l'expression de différents marqueurs associés au développement des assuétudes et d'observer si celle-ci est modifiée par l'absence d'interneurones SST striataux. Il s'agira par exemple du marqueur  $\Delta$ FosB, dont l'expression est augmentée dans le NAc (Nestler 2012) lors d'une prise de drogue, ou encore de différents sites de phosphorylation de DARPP-32, également modifiés par la prise de cocaïne (Borgkvist & Fisone 2007).

De nombreuses études mettent en évidence des modifications électrophysiologiques et morphologiques des neurones des différentes structures du circuit de la récompense lors de l'administration chronique de drogues et ces modifications sont le plus souvent corrélées à des phénotypes comportementaux associés à l'assuétude (Russo et al. 2010). Ces

modifications peuvent inclure des changements de l'excitabilité (Kim et al. 2011), de l'arborisation dendritique (Robinson & Kolb 1999) ou encore de la densité et de la morphologie des épines dendritiques (Dobi et al. 2011). Cependant, les enregistrements électrophysiologiques réalisés chez les souris dépourvues d'interneurones SST striataux et sensibilisées à la cocaïne ne montrent pas de différence des propriétés membranaires passives, ni de la rhéobase ou de l'excitabilité intrinsèque des MSNs, par rapport aux souris contrôles. Une différence de la vitesse de repolarisation des potentiels d'action est toutefois observée. Cette similarité des propriétés membranaires passives et de l'excitabilité entre les deux groupes de souris sensibilisés est assez inattendue, compte tenu des différences qui étaient initialement observées dans le modèle d'ablation des interneurones SST. Cette occlusion des effets sur les propriétés membranaires passives et l'excitabilité des MSNs ainsi que la modification de la vitesse de repolarisation suggère que ceci est le résultat de l'administration chronique de cocaïne chez les souris sans interneurones SST.

D'autre part, nous observons que l'addition de dopamine réduit l'excitabilité des MSNs des souris contrôles SST<sup>-/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup> sensibilisées à la cocaïne, sans affecter la rhéobase, tandis qu'elle augmente l'excitabilité et réduit la rhéobase des MSNs des SST<sup>+/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup>. De plus, la comparaison des deux groupes met en évidence une plus grande excitabilité des MSNs des souris dépourvues d'interneurones SST en présence de dopamine. Les MSNs de ces souris dépourvues d'interneurones SST et sensibilisées à la cocaïne sont donc moins sensibles à la réduction d'excitabilité induite par la dopamine. Ces observations peuvent également être mises en parallèle avec l'élévation de l'expression du transporteur DAT, qui est observée chez ces souris. En effet, une recapture plus importante de dopamine chez les souris dépourvues d'interneurones SST serait associée à une réduction de son effet sur l'excitabilité, se traduisant par une augmentation de l'excitabilité des MSNs des souris dépourvues d'interneurones SST, comme c'est le cas.

La reconstruction tridimensionnelle des MSNs démontre une différence à l'échelle des épines dendritiques des souris SST<sup>+/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup> sensibilisées à la cocaïne. En effet, les MSNs de ces souris présentent une densité des épines proximale et distale réduite. Cette réduction de la densité des épines distales est également observée chez les souris SST<sup>+/-</sup>iDTR<sup>+/-</sup> et non sensibilisées, suggérant que la différence observée est le résultat de l'ablation et non de la sensibilisation à la cocaïne.



La diminution de la densité des épines proximales, quant à elle, peut plutôt être attribuée à la sensibilisation des souris à la cocaïne (Golden & Russo 2012). Notons qu'il sera intéressant d'étudier leur morphologie par la suite car celle-ci peut être grandement modifiée lors d'injections chroniques de cocaïne et peut renseigner sur les mécanismes de plasticité synaptique, impliqués dans la persistance de certains comportements associés à l'assuétude (Russo et al. 2010). Ceci pourra dès lors participer à la meilleure compréhension du phénotype hyperlocomoteur observé chez les souris dépourvues d'interneurones SST striataux.

CHAPITRE 6 :

CONCLUSION ET

PERSPECTIVES

Les enregistrements électrophysiologiques réalisés sur des souris dépourvues d'interneurones SST suggèrent un rôle de ces interneurones dans la physiologie striatale et, plus particulièrement dans le contrôle de l'excitabilité intrinsèque des MSNs, ainsi que dans leur potentiel membranaire de repos. Ce rôle dans la physiologie du *striatum* est également suggéré par la réduction de la densité des épines dendritiques dans la portion distale des dendrites. En effet, cette réduction pourrait être le résultat d'un mécanisme d'homéostasie synaptique, dans lequel la perte d'inhibition des MSNs se verrait compensée par une réduction de leur excitation. Si l'hypothèse est vérifiée et même si aucune pathologie à ce jour ne décrit de réduction spécifique des interneurones SST, l'ablation de ces interneurones pourra dès lors constituer un bon modèle dans l'étude des mécanismes de compensation, induits par la perte d'inhibition, qui caractérise différentes pathologies des noyaux de la base (Xu et al. 2016).

Cependant, afin de s'assurer que l'augmentation de l'hyperlocomotion induite par la cocaïne, observée chez les souris dépourvues d'interneurones SST striataux, n'est pas, elle, le reflet de ce mécanisme de compensation, il serait nécessaire d'utiliser des approches réversibles telles que l'approche DREADD ou l'approche optogénétique. Dans le cas de l'approche chémogénétique DREADD (« Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug »), celle-ci consistera à injecter, dans le *striatum* de souris SST-Cre, un vecteur viral contenant un gène codant pour un récepteur artificiel de type muscarinique couplé à une protéine G, et dont l'activation est sous le contrôle unique de clozapine-N-oxide (CNO). Ce CNO, qui peut être administré par injection i.p., aboutira alors à l'activation (dans le cas d'une protéine G<sub>q</sub>) ou à l'inhibition (dans le cas d'une protéine G<sub>i</sub>) du neurone (Campbell & Marchant 2018). Des premières injections de virus AAV5-G<sub>q</sub>-mCherry dans le *striatum* de souris SST-Cre, que nous avons réalisées au laboratoire, donnent des résultats prometteurs. En effet, 98% des cellules mCherry-positives sont SST-positives (Figure 44). Une injection de 20 mg/kg de cocaïne précédée d'une injection de CNO pourra ensuite être réalisée sur ces souris. En fonction des résultats et de la mise au point de protocoles spécifiques, un test de sensibilisation à la cocaïne pourrait être également envisagé. De plus, certains tests permettant d'étudier les comportements moteurs seront effectués afin d'observer l'effet de l'activation des interneurones SST.

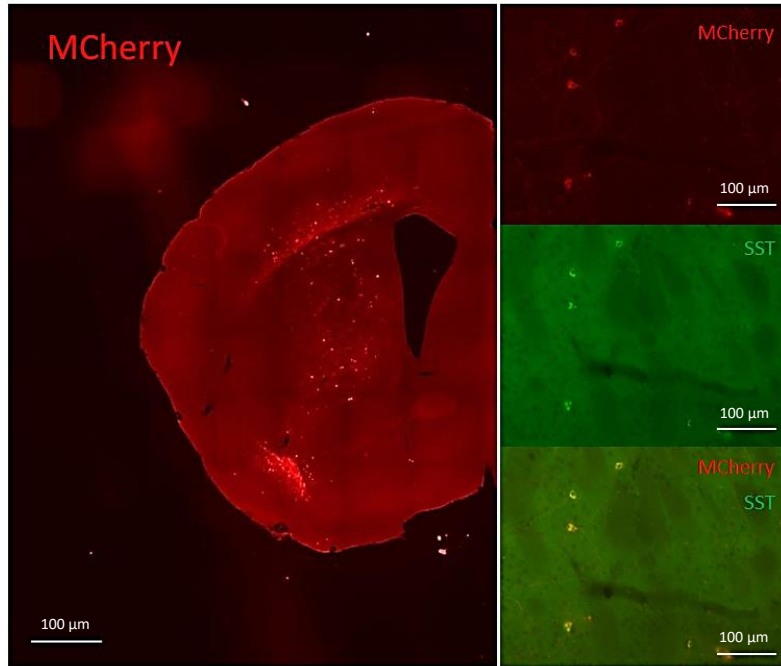


Figure 44 : Expression de la mCherry (gauche, haut droite et bas droite) et de la SST (milieu et bas droite) dans le *striatum*, après injection striatale de virus AAV5-Gq-mCherry et immunomarquage pour la somatostatine chez des souris SST-Cre.

Quant à l'approche par optogénétique, qui consiste à injecter un vecteur viral contenant le gène codant pour un canal ou une pompe ionique dont l'activation est contrôlée par des pulses lumineux, qui induisent alors l'activation ou l'inhibition du neurone, celle-ci a déjà fait l'objet de mises au point et de publications récentes par d'autres laboratoires (Straub et al. 2016; Ribeiro et al. 2018). Une combinaison de cette technique avec des enregistrements électrophysiologiques des MSNs chez des souris sensibilisées ou non à la cocaïne nous donnera dans ce cas, une information de l'effet, en temps réel, de l'activation ou de l'inhibition des interneurons SST sur l'activité des MSNs.

Finalement, compte tenu du phénotype observé et de l'implication du système dopaminergique qu'il sous-entend, une étude de l'activité des neurones dopaminergiques et de la libération de dopamine striatale chez les souris dépourvues d'interneurones SST permettra de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent.

En conclusion, ce travail de thèse a permis, par une approche de perte de fonction, de mettre en évidence le rôle des interneurons SST du *striatum*, dans le contrôle de la

physiologie striatale, ainsi que dans la réponse locomotrice induite par la cocaïne, proposant une implication potentielle du transporteur de la dopamine. De plus, le modèle d'ablation mis au point pourra également être utilisé pour comprendre les mécanismes de compensation qui peuvent être mis en place lors de la perte d'une inhibition dans la circuiterie striatale.

# CHAPITRE 7 :

## BIBLIOGRAPHIE

- Adewale, A.S., Macarthur, H. & Westfall, T.C., 2007. Neuropeptide Y-induced enhancement of the evoked release of newly synthesized dopamine in rat striatum: mediation by Y2 receptors. *Neuropharmacology*, 52(6), pp.1396–402.
- Adrian, M. et al., 2014. Barriers in the brain: resolving dendritic spine morphology and compartmentalization. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, p.142.
- Alexander, G.E., DeLong, M.R. & Strick, P.L., 1986. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 9(1), pp.357–381.
- Apicella, P., 2017. The role of the intrinsic cholinergic system of the striatum: What have we learned from TAN recordings in behaving animals? *Neuroscience*, 360, pp.81–94.
- Ariano, M.A., 1983. Distribution of components of the guanosine 3',5'-phosphate system in rat caudate-putamen. *Neuroscience*, 10(3), pp.707–23.
- Assous, M. et al., 2017. Differential processing of thalamic information via distinct striatal interneuron circuits. *Nature Communications*, 8, p.15860.
- Bahuguna, J., Weidel, P. & Morrison, A., 2018. Exploring the role of striatal D1 and D2 medium spiny neurons in action selection using a virtual robotic framework. *European Journal of Neuroscience*.
- Bannon, A.W. et al., 2000. Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. *Brain research*, 868(1), pp.79–87.
- Beal, M.F., Chattha, G.K. & Martin, J.B., 1986. A comparison of regional somatostatin and neuropeptide Y distribution in rat striatum and brain. *Brain research*, 377(2), pp.240–5.
- Bearzatto, B. et al., 2005. Age dependence of strain determinant on mice motor coordination. *Brain Research*, 1039(1–2), pp.37–42.
- Berke, J.D., 2011. Functional Properties of Striatal Fast-Spiking Interneurons. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, p.45.
- Bhattarai, J.P. et al., 2011. Tonic Extrasynaptic GABA<sub>A</sub> Receptor Currents Control Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Excitability in the Mouse. *Endocrinology*, 152(4), pp.1551–1561.
- Bicanic, I. et al., 2017. A Quantitative Golgi Study of Dendritic Morphology in the Mice Striatal Medium Spiny Neurons. *Front Neuroanat.*, 11(37).
- Blesa, J. & Przedborski, S., 2014. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, p.155.
- Bolam, J.P. et al., 1983. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [3H]-aminobutyric acid: Combination of golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. *The Journal of Comparative Neurology*, 213(2), pp.121–134.
- Borgkvist, A. & Fisone, G., 2007. Psychoactive drugs and regulation of the cAMP/PKA/DARPP-32 cascade in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*,

31(1), pp.79–88.

- Bou Farah, L. et al., 2016. Somatostatin in the rat rostral ventrolateral medulla: Origins and mechanism of action. *Journal of Comparative Neurology*, 524(2), pp.323–342.
- Brazeau, P. et al., 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science (New York, N.Y.)*, 179(4068), pp.77–9.
- Breneman, K.D. et al., 2009. The Passive Cable Properties of Hair Cell Stereocilia and Their Contribution to Somatic Capacitance Measurements. *Biophysical Journal*, 96(1), pp.1–8.
- Brimblecombe, K.R. & Cragg, S.J., 2017. The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(2), pp.235–242.
- Buch, T. et al., 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nature methods*, 2(6), pp.419–426.
- Buot, a & Yelnik, J., 2012. Functional anatomy of the basal ganglia: limbic aspects. *Revue neurologique*, 168(8–9), pp.569–75.
- Burton, A.C., Nakamura, K. & Roesch, M.R., 2015. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiology of Learning and Memory*, 117, pp.51–59.
- Calabresi, P. et al., 1999. A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(7), pp.2489–99.
- Calipari, E.S. et al., 2015b. Differential Influence of Dopamine Transport Rate on the Potencies of Cocaine, Amphetamine, and Methylphenidate. *ACS Chem. Neurosci*, 6, p.5.
- Campbell, E.J. & Marchant, N.J., 2018. The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: receptor variants, targeting approaches and caveats. *British Journal of Pharmacology*, 175(7), pp.994–1003.
- Cetin, A. et al., 2006. Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nature protocols*, 1(6), pp.3166–73.
- Chaplan, S.R. et al., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods*, 53(1), pp.55–63.
- Chausmer, A.L. et al., 2002. Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice. *Psychopharmacology*, 163(1), pp.54–61.
- Chen, C., Gilmore, A. & Zuo, Y., 2014. Study Motor Skill Learning by Single-pellet Reaching Tasks in Mice. *Journal of Visualized Experience*, 85, e51238.
- Cheng, Y. et al., 2018. Prenatal Exposure to Alcohol Induces Functional and Structural Plasticity in Dopamine D1 Receptor-Expressing Neurons of the Dorsomedial Striatum. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 42(8), pp.1493–1502.



- Chesselet, M. & Robbins, E., 1989. Characterization of striatal neurons expressing high levels of glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Bain Research*, 492, pp.237–244.
- Crittenden, J.R. & Graybiel, A.M., 2011. Basal Ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Frontiers in neuroanatomy*, 5(September), p.59.
- Cryan, J.F., Markou, A. & Lucki, I., 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), pp.238–245.
- Cryan, J.F. & Mombereau, C., 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular psychiatry*, 9(4), pp.326–57.
- Cui, G. et al., 2013. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494(7436), pp.238–242.
- De Keyser, J. et al., 1995. Dopamine agonists used in the treatment of Parkinson's disease and their selectivity for the D1, D2, and D3 dopamine receptors in human striatum. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 19(7), pp.1147–54.
- Der-Avakian, A. & Markou, A., 2012. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends in Neurosciences*, 35(1), pp.68–77.
- Deuschl, G. et al., 2006. A Randomized Trial of Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 355(9), pp.896–908.
- DiFiglia, M. & Aronin, N., 1982. Ultrastructural features of immunoreactive somatostatin neurons in the rat caudate nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2(9), pp.1267–74.
- Dimova, R., Vuillet, J. & Seite, R., 1980. Study of the rat neostriatum using a combined Golgi-electron microscope technique and serial sections. *Neuroscience*, 5(9), pp.1581–96.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20(1), pp.441–462.
- Dobi, A. et al., 2011. Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(5), pp.1895–904.
- Dunham, N.W. & Miya, T.S., 1957. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice\*\*College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, 46(3), pp.208–209.
- Durieux, P.F. et al., 2009. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nature Neuroscience*, 12(4), pp.393–395.
- Durieux, P.F., Schiffmann, S.N. & de Kerchove d'Exaerde, A., 2012. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *The EMBO journal*, 31(3), pp.640–53.

- Elghaba, R., Vautrelle, N. & Bracci, E., 2016. Mutual Control of Cholinergic and Low-Threshold Spike Interneurons in the Striatum. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10(April), p.111.
- Ena, S.L. et al., 2013. FACS array profiling identifies Ecto-5' nucleotidase as a striatopallidal neuron-specific gene involved in striatal-dependent learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(20), pp.8794–809.
- English, D.F. et al., 2012. GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 15(1), pp.123–130.
- Faust, T.W. et al., 2016. Neostriatal GABAergic Interneurons Mediate Cholinergic Inhibition of Spiny Projection Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(36), pp.9505–11.
- Fiala, J.C., Spacek, J. & Harris, K.M., 2002. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain research. Brain research reviews*, 39(1), pp.29–54.
- Fidanboyly, M., Griffiths, L.A. & Flatters, S.J.L., 2011. Global Inhibition of Reactive Oxygen Species ( ROS ) Inhibits Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy. , 6(9).
- Finley, J.C. et al., 1978. Somatostatin-containing neurons in the rat brain: widespread distribution revealed by immunocytochemistry after pretreatment with pronase. *The American journal of anatomy*, 153(3), pp.483–8.
- Fino, E. et al., 2018. Region-specific and state-dependent action of striatal GABAergic interneurons. *Nature Communications*, 9(1), p.3339.
- Ford, C.P., 2014. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*, 282, pp.13–22.
- Francis, T.C. & Lobo, M.K., 2017. Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. *Biological psychiatry*, 81(8), pp.645–653.
- Freund, T.F. & Gulyás, A.I., 1997. Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(5), pp.479–87.
- Friedman, A. et al., 2015. A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. *Cell*, 161(6), pp.1320–33.
- Fukuda, T., 2009. Network Architecture of Gap Junction-Coupled Neuronal Linkage in the Striatum. *Journal of Neuroscience*, 29(4), pp.1235–1243.
- Galarraga, E. et al., 2007. Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience*, 146(2), pp.537–54.
- Galarreta, M. & Hestrin, S., 2002. Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), pp.12438–12443.
- Gerfen, C.R. & Bolam, J.P., 2017. The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. In

pp. 3–32.

- Gerfen, C.R. & Surmeier, D.J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience*, 34, pp.441–466.
- Gerlach, J., 1977. The relationship between parkinsonism and tardive dyskinesia. *American Journal of Psychiatry*, 134(7), pp.781–784.
- Gertler, T.S., Chan, C.S. & Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(43), pp.10814–24.
- Giros, B. et al., 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, 379(6566), pp.606–612.
- Gittis, A., 2012. Striatal interneurons: Causes of or cures for movement disorders? *Science*, 338(6103).
- Gittis, A.H. et al., 2010. Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(6), pp.2223–34.
- Gittis, A.H. et al., 2011. Selective Inhibition of Striatal Fast-Spiking Interneurons Causes Dyskinesias. *Journal of Neuroscience*, 31(44), pp.15727–15731.
- Golden, S.A. & Russo, S.J., 2012. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(10), pp.a011957–a011957.
- Gong, S. et al., 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature*, 425(6961), pp.917–925.
- Gonzales, K.K. & Smith, Y., 2015. Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1349(1), pp.1–45.
- Graybiel, A.M. & Grafton, S.T., 2015. The Striatum: Where Skills and Habits Meet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), p.a021691.
- Graybiel, A.N.N.M., 1978. by acetylthiocholinesterase. , 75(11), pp.5723–5726.
- Grofová, I., 1979. Types of striatonigral neurons labeled by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Applied neurophysiology*, 42(1–2), pp.25–8.
- Haller, C. et al., 2014. Recent advances in understanding schizophrenia. *F1000Prime Reports*, 6, p.57.
- Hathway, G.J., Humphrey, P.P.A. & Kendrick, K.M., 2004. Somatostatin induces striatal dopamine release and contralateral turning behaviour in the mouse. *Neuroscience Letters*, 358(2), pp.127–131.
- Honjo, T. et al., 1971. Adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis by diphtheria toxin. *The Journal of biological chemistry*,

246(13), pp.4251–60.

- Horii, Y. & Kawaguchi, M., 2015. Higher detection sensitivity of anxiolytic effects of diazepam by ledge-free open arm with opaque walled closed arm elevated plus maze in male rats. *Behavioural brain research*, 294, pp.131–40.
- Hoyer, D. et al., 1995. receptors. , 161(March).
- Hu, B., Cilz, N.I. & Lei, S., 2017. Somatostatin depresses the excitability of subicular bursting cells: Roles of inward rectifier K<sup>+</sup> channels, KCNQ channels and Epac. *Hippocampus*, 27(9), pp.971–984.
- Huang, P.L. et al., 1993. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, 75(7), pp.1273–86.
- Hummel, M. & Unterwald, E.M., 2002. D1 dopamine receptor: A putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. *Journal of Cellular Physiology*, 191(1), pp.17–27.
- Hyman, S.E. & Malenka, R.C., 2001. Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), pp.695–703.
- Ibanez-Sandoval, O. et al., 2010. Electrophysiological and Morphological Characteristics and Synaptic Connectivity of Tyrosine Hydroxylase-Expressing Neurons in Adult Mouse Striatum. *Journal of Neuroscience*, 30(20), pp.6999–7016.
- Ibáñez-Sandoval, O. et al., 2011. A novel functionally distinct subtype of striatal neuropeptide Y interneuron. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(46), pp.16757–69.
- Johansson, O., Hökfelt, T. & Elde, R.P., 1984. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience*, 13(2), pp.265–339.
- Kalia, L. V & Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), pp.896–912.
- Kalivas, P.W. & Duffy, P., 1993. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(1), pp.266–75.
- Karschin, C. et al., 1996. IRK(1–3) and GIRK(1–4) Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channel mRNAs Are Differentially Expressed in the Adult Rat Brain. *The Journal of Neuroscience*, 16(11), pp.3559–3570.
- Kataoka, Y. et al., 2010. Decreased number of parvalbumin and cholinergic interneurons in the striatum of individuals with Tourette syndrome. *The Journal of comparative neurology*, 518(3), pp.277–91.
- Kauer, J.A. & Malenka, R.C., 2007. Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(11), pp.844–858.
- Kawaguchi, Y., 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *The Journal of neuroscience : the*

- official journal of the Society for Neuroscience*, 13(11), pp.4908–23.
- Kawaguchi, Y. et al., 1995. Striatal interneurons : chemical , physiological and morphological characterization. , 3(12), pp.527–535.
- Kharkwal, G. et al., 2016. Dopamine D2 receptors in striatal output neurons enable the psychomotor effects of cocaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(41), pp.11609–11614.
- Kieburtz, K., Reilmann, R. & Olanow, C.W., 2018. Huntington’s disease: Current and future therapeutic prospects. *Movement Disorders*.
- Kilbey, M.M., Ellinwood, E.H. & Easler, M.E., 1979. The effects of chronic cocaine pretreatment on kindled seizures and behavioral stereotypies. *Experimental Neurology*, 64(2), pp.306–314.
- Kim, J. et al., 2011. Cell Type-Specific Alterations in the Nucleus Accumbens by Repeated Exposures to Cocaine. *Biological Psychiatry*, 69(11), pp.1026–1034.
- Kita, H., Kosaka, T. & Heizmann, C.W., 1990. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain research*, 536(1–2), pp.1–15.
- Kobayashi, R.M., Brown, M. & Vale, W., 1977. Regional distribution of neurotensin and somatostatin in rat brain. *Brain research*, 126(3), pp.584–8.
- Kravitz, A. V et al., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), pp.622–6.
- Kreitzer, A.C., 2009. Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons.
- Kubota, Y. & Kawaguchi, Y., 2000. Dependence of GABAergic Synaptic Areas on the Interneuron Type and Target Size. , *The Journal of Neuroscience*, 20(1), pp.375–386.
- Kubota, Y., Mikawa, S. & Kawaguchi, Y., 1993. Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin. *Neuroreport*, 5(3), pp.205–8.
- Lago, T. et al., 2017. Striatum on the anxiety map: Small detours into adolescence. *Brain Research*, 1654(Pt B), pp.177–184.
- Lanciego, J.L., Luquin, N. & Obeso, J.A., 2012. Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), pp.a009621–a009621.
- Larsson, E., Lindvall, O. & Kokaia, Z., 2001. Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats. , 913, pp.117–132.
- Li, Y., Li, J.-J. & Yu, L.-C., 2002. Anti-nociceptive effect of neuropeptide Y in the nucleus accumbens of rats: an involvement of opioid receptors in the effect. *Brain research*, 940(1–2), pp.69–78.
- Lieberman, J.A. et al., 2008. Antipsychotic Drugs : Comparison in Animal Models of Efficacy , Neurotransmitter Regulation , and Neuroprotection.

- Lim, S.A.O., Kang, U.J. & McGehee, D.S., 2014. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 6(October), p.22.
- Lopes, E.F. et al., 2018. Inhibition of nigrostriatal dopamine release by striatal GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. *The Journal of Neuroscience*, pp.2028–18.
- Lopez-Huerta, V.G. et al., 2008. Presynaptic Modulation by Somatostatin in the Neostriatum. *Neurochemical Research*, 33(8), pp.1452–1458.
- Luo, R., Partridge, J.G. & Vicini, S., 2013. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic GABA receptors in striatal inhibition dynamics. *Frontiers in neural circuits*, 7(November), p.186.
- Lüscher, C., 2016. The Emergence of a Circuit Model for Addiction. *Annual Review of Neuroscience*, 39(1), pp.257–276.
- Lüscher, C. & Ungless, M.A., 2006. The Mechanistic Classification of Addictive Drugs. *PLoS Medicine*, 3(11), p.e437.
- Lv, X. et al., 2017. M<sub>1</sub> muscarinic activation induces long-lasting increase in intrinsic excitability of striatal projection neurons. *Neuropharmacology*, 118, pp.209–222.
- Madsen, H.B., Brown, R.M. & Lawrence, A.J., 2012. Neuroplasticity in addiction: cellular and transcriptional perspectives. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5, p.99.
- Mathé, A.A., Nomikos, G.G. & Svensson, T.H., 1993. In vivo release of somatostatin from rat hippocampus and striatum. *Neuroscience letters*, 149(2), pp.201–4.
- Meredith, G.E. et al., 2008. The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Structure and Function*, 213(1–2), pp.17–27.
- Meyer, D.A. et al., 2008. Striatal dysregulation of Cdk5 alters locomotor responses to cocaine, motor learning, and dendritic morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), pp.18561–18566.
- Mitchell, I.J., Cooper, A.J. & Griffiths, M.R., 1999. The selective vulnerability of striatopallidal neurons. *Progress in neurobiology*, 59(6), pp.691–719.
- Monteiro, P. et al., 2018. Dichotomous parvalbumin interneuron populations in dorsolateral and dorsomedial striatum. *The Journal of Physiology*, 596(16), pp.3695–3707.
- Muñoz-Manchado, A.B. et al., 2018. Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell reports*, 24(8), p.2179–2190.e7.
- Nestler, E.J., 2002. From neurobiology to treatment: progress against addiction. *Nature Neuroscience*, 5(Supp), pp.1076–1079.
- Nestler, E.J., 2005. The neurobiology of cocaine addiction. *Science & practice perspectives*, 3(1), pp.4–10.
- Nestler, E.J., 2008. Transcriptional mechanisms of addiction: role of FosB. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), pp.3245–3255.
- Nestler, E.J., 2012. Transcriptional Mechanisms of Drug Addiction. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 10(3), pp.136–143.
- O’Hare, J.K. et al., 2016. Pathway-Specific Striatal Substrates for Habitual Behavior. *Neuron*, 89(3), pp.472–9.
- O’Neill, B. et al., 2014. Behavior of knock-in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter after virogenetic restoration of cocaine sensitivity in the striatum. *Neuropharmacology*, 79, pp.626–633.
- Olds, J. & Milner, P., 1954. Positive Reinforcement Produced by Electrical Stimulation of Septal Area and Other Region of Rat Brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), pp.419–427.
- Padmanabhan, S., Pham, T. & Prasad, B.M., 2013. Regulation of Dopamine Transporter Expression by Neuronal Activity. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. pp. 229–242.
- Padmanabhan, S. & Prasad, B.M., 2009. Sustained depolarization decreases calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity and gene expression in dopamine neurons. *Neuroscience*, 163(1), pp.277–285.
- Paredes, M.F., Greenwood, J. & Baraban, S.C., 2003. Neuropeptide Y modulates a G protein-coupled inwardly rectifying potassium current in the mouse hippocampus. *Neuroscience letters*, 340(1), pp.9–12.
- Pellow, S. et al., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), pp.149–67.
- Perrine, S.A. et al., 2015. Cocaine-induced locomotor sensitization in rats correlates with nucleus accumbens activity on manganese-enhanced MRI. *NMR in Biomedicine*, 28(11), pp.1480–1488.
- Petryszyn, S., Parent, A. & Parent, M., 2018. The calretinin interneurons of the striatum: comparisons between rodents and primates under normal and pathological conditions. *Journal of Neural Transmission*, 125(3), pp.279–290.
- Philippu, A., 2016. Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function. *Current medicinal chemistry*, 23(24), pp.2643–2652.
- Planert, H., Berger, T.K. & Silberberg, G., 2013. Membrane Properties of Striatal Direct and Indirect Pathway Neurons in Mouse and Rat Slices and Their Modulation by Dopamine. J. T. Brown, ed. *PLoS ONE*, 8(3), p.e57054.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M. & Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), pp.730–2.
- Rakovska A, Kiss JP, Raichev P, Lazarova M, Kalfin R, Milenov K (2002) Somatostatin stimulates striatal acetylcholine release by glutamatergic receptors: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int* 40:269–275

- Reichlin, S., 1983. Somatostatin. *New England Journal of Medicine*, 309(24), pp.1495–1501.
- Reichmann, F. & Holzer, P., 2016. Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides*, 55, pp.99–109.
- Reiner, A. & Deng, Y.-P., 2018. Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 24(4), pp.250–280.
- Rezek, M. et al., 1977. Neostriatal administration of somatostatin: differential effect of small and large doses on behavior and motor control. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 55(2), pp.234–42.
- Ribeiro, E.A. et al., 2018. Transcriptional and physiological adaptations in nucleus accumbens somatostatin interneurons that regulate behavioral responses to cocaine. *Nature Communications*, 9(1), p.3149.
- Robinson, T.E. & Kolb, B., 1999. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *The European journal of neuroscience*, 11(5), pp.1598–604.
- Russo, S.J. et al., 2010. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in neurosciences*, 33(6), pp.267–76.
- Russo, S.J. & Nestler, E.J., 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(9), pp.609–25.
- Rymar, V. V et al., 2004. Neurogenesis and Stereological Morphometry of Calretinin-Immunoreactive GABAergic Interneurons of the Neostriatum. *The Journal of Comparative Neurology*, 339(September 2003), pp.325–339.
- Salahpour, A. et al., 2008. Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), pp.4405–4410.
- Schulz, S. et al., 2000. Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *Journal of physiology, Paris*, 94(3–4), pp.259–64.
- Shen, W. et al., 2005. Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(32), pp.7449–58.
- Shioda, N. et al., 2017. Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR $\beta$  signaling in striatopallidal medium spiny neurons. *Molecular Psychiatry*, 22(8), pp.1205–1222.
- Smith, J.B. et al., 2016. Genetic-Based Dissection Unveils the Inputs and Outputs of Striatal Patch and Matrix Compartments. *Neuron*, 91(5), pp.1069–84.
- Smolders, I. et al., 1995. Tonic GABA-ergic modulation of striatal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *European Journal of Pharmacology*,



284(1–2), pp.83–91.

- Sosulina, L. et al., 2008. Neuropeptide Y activates a G-protein-coupled inwardly rectifying potassium current and dampens excitability in the lateral amygdala. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(3), pp.491–498.
- Srinivas, K. V et al., 2017. The Dendrites of CA2 and CA1 Pyramidal Neurons Differentially Regulate Information Flow in the Cortico-Hippocampal Circuit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(12), pp.3276–3293.
- Steru, L. et al., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), pp.367–70.
- Straub, C. et al., 2016. Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum. *Neuron*, 92(1), pp.84–92.
- Sun, Q.Q. et al., 2001. Differential regulation of GABA release and neuronal excitability mediated by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in rat thalamic neurons. *The Journal of physiology*, 531(Pt 1), pp.81–94.
- Svenningsson, P. et al., 2006. Alterations in 5-HT<sub>1B</sub> receptor function by p11 in depression-like states. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5757), pp.77–80.
- Tanda, K. et al., 2009. Abnormal social behavior, hyperactivity, impaired remote spatial memory, and increased D1-mediated dopaminergic signaling in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *Molecular brain*, 2(1), p.19.
- Taniguchi, H. et al., 2011. A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*, 71(6), pp.995–1013.
- Tashev, R. et al., 2001. Antinociceptive effect of somatostatin microinjected into caudate putamen. *Peptides*, 22(7), pp.1079–1083.
- Tashev, R. et al., 2001. Behavioral effects of somatostatin microinjected into caudate putamen. *Neuropeptides*, 35(5–6), pp.271–5.
- Tashiro, Y. et al., 1989. Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neuroscience letters*, 97(1–2), pp.6–10.
- Tepper, J.M. et al., 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in neuroanatomy*, 4(December), p.150.
- Tepper, J.M. & Bolam, J.P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology*, 14(6), pp.685–92.
- Tepper, J.M., Wilson, C.J. & Koós, T., 2008. Feedforward and Feedback inhibition in Neostriatal GABAergic Spiny Neurons. *Brain Res Rev*, 58(2), pp.272–281.
- Tewari, A., Jog, R. & Jog, M.S., 2016. The Striatum and Subthalamic Nucleus as Independent and Collaborative Structures in Motor Control. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10, p.17.

- Tian, X. et al., 2010. MEF-2 regulates activity-dependent spine loss in striatopallidal medium spiny neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 44(1), pp.94–108.
- Tobón, K.E. et al., 2015. Post-transcriptional regulation of dopamine D1 receptor expression in caudate-putamen of cocaine-sensitized mice. *European Journal of Neuroscience*, 42(2), pp.1849–1857.
- Tritsch, N.X. & Sabatini, B.L., 2012. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), pp.33–50.
- Ünal, B. et al., 2015. Anatomical and electrophysiological changes in striatal TH interneurons after loss of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Brain Structure and Function*, 220(1), pp.331–349.
- Valjent, E. et al., 2006. Plasticity-associated gene Krox24/Zif268 is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(18), pp.4956–60.
- van den Heuvel, J.K. et al., 2015. Neuropeptide Y activity in the nucleus accumbens modulates feeding behavior and neuronal activity. *Biological psychiatry*, 77(7), pp.633–41.
- Vécsei, L. & Widerlöv, E., 1990. Preclinical and clinical studies with somatostatin related to the central nervous system. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 14(4), pp.473–502.
- Veeneman, M.M.J., Damsteegt, R. & Vanderschuren, L.J.M.J., 2015. The nucleus accumbens shell and the dorsolateral striatum mediate the reinforcing effects of cocaine through a serial connection. *Behavioural Pharmacology*, 26(1–2), pp.193–199.
- Vincent, S.R. & Johansson, O., 1983. Striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities and NADPH-diaphorase activity: A light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 217(3), pp.264–270.
- Vincent, S.R., Staines, W.A. & Fibiger, H.C., 1983. Histochemical demonstration of separate populations of somatostatin and cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience letters*, 35(2), pp.111–4.
- Vuillet, J. et al., 1980. Study of the Rat Neostriatum Using a Golgi-electron Microscope Technique. , 5(1979).
- Vuillet, J. et al., 1989. Ultrastructural features of NPY-containing neurons in the rat striatum. *Brain research*, 477(1–2), pp.241–51.
- Walf, A. & Frye, C., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2(2), pp.322–328.
- Walker, D.M. & Nestler, E.J., 2018. Neuroepigenetics and addiction. In *Handbook of clinical neurology*. pp. 747–765.
- Watabe-Uchida, M. et al., 2012. Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine

- neurons. *Neuron*, 74(5), pp.858–73.
- West, A. R. & Grace, A. A. 1999. Intrastratial infusion of nitric oxide increases the firing rate and duration of burst firing of striatal neurons recorded in vivo. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 25, p.173
- West, A.R., Galloway, M.P. & Grace, A.A., 2002. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: Effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, 44(4), pp.227–245.
- White, J.D., 1993. Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. *Regulatory peptides*, 49(2), pp.93–107.
- Wichmann, T., 2018. Pathophysiologic Basis of Movement Disorders. In *Progress in neurological surgery*. pp. 13–24.
- Wise, R.A., 1996. Addictive Drugs and Brain Stimulation Reward. *Annual Review of Neuroscience*, 19(1), pp.319–340.
- Wise, R.A. & Bozarth, M.A., 1987. A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. *Psychological Review*, 94(4), pp.469–492.
- Wolak, M.L. et al., 2003. Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology*, 464(3), pp.285–311.
- Wu, Y., 2000. Striatal interneurons expressing calretinin , parvalbumin or NADPH-diaphorase : a comparative study in the rat , monkey and human. , 863, pp.182–191.
- Xenias, H.S. et al., 2015. Are Striatal Tyrosine Hydroxylase Interneurons Dopaminergic? *Journal of Neuroscience*, 35(16), pp.6584–6599.
- Xu, M. et al., 2000. Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Research*, 852(1), pp.198–207.
- Xu, M., Li, L. & Pittenger, C., 2016. Ablation of fast-spiking interneurons in the dorsal striatum, recapitulating abnormalities seen post-mortem in Tourette syndrome, produces anxiety and elevated grooming. *Neuroscience*, 324, pp.321–329.
- Yoshizawa, T., Ito, M. & Doya, K., 2018. Reward-Predictive Neural Activities in Striatal Striosome Compartments. *eNeuro*, 5(1).
- Yu, J. et al., 2017. Nucleus accumbens feedforward inhibition circuit promotes cocaine self-administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(41), pp.E8750–E8759.
- Zarrindast, M.R., Eliassi, A. & Faculty, M., 1991. Differential Effects of Dopamine Agonists on Locomotion in Intact Reserpine-Treated. *Gen Pharmacol*, 22(6), pp.1027–1031.
- Zhang, Y.-F. & Cragg, S.J., 2017. Pauses in Striatal Cholinergic Interneurons: What is Revealed by Their Common Themes and Variations? *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11, p.80.

Zike, I.D. et al., 2017. OCD candidate gene SLC1A1 / EAAT3 impacts basal ganglia-mediated activity and stereotypic behavior. *PNAS*, 114(22).