Université Bordeaux Segalen

Année 2013 Thèse n°2061

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologies, Santé
Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le

28 Novembre 2013

par

Azzedine ABDI

Etude de la diversité neuronale au sein du Globus Pallidus : analyse neurochimique, électrophysiologique et manipulation optogénétique d'un sous-type neuronal chez le rongeur.

Membres du Jury

Mr Dominique GUEHL	Président
Mr Marc SAVASTA	Rapporteur
Mr Laurent VENANCE	Rapporteur
Mr Léon TREMBLAY	Examinateur
Mr Jérôme BAUFRETON	Directeur de thèse

« L'homme devrait savoir que la joie, le plaisir, le rire et le divertissement, le chagrin, la peine, le découragement et les larmes ne peuvent venir que du cerveau. Ainsi, de façon singulière, nous acquérons sagesse et connaissance, nous pouvons voir et entendre, apprécier ce qui est intelligent ou sot, ce que sont le bien ou le mal, ce qui est doux et ce qui est sans saveur… C'est à cause du même organe que l'on peut devenir fou et dément et que la peur et l'angoisse nous assaillent… Tout ceci se passe quand le cerveau est malade… Je considère donc que le cerveau exerce le plus grand pouvoir sur l'homme. »

Hippocrate (environ 460-370 Av. JC)

Remerciements

Tout d’abord je remercie Jérôme BAUFRETON, mon directeur de thèse, de m’avoir accueilli dans son équipe, de m’avoir proposé un sujet de thèse qui m’a passionné pendant ces dernières années et d’avoir toujours consacré beaucoup de temps et d’énergie à me guider, me conseiller et me soutenir. J’ai beaucoup apprécié en lui son grand sens de l’organisation. Je lui suis très reconnaissant pour tout ce qu’il m’a appris, à la fois sur le plan scientifique et relationnel. Cela a été un grand plaisir pour moi de travailler à ses côtés. Merci de vous être démené afin que j'obtienne un financement et que je puisse effectuer mon travail de doctorat dans de bonnes conditions. Merci pour vos encouragements, votre patience, votre disponibilité, votre écoute, de m’avoir appris à défendre mes opinions et votre talent remarquable pour la rédaction des rapports de recherche, thèses et autres articles, dont j’ai bénéficié tout au long de ces années passées à vos côtés.
J’avoue qu’une page de remerciements ne suffit pas à décrire tout ce que vous avez fait pour moi et à exprimer toute la gratitude que j’ai envers vous.

Je tiens à remercier l’ensemble des membres du jury de thèse pour l'honneur qu'ils me font d'avoir acceptés de juger ce travail :
Les Drs Marc SAVASTA et Laurent VENANCE, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et de se plonger dans la lecture critique de ce manuscrit.
Le Dr Léon TREMBLAY, d'avoir eu la gentillesse de participer à ce jury.
Je remercie ici le Pr Dominique GUEHL d’avoir accepté la présidence de mon jury de thèse. Un énorme merci, Dominique.
J'aimerais également prendre le temps de remercier plusieurs personnes qui ont fait de mon passage à l’Institut des Maladies Neurodégénératives (IMN), une expérience très enrichissante et gratifiante.
Tout d'abord, le Dr Erwan BEZARD, pour son accueil au sein de son laboratoire et de ses encouragements avant et après un oral.
Je remercie également toutes les personnes avec lesquelles j’ai collaboré dans le cadre de cette thèse. Je tiens à remercier Cyril HERRY et son équipe (en particulier, Fabrice, Julien « sénégalais » alias Abdou) pour m’avoir accueilli et permis de réaliser les expériences d’optogénétiques *in vivo* chez l’animal vigile qui, je l’espère, seront un premier pas positif vers une collaboration future fructueuse.

Je remercie également Elisabeth NORMAND pour les expériences d'optogénétique *in vitro*, ainsi que toute l'équipe de l'animalerie du Bâtiment 4a pour leur gentillesse.
Un immense merci à Anne TAUPIGNON pour tous ses conseils et pour son investissement pour la relecture et la correction de ce manuscrit. Je la remercie pour ses nombreuses explications enrichissantes et pour sa disponibilité pour répondre à mes questions et d'avoir partagé avec moi ses connaissances dans le domaine durant ces dernières années. Merci infiniment Anne pour votre soutien et votre amabilité inconditionnelle. Morgane, également pour ses nombreuses corrections expresses.
Mes remerciements vont également au Professeur Bernard BIOULAC pour sa gentillesse, sa simplicité, et pour son aide dans ce travail. Merci !
Ces trois années furent riches en événements et constituent une expérience professionnelle exceptionnelle, mais avant tout une belle aventure humaine.
Mes camarades de bureau Till ou Yohan (qui a des origines africaines), Julien alias « le grand frère », Lionel et les étudiants de passage : Thomas « le marrant » et Ben « le millionnaire » ont contribué à faire régner une ambiance propice à l'épanouissement de mon travail. Sans oublier le petit Paulo, dernièrement arrivé avec lequel je me suis « familiarisé » très rapidement, accompagnée de la radieuse Audrey alias Dudu qui nous rapidement séduite par sa joie de vivre communicative et son grand sens de générosité d'aider son prochain. Merci Audrey pour ton aide et désolé pour tant de choses.

Et bien sûr mes remerciements vont également aux filles de l'équipe, Audrey M et Stephix (« tyrannique ou despotique », je te laisse choisir), merci pour ta gentillesse et tous tes conseils. Je te souhaite le meilleur mais c'est bien partie…..je n'en dis pas plus. Et little Rambo, Cristinator, rayon de soleil,….Mama cris, tant de surnoms qui représente une fille superbe pleines de qualités que j'ai eu la chance de côtoyer. Un grand merci profé, muac. Et la sister Estéban merci tata tetelle pour ton sourire. Ainsi qu'Eric pour sa joie et sa bonne humeur. Serge merci pour tes encouragements et ton rire communicatif, ainsi qu'à toute ton équipe. Puis un grand remerciement à tous les membres de l'INCIA, Loïc alias lucky luke et Du, Laura, Martine, Geneviève….Merci à vous tous !

Et l'adorable Marine qui me tolère en tant que chef des thésards. Ne t'en fais pas après mon départ, j'appuierais ta promotion auprès de Jérôme. Et Liliana pour sa joie de vivre communicative et tous ses bons petits plats gentiment partagés…merci Lili. Et bien sur Rageou, le nouvel arrivant dans l'équipe. Merci pour tous tes 4h que l'on te mange à chaque fois.

Je remercie également tous les membres du bâtiment 3a et de la rotule, en particulier Nicolas. Merci pour tes conseils et du temps que tu m'as accordé. Et bien sûr Steph, Mélanie, Omar, Hamid, Brice, Fredo et Émilie…. et bien sur la sublime Camono ainsi que Thomas. Un grand merci à vous tous !!!

A ceux que je n'ai pas cités, veuillez m'en excuser, c'était par manque de temps. J'espère que vous ne m'en tiendrais pas rigueur, encore une fois pour être fidèle à ma réputation, désolé vraiment…..

Enfin, je ne pourrais jamais assez remercier mes parents, Zidane et Djamila ABDI, à qui je dédie cette thèse. Je dois à mes parents tout mon parcours et mes réussites obtenues grâce à leur sacrifice, leur conscience de l'intérêt d'une solide formation, et à la confiance qu'ils ont su m'accorder. Je ne peux éprouver qu'un immense respect pour mes parents, pour leur incroyable générosité. J'aimerais profiter de cette occasion pour leur rendre hommage et dire à quel point leurs efforts, leurs sacrifices d'une vie gagnée très durement et l'exemple qu'ils m'ont donné, m'ont construit et aidé tout au long de ma vie. Ils ont toujours fait preuve d'un soutien sans faille. Qu'ils trouvent ici un modeste geste de reconnaissance et de remerciement.

Merci pour tout!



Abstract

Globus Pallidus (GP in Rodents; GPe in Primates) which belongs to the indirect pathway of basal ganglia is often, if not always, considered as an homogeneous entity which simply relays striatal information through the subthalamic nucleus, downstream to the output of basal ganglia, the *substantia nigra pars reticulata*. Prototypical GP neurons are often described as fast-spiking GABAergic cells which express parvalbumin (PV) as a neurochemical marker. However, cellular heterogeneity in GP had been suggested by anatomical, neurochemical, fate mapping analysis and electrophysiological activity *in vivo* but a clear demonstration of the existence of distinct cell types in GP, which requires by definition correlation of electrophysiological activity with neurochemistry and structure, is still missing. The objective of my PhD was i) to determine if the expression of specific neuronal markers in GP neurons is correlated with specific electrophysiological properties, ii) to understand the function of identified cell types in motor control, in order to prove that neuronal diversity exists and matters in GP. We show that electrical activity and repertoire of ionic channels differ in PV-positive and FoxP2-positive neurons. We demonstrate that PV-positive neurons do project on downstream structures whereas FoxP2-positive neurons exclusively target striatum. We report that manipulating PV-positive neurons using optogenetics induce changes in motor behavior. Thus, our results contribute to highlight the function of GP in motor control.

Keywords:

Basal ganglia, Globus Pallidus, neuronal diversity, parvalbumin, synaptic targeting, dopamine, optogenetic.

Liste des figures

Figure1 : Représentation schématique du circuit des ganglions de la base chez le rat. 9

Figure 2 : Coupes de mésencéphales d'un cerveau humain. 11

Figure 3 : Posture en « statue de sel ». 11

Figure 4 : Représentation schématique d'après DeLong (1990) de l'organisation anatomo-fonctionelle « classique » des ganglions de la base. 12

Figure 5 : Organisation anatomique du cerveau antérieur en développement. 13

Figure 6 : Classification des neurones du GP selon leurs origines embryonnaires distinctes. 15

Figure 7 : Représentation schématique d'un modèle du réseau des GB décrivant les efférences du GP. 18

Figure 8 : Images résumant les afférences globales dans le GPe et le GPi chez le singe. 20

Figure 9 : Représentation schématique d'un modèle du réseau des GB décrivant les afférences du GP. 21

Figure 10 : Tableau récapitulatif des propriétés électrophysiologiques des neurones du GP selon les études. 23

Figure 11 : Deux exemples d'activités électrophysiologiques extrêmes au sein du GP obtenues par modélisation d'un neurone du GP. 24

Figure 12 : Patrons de décharges typiques de deux neurones du GPe observés en absence de mouvement chez le primate. 26

Figure 13 : Activité de décharge d'un neurone du GP durant des mouvements. 26

Figure 14 : Activité neuronale d'un neurone du globus pallidus chez le rat. 27

Figure 15 : Dichotomie anatomo-fonctionnelle des neurones du GP chez le rat 6- OHDA. 28

Tableau 1 : Composition des solutions extracellulaires. 33

Tableau 2 : Composition de la solution intracellulaire. 34

Figure 16 : Coupes coronales d'atlas de rat. 44

Tableau 3 : Vecteurs viraux utilisés pour nos expériences d'optogénétique. 48

Figure 17 : Estimation de la proportion de neurones du GP exprimant la PV, Nkx2.1, FoxP2 et la PPE chez le rat. 51

Figure 18 : Répartition des neurones du GP selon l'axe rostro-caudal. 51

Figure 19 : Colocalisation préférentielle de certains marqueurs neuronaux dans les neurones du GP chez le rat. 55

Figure 20 : Graphique montrant le degré de colocalisation des marqueurs neuronaux. 52

Figure 21 : Répartition en pourcentage des 4 principales populations neuronales du GP. 52

Figure 22 : Identification immunohistochimique des neurones du GP enregistrés en patch-clamp. 53

Figure 23 : Décharge spontanée des neurones du GP chez le rat. 54

Figure 24 : Analyse de régularité de la décharge des neurones du GP au cours du temps. Seuls les neurones PV-positifs ont une fréquence de décharge régulière. 55

Figure 25 : Paramètres des potentiels d'action des neurones PV-positifs, FoxP2-positifs et doublement négatifs. Seule la valeur de l'hyperpolarisation consécutive au potentiel d'action diffère significativement. 56

Figure 26 : Activité de décharge évoquée des neurones du GP. La décharge des neurones PV-positifs diffère de celle des neurones FoxP2 et des doubles négatifs. 60

Figure 27 : Réponses des neurones du GP à des créneaux de courants hyperpolarisants chez le rat. 57

Figure 28 : Caractéristiques des rebonds post-inhibiteurs des neurones du GP chez le rat. 58

Figure 29 : Mesure et comparaison des courants sodiques persistants (INaP) entre les neurones du GP exprimant la PV ou FoxP2. 62

Figure 30 : Modulation de l'excitabilité des neurones du GP par les récepteurs dopaminergiques de type D2 chez le rat : résultats préliminaires. 59

Figure 31 : Projection différentielle des neurones Nkx2.1-, PV-, et FoxP2-positifs du GP chez le rat. 60

Figure 32 : Propriétés électrophysiologiques des neurones du GP chez la souris transgénique PV-Ai9. 61

Figure 33 : Contrôle optogénétique *in vitro* de l'activité de décharge des neurones PV du GP chez la souris PV-Ai9. 62

Figure 34 : Spécificité de la transfection chez les souris PV-Ai9. 63

Figure 35 : La manipulation unilatérale des neurones PV-positifs du GP provoque un comportement rotatoire chez la souris PV-Ai9 vigile et libre de ses mouvements. 64

Figure 36 : Les propriétés et la connectivité des neurones du GP permettent une sélection optimale d'un programme moteur. 65

Figure 37 : Photo-activation et photo-inhibition des interneurones PV-positifs exprimant ArchT, ou ChR2 et la GFP de la couche 2/3 du cortex prélimbique de souris transgéniques PV-ChR2 ou PV-ArchT. 67

Figure 38 : Analogie entre l'origines embryonnaires des populations neuronales striatales et pallidales. 74

Figure 39 : Schéma des projections des 3 populations neuronales identifiées dans le GP. 78

Liste des communications et publications

Communications affichées :

Abdi A, Miguelez C, Morin S, Bioulac B and Baufreton J. *In vitro* electrophysiological characterization and optogenetic manipulations of parvalbumin-expressing neurons in the globus pallidus.**11ème colloque de la société des neurosciences française. Lyon; 21-24 Mai 2013**

Abdi A, Miguelez C, Morin C, Bioulac C & Baufreton J. Immunohistochemical and electrophysiological profiling of globus pallidus neurons *in vitro*. **IBAGS XI, Eilat, Israel; 3-7 Mars 2013.**

Abdi A, Morin S, Bioulac B and Baufreton J. Immunohistochemical and electrophysiological properties of the two major neuronal populations of the globus Pallidus in vitro. **Journée SFR, Bordeaux**, France (Mai 2012).

Abdi A. Etude de la diversité neuronale du globus pallidus. **Journée de l'école doctorale Palais des Congrès d'Arcachon, bordeaux, France, Avril 2012**

Morin S, **Abdi A**, Polito M, Garret M, Bioulac B and Baufreton J. Molecular, histochemical and electrophysiological profiling of globus pallidus neurons *in vitro*. **10ème colloque de la société des neurosciences française. Marseille; 24-27 Mai 2011.**

Communications orales :

Abdi A. Etude de la diversité neuronale du globus pallidus. **Journée de l'école doctorale Palais des Congrès d'Arcachon, bordeaux, France, Avril 2013.**

Abdi A. Etude de la diversité neuronale du globus pallidus. **Réunion conjointe des clubs des ganglions de base et des mouvements anormaux. Bron, 20-21 Mai 2013.**

Publicatons :

Courtin J, Chaudun F, Rozeske R, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, **Abdi A**, Baufreton J, Bienvenu T and Herry C. Prefontal parvalbumin-expressing interneurons control fear expression. Nature ; Accepted for publication

Bogacz R, **Abdi A**, Magill PJ,Baufreton J. Response properties and connectivity of neurons in external globus pallidus match those required for optimal action selection. In preparation

Abdi A[*], Mallet N[*], Morin S, Bioulac B, Bezard E, Baufreton J[§] Peter J. Magill PJ[§] Molecular, Neurochemical and electrophysiological evidences of a neuronal diversity in the rat globus pallidus. In preparation.

*: Equal contribution

§: These authors should be considered as senior authors

SOMMAIRE

Introduction 10

I. Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base 10

A. En situation physiologique 10

B. La maladie de Parkinson 12

C. Modèle d'Alexander et Crutcher en situation parkinsonienne 13

II. Le Globus Pallidus externe 13

A. Origine embryonnaire des neurones du Globus Pallidus externe 14

1. Origine embryologique des structures du télencéphale et régionalisation moléculaire 14

2. Diversité embryonnaire au sein du GP 15

B. Caractéristiques morphologiques et anatomiques des neurones du Globus Pallidus externe 16

1. Morphologie des neurones du Globus Pallidus externe 16

2. Diversité neurochimique des neurones du Globus Pallidus externe 17

3. Les projections des neurones du Globus Pallidus 18

3.1. Projection sur les autres structures des ganglions de la base 18

3.2. Projections hors du réseau des ganglions de la base 20

C. Afférences des neurones du Globus Pallidus externe 20

1. Afférences GABAergiques 20

2. Afférences glutamatergiques 21

3. Afférences dopaminergiques et sérotoninergiques 22

D. La boucle Globus Pallidus externe / Noyau Sous-Thalamique 23

III. Propriétés électrophysiologiques des neurones du Globus Pallidus 24

A. Activité électrophysiologique des neurones du GP *in vitro* 24

B. Activité des neurones du GP in vivo 27

1. En situation physiologique 27

1.1. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal éveillé 27

1.2. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal anesthésié 28

2. En condition physiopathologique 28

2.1. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal éveillé 28

2.2. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal anesthésié 29

IV. Le Globus Pallidus et le mouvement 30

A. Chez l'animal contrôle 30

B. Chez l'animal rendu parkinsonien 30

V. Régulation dopaminergique du Globus Pallidus externe 30
A. Expression des récepteurs dopaminergiques au sein du Globus Pallidus externe 30
B. Effets des agonistes dopaminergiques sur les neurones du Globus Pallidus externe 31
VI. Objectifs 32
Matériels et Méthodes 34
I. Enregistrements électrophysiologiques sur des tranches fraîches de cerveau de rongeur 34
A. Préparation des tranches 34
B. Solutions 35
1. Solutions extracellulaires 35
2. Solutions intracellulaires 35
C. Enregistrements électrophysiologiques 36
1. La chambre d'enregistrement 36
2. La technique du patch-clamp 36
3. Enregistrements en configuration «cellule attachée» 36
4. Enregistrements en configuration «cellule entière» 37
5. Le patch perforé 37
6. Préparation des électrodes de patch-clamp 38
7. Injection de biocytine pour l'identification immunocytochimique du neurone enregistré.. 38
8. Avantages et limites de la technique de patch-clamp et des tranches 39
9. Pharmacologie 40
10. Acquisition des données et protocoles utilisés 40
10.1. Enregistrements en courant imposé. 40
10.2. Enregistrements en potentiel imposé. 40
11. Analyse des données 41
11.1. Analyse des paramètres du potentiel d'action 41
11.2. Mesure de l'adaptation à la décharge des neurones du GP 41
11.3. Mesure du sag et correction des valeurs de potentiel en patch perforé 41
11.4. Analyse du rebond post-inhibiteur 42
11.5. Analyse des courants sodiques persistants 42
12. Analyses statistiques 42
II. Histologie 43
A. Marquages immunohistochimiques 43
1. Acquisitions d'images 44
2. Quantification du marquage immunohistochimique 44

3. Immunohistochimie post électrophysiologie 45
4. Stéréotaxie 46
5. Traçage rétrograde 47
6. Souris transgéniques et recombinaison Cre-Lox 48
7. Optogénétique 49
8. Comportement 51
Résultats 52
I. Classification neurochimique au sein du Globus Pallidus 52
A. Identification des principales populations neuronales par immunohistochimie 52
II. Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des principaux types neuronaux du GP 53
A. Caractérisation des propriétés d'excitabilité intrinsèques des neurones du Globus Pallidus 54
1. Activité de décharge spontanée des neurones 55
2. Analyse de la régularité de la décharge au cours du temps 55
3. Caractéristiques des potentiels d'action des neurones du GP 57
4. Activité de décharge évoquée 57
4.1. Réponses des neurones du GP à des créneaux dépolarisants 57
4.2. Réponses des neurones du GP à des créneaux hyperpolarisants. 58
III. Caractérisation des courants sodiques persistants des neurones PV- et FoxP2-positifs 59
IV. Action de la dopamine sur les neurones du GP 60
V. Analyse du connectome des neurones du GP 60
VI. Manipulation optogénétique des neurones PV-positifs *in vitro* et *in vivo* 61
A. Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des neurones PV-positifs du GP chez la souris PV-Ai9 62
B. Les neurones PV peuvent être modulés par la lumière *in vitro* 63
C. Contrôle bilatéral des neurones PV-positifs du GP *in vivo* chez l'animal vigile libre de ses mouvements 64
D. Contrôle unilatéral des neurones PV du GP 65
VII. Implication d'une dichotomie fonctionnelle au niveau du globus pallidus sur la sélection d'un programme moteur 66
VIII. Travaux annexes : Manipulation optogénétique des interneurones PV-positifs du cortex prélimbique chez l'animal vigile et libre de ses mouvements. 67
Conclusion 69
Discussion 72
Rappel des principaux résultats 72
I. Classification neurochimique au sein du Globus Pallidus 73

II. Classification électrophysiologique au sein du Globus Pallidus 75
III. Innervation différentielle des neurones du Globus Pallidus au sein du réseau des ganglions de la base 79
IV. Diversité neuronale dans le Globus Pallidus et initiation du mouvement 80
A. Validation de l'outil optogénétique *in vitro* 80
B. Modulation bilatérale des neurones PV du GP 81
C. Modulation unilatérale des neurones PV du GP 81
D. Perspectives 82
1. Caractérisation de la voie arkypallido-striatale. 83
2. Impact d'une déplétion dopaminergique sur l'excitabilité des neurones PV et FoxP2. 83
3. Caractérisation de l'activité des neurones PV et FoxP2 au cours de l'exécution du mouvement. 84
Bibliographie 85

Introduction

Chapitre 1 : Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base

Chapitre 2 : Le Globus Pallidus externe

Chapitre 3 : Propriétés électrophysiologiques des neurones du Globus Pallidus

Chapitre 4 : Le Globus Pallidus et le mouvement

Chapitre 5 : Régulation dopaminergique du Globus Pallidus externe

Chapitre 6 : Objectifs

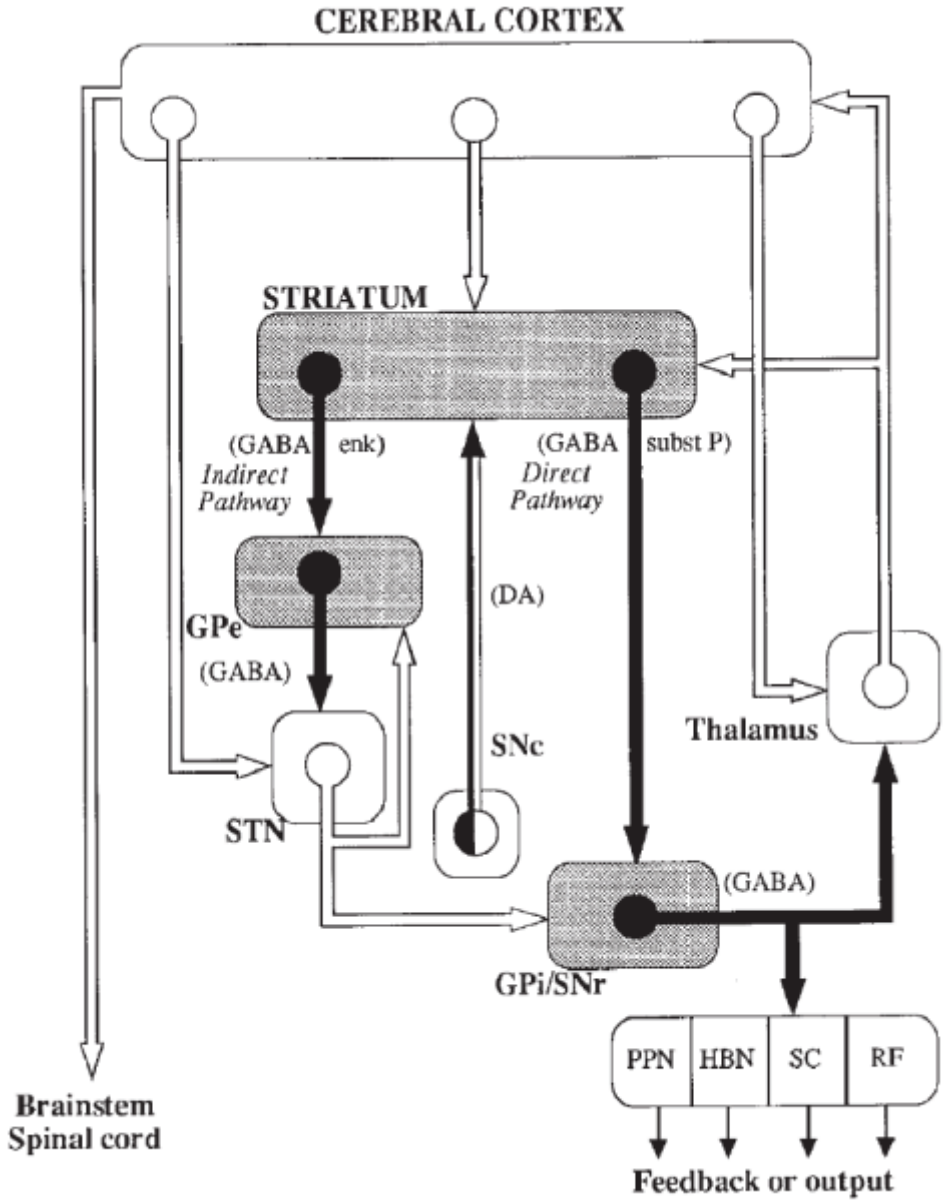


Figure1 : Représentation schématique du circuit des ganglions de la base chez le rat.

GP : Globus pallidus, SNc : Substance Noire compacte, NST : Noyau Sous-thalamique, SNr : Substance Noire réticulée, EP : Noyau Entopédonculaire.

(D'après Alexander et Crutcher, 1990)

Introduction

I. Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base

Un schéma d'organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base (GB) a été proposé initialement par Albin et collaborateurs (Albin et al 1989) et repris ensuite par Alexander et Crutcher (Alexander & Crutcher 1990), puis enfin par DeLong (DeLong 1990). Ce schéma propose un cadre expliquant comment le réseau des ganglions de la base participe au contrôle du mouvement volontaire, à l'état normal et dans des situations pathologiques à l'origine des troubles moteurs de type hyper- ou hypokinétique tels que ceux des maladies de Huntington et de Parkinson. Bien que celui-ci ait plus de 20 ans et que les connaissances du réseau des GB aient progressé, ce cadre est toujours considéré comme valide dans ses grandes lignes.

A. En situation physiologique

Le schéma d'Alexander et Crutcher propose un cadre anatomo-fonctionnel permettant d'expliquer comment le réseau des ganglions de la base traite l'information corticale selon deux voies parallèles (**Figure 1**). Le striatum, qui constitue la structure « d'entrée » des ganglions de la base, reçoit des afférences du cortex cérébral. Il est connecté aux structures de « sortie » qui sont le Globus Pallidus interne (GPi) et la Substance Noire réticulée (SNr), par l'intermédiaire de 2 voies dites « directe » et « indirecte ». La voie directe, monosynaptique, inhibitrice, est composée de neurones striataux qui expriment le GABA co-localisé avec la substance P et/ou la dynorphine. La voie indirecte, polysynaptique, est constituée de deux structures inhibitrices et d'une structure excitatrice. La première structure est représentée par les neurones striataux exprimant le GABA et les enképhalines qui projettent sur le Globus Pallidus externe (GPe)[1]. La seconde structure est constituée par les neurones pallidaux qui projettent sur le Noyau Sous-Thalamique (NST) et utilisent le GABA comme neurotransmetteur. La dernière structure est représentée par le NST glutamatergique, qui projette sur les structures de sortie, le GPi et la SNr, qui ont, elles, une action inhibitrice sur le thalamus. Celui-ci exerce un effet excitateur

[1] Le GPe du primate humain et non-humain est l'équivalent du GP du rongeur.

sur le cortex cérébral en activant les aires motrices. Les neurones efférents du GPi et de la SNr étant GABAergiques, leur effet est inhibiteur. Les neurones de ces 2 structures efférentes ont un niveau élevé d'activité électrique spontanée qui a pour effet d'empêcher tout mouvement non souhaité en inhibant de façon tonique le thalamus. Comme les neurones épineux moyens (MSN) du striatum sont aussi GABAergiques, le résultat net des commandes excitatrices que le cortex envoie au striatum est d'inhiber les neurones inhibiteurs du GPi et de la SNr. Ce qui a pour conséquence une désinhibition du thalamus et donc la libération du mouvement (DeLong & Wichmann 2007).

La dopamine libérée au niveau du striatum par les terminaisons nigro-striées agit avec des effets opposés selon le type de récepteur dopaminergique activé (Calne et al 1979, Stoof & Kebabian 1984). Elle a une action activatrice sur les MSN de la voie directe qui expriment à leur membrane des récepteurs dopaminergiques de type D1 et une action inhibitrice sur les MSN de la voie indirecte qui eux possèdent des récepteurs de type D2 à leur membrane (Gerfen & Engber 1992). En effet, les récepteurs D1 sont activateurs car couplés positivement à l'adénylate cyclase (AC) (Albin et al 1989 , Alexander & Crutcher 1990 , Gerfen et al 1995 , Parent & Cicchetti 1998) alors que les récepteurs D2 sont inhibiteurs car couplés négativement à l'AC (Gerfen & Engber 1992).

Ainsi le modèle d'Alexander et Crutcher repose sur l'existence d'une dichotomie fonctionnelle au sein du striatum avec deux populations de neurones de projection exprimant soit les récepteurs D1 soit les D2. En plus d'avoir des propriétés moléculaires et électrophysiologiques différentes (Bertran-Gonzalez et al 2010), ces deux types neuronaux ont un effet opposé sur le comportement moteur. En effet, l'activation de la voie directe que l'on appelle aussi « go » a une action inhibitrice, alors que celle de la voie parallèle, indirecte ou « no go », exerce un effet activateur sur les noyaux de sortie des GB, conduisant respectivement à faciliter ou à inhiber le comportement moteur. Le fonctionnement physiologique du réseau correspond donc à un équilibre entre l'activité de la voie « directe » et celle de la voie « indirecte ». Une pause dans l'activité des structures de sortie permettrait le déclenchement du mouvement (Chevalier & Deniau 1990). Le principe d'organisation fonctionnelle du réseau des GB a été validé expérimentalement récemment grâce à des expériences d'optogénétique *in vivo* montrant que l'activation de la voie directe favorise l'activité

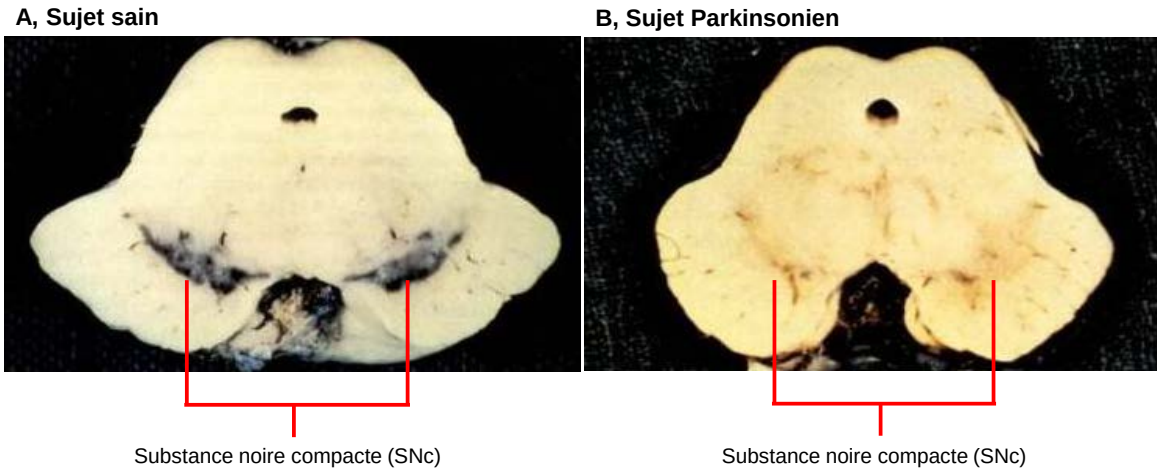


Figure 2 : Coupes de mésencéphales d'un cerveau humain.

Coupes d'un sujet sain (en A) montant la présence des neurones dopaminergiques dans la SNc (pigmentation noire due à la coloration naturelle de la mélanine) et d'un sujet parkinsonien (en B) montrant la disparition des neurones dopaminergiques dans la SNc (absence de pigmentation noire).



Figure 3 : Posture en « statue de sel ».

Cette posture typique du patient parkinsonien est causée par la triade des symptômes moteurs caractérisant la maladie de Parkinson.

locomotrice alors que l'activation de la voie indirecte inhibe la motricité volontaire (Kravitz et al 2010).

Plus précisément, concernant le GPe, le modèle considère cette structure comme une entité monolithique, composée de neurones GABAergiques projetant uniquement sur le NST (**Figure 1**). Le GPe apparait ainsi comme un simple noyau-relai qui transmet uniquement l'information du striatum au NST. De plus, ce modèle dit en « boîte et flèche » (Bar-Gad & Bergman 2001) considère un fonctionnement régit par des variations de fréquence de décharge entre les différentes structures des GB ce qui, nous le verrons plus loin, ne récapitule pas l'ensemble des modifications d'activités électriques observées en situation parkinsonienne.

B. La maladie de Parkinson

« Lorsque j'ai observé cliniquement mes deux premières douzaines de Parkinsoniens, j'étais convaincu que je savais où se situait la cause du tremblement et de la rigidité. Quand j'ai examiné ma septième douzaines de cerveaux malades, j'en étais beaucoup moins sûr car je me sentais alors aussi capable de prouver une théorie que son contraire »

Lewy en 1940.

Initialement décrite en 1817 par James Parkinson, la maladie de Parkinson représente l'affection neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. Elle débute en moyenne entre cinquante et soixante ans, et en raison du vieillissement démographique actuel, sa prévalence tend à augmenter. C'est une maladie handicapante qui concerne environ une personne sur 700 en France. Cette pathologie est consécutive à la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNc (**Figure 2**) et du dysfonctionnement d'un réseau sous-cortical impliqué dans le contrôle du mouvement volontaire, le réseau des ganglions de la base. Elle représente la deuxième cause de handicap moteur chez le sujet âgé après les accidents vasculaires cérébraux. La maladie de Parkinson se caractérise par une triade de symptômes moteurs invalidants (**Figure 3**) qui apparaissent lorsque plus de 60-70% des neurones dopaminergiques de la SNc ont dégénéré (pour revue voir, (Obeso et al 2004, Olanow & Obeso 2000)). Ce qui

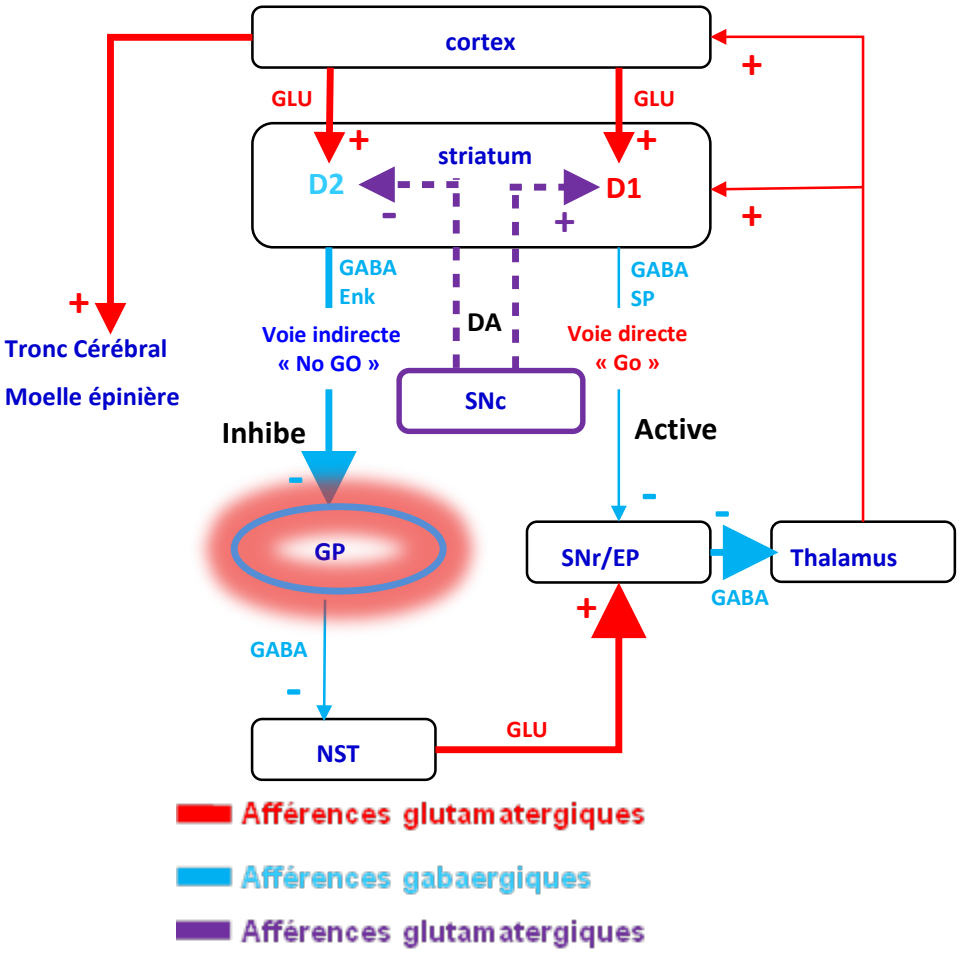


Figure 4 : Représentation schématique d'après DeLong (1990) de l'organisation anatomo-fonctionelle « classique » des ganglions de la base.

Représentation des GB en condition physiopathologique de la maladie de Parkinson (dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée) : EP : noyau entopédonculaire ; SNr : substance noire réticulée ; SNc substance noire compacte ; NST : noyau sous-thalamique, DA : dopamine ; Enk : enképhaline ; SP : substance P ; GLU : glutamate.

(D'après DeLong, 1990).

suggère, lors de la phase pré symptomatique, l'existence de mécanismes de compensation permettant de palier à ce déficit dopaminergique (Agid 1991 , Agid et al 1973 , Bezard et al 1997, Zigmond & Stricker 1973). Ces symptômes sont : la rigidité, l'akinésie (perte d'initiation du mouvement) et le tremblement de repos. Il est à noter que les signes moteurs de la maladie de Parkinson varient d'un moment à l'autre, et ce tout au long de la pathologie. La motivation ou la charge émotionnelle peuvent sensiblement améliorer les déficits moteurs alors que le stress a généralement une influence négative sur ces symptômes.

C. Modèle d'Alexander et Crutcher en situation parkinsonienne

Le modèle d'Alexander et Crutcher postule aussi que le syndrome parkinsonien serait la résultante d'un déséquilibre entre les deux voies de sortie striatales, en faveur d'une hyperactivité de la voie indirecte (**Figure 4**), suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc) (Obeso et al 2002). La perte de l'action inhibitrice des récepteurs D2 des MSN de la voie indirecte entraînerait une hyperactivité de ces derniers, provoquant alors l'hypoactivité des neurones du GP, la désinhibition du NST et, *in fine*, une hyperactivité pathologique des structures de sortie (GPi et SNr) des ganglions de la base à l'origine des troubles moteurs. D'après certains auteurs (Bevan et al 2002b , Lozano & Lang 1998), l'hyperactivité pathologique des structures de sortie (GPi et SNr) des ganglions de la base pourrait expliquer les symptômes de perte de contrôle du mouvement (akinésie et bradykinésie), secondaire à des modifications des taux de décharge de différents noyaux des ganglions de la base. L'activation anormale du NST après déplétion dopaminergique serait, selon le modèle « classique », attribuable à une baisse d'activité du GP, réduisant ainsi le contrôle inhibiteur du GP sur le NST.

II. Le Globus Pallidus externe

Son nom lui vient du latin « *globe pâle* ». Le Globus Pallidus (GP) est une structure diencéphalique située à la face ventro-médiane de la partie caudale du striatum. Il est constitué d'un segment latéral externe et d'un segment médian interne.

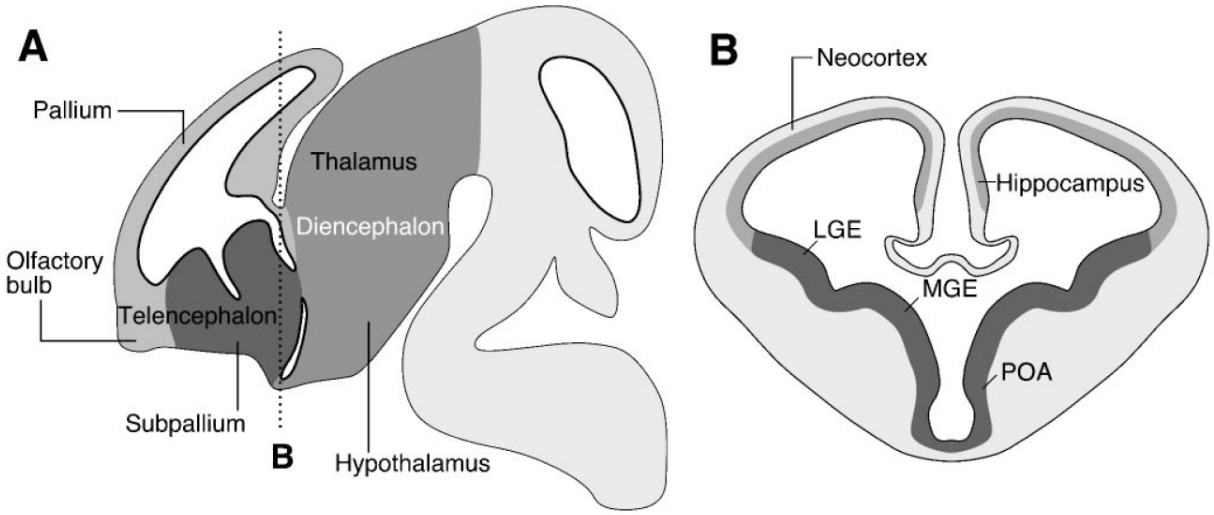


Figure 5 : Organisation anatomique du cerveau antérieur en développement.

A, schéma d'une section sagittale d'un cerveau d'une souris âgée d'E12.5 montant les principales subdivisions du cerveau, le diencéphale et le télencéphale. Dans le télencéphale, le pallium est représenté en gris plus clair que le sous-pallium. B, schéma d'une section transversale à travers le télencéphale d'une souris âgée d'E12.5, indiquant certaines de ces principales sous-divisions. LGE, éminence ganglionnaire latérale. MGE, éminence ganglionnaire médiale. POA, aire préoptique antérieure. (D'après Marin et Rubenstein 2003)

Chez l'homme et le singe, les deux segments séparés par la lame médullaire interne, sont désignés sous les termes de Globus Pallidus externe (GPe) et Globus Pallidus interne (GPi). Chez le rongeur, le segment interne qui est noyé dans la capsule interne et les pédoncules cérébraux porte le nom de noyau entopédonculaire (EP), le terme Globus Pallidus (GP) désignant alors uniquement le segment externe. Nous ferons donc référence au GPe chez l'homme et le primate et au GP chez le rongeur.

A. Origine embryonnaire des neurones du Globus Pallidus externe

1. Origine embryologique des structures du télencéphale et régionalisation moléculaire

La migration cellulaire joue un rôle essentiel dans le développement du cerveau des mammifères : chaque neurone est généré par une zone prolifération localisée et migre ensuite jusqu'à sa destination finale.

Le cerveau présente une architecture stéréotypée qui se met en place progressivement au cours du développement embryonnaire. Il se forme initialement à partir de subdivisions du tube neural : trois grandes vésicules primaires, le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale, qui forment ensuite cinq structures, le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélencéphale (pour revue, (Marin et al 2002)). La partie dorsale des vésicules télencéphaliques ou pallium, donne naissance au cortex cérébral. Sa partie ventrale, ou sous-pallium, est à l'origine des ganglions de la base (**Figure 5**; (Marin et al 2002 , Marin & Rubenstein 2003 , Moreno et al 2009). Le sous-pallium (SP) est formé par des reliefs nommés éminences ganglionnaires latérales (LGE) et médianes (MGE), ainsi que par l'aire préoptique/aire entopédonculaire antérieure (POA/AEP) située plus ventralement. Ces structures donnent naissance aux ganglions de la base mais aussi aux interneurones qui peuplent le cortex (Gelman & Marin 2010). La LGE génère une grande partie du striatum, et la MGE génère une grande partie du globus pallidus, (Marin & Rubenstein 2003).

Afin de comprendre le lien entre les structures embryonnaires du télencéphale et la formation des structures adultes, des études ont visé à déterminer l'origine embryonnaire des différentes populations neuronales télencéphaliques (Flames et al

2007). En effet, le lieu de naissance de chaque précurseur détermine de manière étroite l'identité neuronale.

On peut définir trois grandes catégories de neurones télencéphaliques selon le type de neurotransmetteur utilisé : des neurones de type glutamatergique issus des progéniteurs du cortex (pour revue (Millen & Gleeson 2008)), des neurones cholinergiques dérivant exclusivement des progéniteurs de la POA/AEP (Marin et al 2000, Sussel et al 1999) et des neurones GABAergiques issus des progéniteurs de la LGE, la MGE et la POA (Lavdas et al 1999 , Sussel et al 1999). Les neurones télencéphaliques peuvent aussi être classés selon le facteur de transcription mis en œuvre dans la zone de prolifération. Par exemple *Nkx2.1* est exprimé dans les zones proliférative de la MGE et de la POA/AEP (Marin et al 2000, Sussel et al 1999) et *Npas1* est exprimé dans la POA/AEP et dans la LGE (Marin et al 2002).

2. Diversité embryonnaire au sein du GP

Récemment, le groupe du Dr O. Marin (Nobrega-Pereira et al 2010) a étudié l'origine embryonnaire des neurones du GP en analysant le destin neuronal (Fate Mapping) des précurseurs neuronaux provenant du sous-pallium. Cette étude leur a permis d'établir le profil moléculaire de plusieurs types neuronaux du GP ainsi que leur lignée (leur source), et leur proportion dans le GP.

Pour déterminer l'origine embryonnaire des neurones du GP, le groupe d'Oscar Marin a utilisé plusieurs lignées de souris transgéniques avec chacune la particularité d'exprimer une recombinase bactérienne (Cre) sous le contrôle du promoteur d'un facteur de transcription spécifique d'une région du sous-pallium (Nkx2.1-cre pour la MGE, Pax6-cre pour la LGE et Dbx1-cre pour la POA). Ces animaux ont été croisés avec une lignée de souris reportrice (ROSA26-lox-GFP) permettant l'identification de la descendance des progéniteurs neuronaux en fluorescence. La majorité des neurones du GP proviennent de deux sources embryonnaires : l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) d'où proviennent ~ 70% des neurones du GP et l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) d'où proviennent ~ 25% des neurones du GP. Les 5% restant sont issus de l'aire préoptique (POA). Au total leur étude a suggéré l'existence de 5 types neuronaux au sein du GP classés en fonction de leur

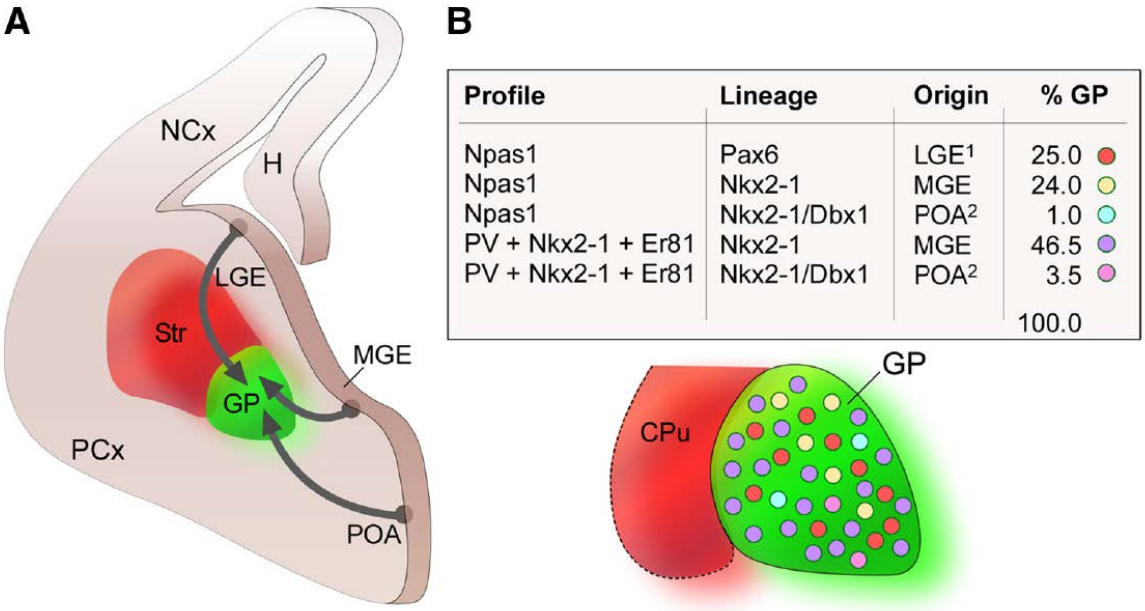


Figure 6 : Classification des neurones du GP selon leurs origines embryonnaires distinctes.

A : représentation schématique d'une hémi-section transversale montrant les origines embryonnaires des neurones du GP. B, tableau représentant la classification des neurones du GP, en fonction de leur profil moléculaire et de leur origine embryonnaire. H, Hippocampe ; CPu, noyau caudal du putamen ; PCx, cortex ; Str, striatum (D'après Nobrega-Pereira et al., 2010).

spécificité moléculaire. Les neurones originaires de la MGE vont donner deux sous-types neuronaux, ceux exprimant Nkx2.1 et la parvalbumine à l'âge adulte (~45% des neurones du GP) et un autre groupe qui aura exprimé de manière transitoire Nkx2.1 pendant le développement et qui sera caractérisé à l'âge adulte par l'expression du marqueur NPAS1 (~25%). Le troisième groupe a une origine embryonnaire différente puisque qu'il provient de la LGE, qu'il n'exprime pas Nkx2.1 au cours du développement mais le facteur de transcription Pax6. Il est caractérisé à l'âge adulte par la présence de NPAS1 (~24% des neurones du GP). Deux autres groupes minoritaires originaires de la POA viennent compléter cette liste (**Figure 6**). Il est intéressant de noter ici que les précurseurs neuronaux issus de la LGE sont aussi caractérisés par l'expression du facteur de transcription Forkhead Box 2 (FoxP2) (Ferland et al 2003 , Kaoru et al 2010, Takahashi et al 2003).

B. Caractéristiques morphologiques et anatomiques des neurones du Globus Pallidus externe

1. Morphologie des neurones du Globus Pallidus externe

Le volume du GPe chez l'homme est de 800 mm^3 (Yelnik 2002). A l'aide de la stéréologie, le nombre total de neurones au sein du GP a été estimé à 46000 chez le rat (Oorschot 1996), et 150000 chez le primate (Percheron et al 1994). Les neurones du GP sont principalement de nature GABAergique (Oertel et al 1984 , Pasik et al 1988, Smith et al 1987) mais il a été décrit l'existence d'une petite population de neurones cholinergiques appartenant au noyau basal de Meynert situé dans la partie ventrale du GPe (Gerfen et al 1982 , Grove et al 1986) et représentant une proportion de 5% des neurones du GPe (Gritti et al 2006). Les neurones pallidaux chez le rat sont constitués d'un corps cellulaire variable de 80 à 350 μm^2 (Kita & Kitai 1994). La majorité de ces neurones GABAergiques expriment également la GAD 67 (Kita & Kitai 1994). Ils s'individualisent en deux populations neuronales différentiables sur la base de leur arborisation dendritique (Difiglia & Rafols 1988 , Kita & Kitai 1994 , Nambu & Llinas 1997). Les neurones ne portant pas d'épines présentent un soma relativement volumineux d'où émergent 3 à 5 dendrites émettant des segments secondaires, voire tertiaires avec quelques varicosités au niveau dendritique (Kita & Kitai 1994). La seconde catégorie cellulaire, moins nombreuse, est composée de neurones présentant un arbre dendritique radial (Kita & Kitai 1994 ,

Nambu & Llinas 1997). Ce type cellulaire est observé dans toute l'étendue de la structure (Kita & Kitai 1994 , Nambu & Llinas 1997). La taille et la diffusion du champ dendritique apparaissent similaires quel que soit le type cellulaire considéré avec des collatérales présentes au sein même du GP. Deux autres études suggèrent l'existence de trois groupes neuronaux dans le GP classés en fonction de la taille de leur corps cellulaire, du nombre de dendrites primaires, de l'orientation de leurs champs dendritiques et de la présence ou non d'épines dendritiques (Cooper & Stanford 2000, Nambu & Llinas 1997). Bien qu'il soit difficile de faire une synthèse entre ces différentes études, elles suggèrent toutes qu'il existe une diversité morphologique au sein de ce noyau.

2. Diversité neurochimique des neurones du Globus Pallidus externe

Plusieurs études ont montré l'existence de plusieurs groupes de neurones dans le GP en fonction de l'expression de marqueurs neurochimiques spécifiques. La plupart d'entre elles se sont focalisées sur la détection de protéines liant le calcium, ce qui a permis la mise en évidence de trois types neuronaux caractérisés par l'expression de la parvalbumine (PV, ~60%), la calbindine (CB, ~2%) et la calrétinine (CR, ~1%) chez le rat (Cooper & Stanford 2002). Chaque neurone exprime un seul type de protéine liant le calcium voire aucune, ces différents marqueurs caractérisent donc des populations bien distinctes. De plus, les neurones exprimant la PV et la CB sont des neurones de projection alors que les neurones exprimant la calrétinine semblent correspondre à une population d'interneurones. La présence de ces trois types de protéines a été retrouvée chez l'opossum (Domaradzka-Pytel et al 2007) et le singe (Parent et al 1996).

En plus des protéines liant le calcium, il a aussi été montré que certains neurones du GP synthétisent de la préproenkephaline (PPE, peptide précurseur de l'enképhaline) (Hoover & Marshall 1999 , Hoover & Marshall 2002), et ces neurones constituent une population distincte des neurones PV-positifs. Comme dans les études précédentes, le groupe de Hoover a observé que la population neuronale majoritaire est celle exprimant la PV (~60%) alors que celle positive pour la PPE représente ~40% (Hoover & Marshall 2002 , Voorn et al 1999). Ces mêmes auteurs ont également mis en évidence que ces neurones PPE-positifs expriment également l'ARNm du récepteur D2 et projettent essentiellement sur le striatum. Ces neurones sont plus

facilement activés par un antagoniste des récepteurs D2 que les neurones exprimant la PV (Hoover & Marshall 2002). Ainsi la détection de la PV ou de la PPE permettrait d'identifier deux populations neuronales distinctes au sein du GP.

3. Les projections des neurones du Globus Pallidus

3.1. Projection sur les autres structures des ganglions de la base

Comme indiqué par le modèle d'Alexander et Crutcher, il est connu que le GP projette massivement sur le NST qui représente une cible privilégiée de ce noyau (Kita & Kitai 1994 , Maurice et al 1998) (**Figure 5**). Il existe 3 fois plus de neurones dans le GPe que dans le NST (Oorschot 1996) et un seul neurone du GPe peut contacter plusieurs neurones du NST (Bevan et al 1997, Kita 1994). Les projections pallido-sous-thalamiques respectent une topographie médio-latérale et rostro-caudale (Parent & Hazrati 1995b). Les neurones situés dans la partie latérale du GP projettent préférentiellement sur les deux tiers latéraux du NST, alors que ceux situés dans la région médiane du GP et dans le pallidum ventral sous-commissural terminent respectivement dans les parties ventro-médiane et dorso-médiane du tiers médian du NST (Parent & Hazrati 1995a , Smith et al 1998). Les axones pallidaux font des synapses avec toutes les parties des neurones du NST (Bevan et al 1997 , Shink & Smith 1995 , Smith et al 1990).

Il est également intéressant de noter que les neurones interconnectés du NST et du GP projettent sur la même population de neurones du GPi et que ceci a été retrouvé pour les différentes parties fonctionnelles des structures du NST et du GPe (Shink et al 1996). Aussi, le GP aurait un rôle modulateur sur les autres afférences du NST, et plus particulièrement sur celles en provenance du cortex (Fujimoto & Kita 1993).

L'activité des neurones pallidaux influencerait donc fortement l'activité des neurones du NST (Ryan & Clark 1992), toutefois cette influence n'est pas exclusive (Hassani et al 1996).

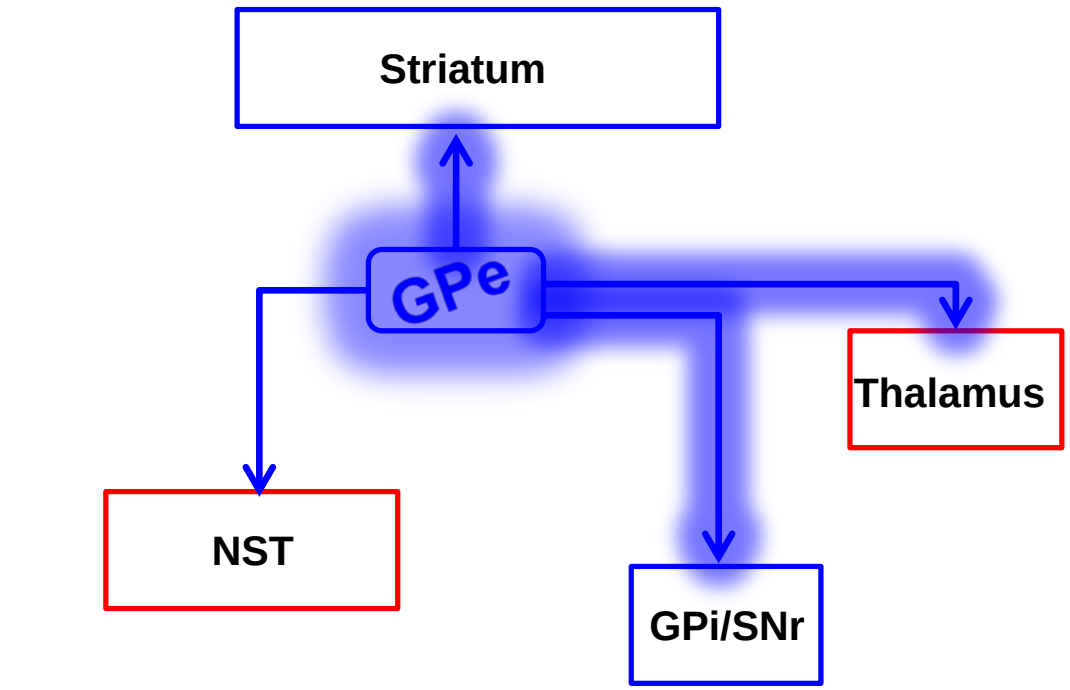


Figure 7 : Représentation schématique d'un modèle du réseau des GB décrivant les efférences du GP.

Le GP trouve dans ce modèle une fonction plus régulatrice que simple noyau relais de l'information motrice. Les **efférences surlignées en bleu** représentent les efférences du GP décrites dernièrement.

Il est à présent admis que le GP envoie aussi des projections inhibitrices sur le GPi et la SNr (Hazrati et al 1990, Shink et al 1996). Chez le singe, cette projection est organisée selon une topographie dorsoventrale et rostrocaudale stricte (Shink et al 1996, Smith et al 1994). Chez le singe, elles forment des synapses courtes symétriques essentiellement avec la partie proximale des neurones du GPi (Shink et al 1996, Smith et al 1994 , Shink & Smith 1995). Chez le rat, ces synapses sont reparties uniformément sur les neurones du GPi (Bolam & Smith 1992, Bolam et al 1993). Le corps cellulaire d'un seul neurone du GPi est entouré d'agrégats denses de terminaisons du GPe (Bolam & Smith 1992, Hazrati et al 1990, Smith et al 1994). A l'aide de marquage sur cellule unique, il a été montré qu'un seul neurone du GPe peut contacter plusieurs neurones du GPi (Bevan et al 1997, Kita 1994), mais de petits neurones, considérés comme des interneurones ne semblent pas recevoir d'entrée du GPe (Shink & Smith 1995).

Le remplissage d'un neurone unique dans le GP chez le rat a montré que les terminaisons atteignant la SNr correspondaient aux collatérales des axones pallidosubthalamiques (Bevan et al 1997, Kita 1994). Les axones pallidonigraux forment des synapses symétriques, ils font des contacts essentiellement avec le corps cellulaire (59%), les dendrites proximales (37%) des neurones de la SNr, mais beaucoup moins fréquemment avec les dendrites distales (4%) (Bolam et al 1993, Smith & Bolam 1989, Smith & Bolam 1990) (**Figure 7**). Ils présentent une innervation en forme de panier de leurs neurones-cibles, avec un seul axone formant parfois de nombreux contacts avec le corps cellulaire et les dendrites proximales des neurones individuels de la SNr.

Enfin, l'existence d'une projection GABAergique du GPe dorsal organisée topographiquement sur le striatum dorsal et du GPe ventral sur le striatum ventral a été décrite grâce à des études de traçages rétrogrades et antérogrades chez le rat (Brog & Zahm 1996 , Groenewegen et al 1993 , Rajakumar et al 1994 , Shu & Peterson 1988 , Staines et al 1981 , Walker et al 1989), chez le chat (Beckstead 1983 , Fisher et al 1985 , Jayaraman 1983) et le singe (Beckstead 1983 , Parent & De Bellefeuille 1983 , Smith & Parent 1986 , Spooren et al 1996).

Le GP ventral fait surtout des synapses avec les dendrites et beaucoup moins avec le corps cellulaire chez le rat (Kuo & Chang 1992).

Des résultats indiquent que les interneurones exprimant la PV et les MSNs du striatum reçoivent des entrées pallidales chez le rat (Bennett & Bolam 1993b , Bevan

et al 1997). Les projections pallido-striatales peuvent exercer des effets étendus sur le traitement et la transmission de l'information par le striatum par innervation sélective des interneurones du striatum qui représente une faible proportion de neurones de ce noyau (Bennett & Bolam 1993a, Bevan et al 1997). Une reconstruction complète de l'arborisation axonale de neurones individuels pallido-striataux a révélé que chaque axone peut-être divisé en plusieurs collatérales, et former des milliers de boutons axonaux sur le striatum, constituant ainsi la plus grande source GABAergique extrinsèque du striatum (Mallet et al 2012). Des observations supplémentaires ont révélé que certains neurones du GP ciblent toutes les principales populations neuronales du striatum, c'est-à-dire les neurones de projection et les populations des interneurones (Mallet et al 2012).

Ainsi, contrairement au modèle classique, le GP interagirait non seulement avec le NST mais aussi avec toutes les autres structures du réseau, ce qui ferait de ce noyau un centre d'intégration du signal « hub neuronal » au sein des GB (**Figure 6**).

3.2. Projections hors du réseau des ganglions de la base

Bien que les projections du GP sur les autres structures des GB soient certainement les plus importantes du point de vue fonctionnel pour le contrôle du mouvement, il aussi a été montré que les neurones du GP projettent sur le noyau réticulaire du thalamus, suggérant que le GP pourrait influencer directement la fonction motrice indépendamment des structures de sortie des GB (Divac et al 1987 , Haber et al 1985 , Shammah-Lagnado et al 1996 , Smith et al 1998) (**Figure 7**).

C. Afférences des neurones du Globus Pallidus externe

1. Afférences GABAergiques

Le GP reçoit deux principales sources de GABA, une extrinsèque en provenance du striatum et une intrinsèque en provenance des collatérales d'axones

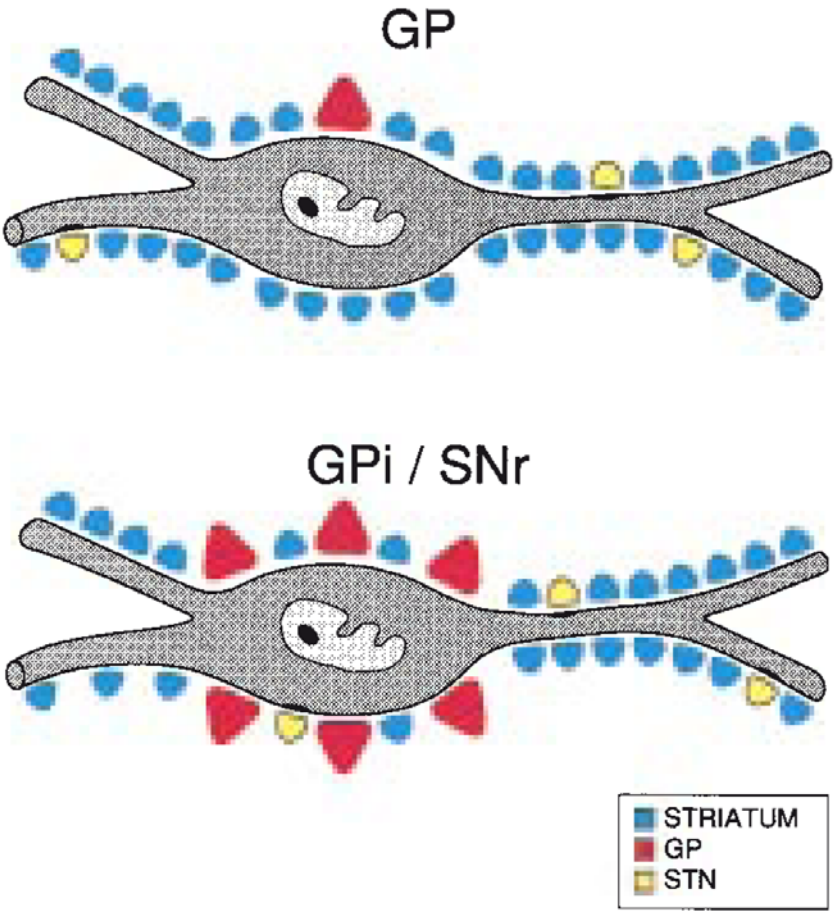


Figure 8 : Images résumant les afférences globales dans le GPe et le GPi chez le singe.

La taille et la proportion relative de chaque innervation sont représentées sur les images. Le GPi reçoit une grande partie de ces entrées du GPe, alors que les entrées issues du striatum et du NST sont réparties uniformément sur les neurones du GPe et GPi. (D'après Shink E. and Smith Y. ;1995)

intranucléaires des neurones pallidaux. La principale afférence du GPe en terme de densité d'innervation provient du striatum (Chang et al 1981, Hedreen & DeLong 1991, Park et al 1982, Wilson & Phelan 1982), principalement des MSNs de la voie indirecte, bien que quelques collatérales d'axones des MSN de la voie directe aient été décrites (Nadjar et al 2006). Ces projections forment une arborisation diffuse établissant des synapses symétriques avec les neurones pallidaux sur toute la longueur de leurs dendrites (Difiglia et al 1982, Parent & Hazrati 1995a, Parent & Hazrati 1995b, Park et al 1982, Smith et al 1998). Les neurones de la voie striato-pallidale co-expriment la GAD 67 et les enképhalines.

Il existe également une connectivité intrinsèque au sein de ce noyau. La majorité des neurones du GPe possède des collatérales d'axones (Falls et al 1983 , Francois et al 1984 , Kita 1994 , Nambu & Llinas 1997 , Park et al 1982). Ces axones peuvent innerver des régions restreintes ou étendues du noyau et forment des grappes de terminaisons denses sur les régions proximales d'un petit nombre de neurones (Kita 1994). Elles représentent 10% des terminaisons en contact avec le corps cellulaire chez le singe (Shink & Smith 1995) (**Figure 8**). L'analyse du champ de terminaisons axonales de neurones individuels du GP suggère que ce noyau pourrait être subdivisé en deux parties, avec la partie externe innervant la partie interne du GP (Sadek et al 2007). Cette observation indique un traitement des informations afférentes à l'intérieur même du GP.

2. Afférences glutamatergiques

Le Globus Pallidus reçoit des afférences excitatrices glutamatergiques, provenant du NST mises en évidence chez le primate (Canteras et al 1990, Kita et al 1983b , Nauta & Cole 1978) et chez le rat (Deniau et al 1978, Hammond & Yelnik 1983, Kita et al 1983a, Van Der Kooy & Hattori 1980). Les études de marquages intracellulaires (Hammond & Yelnik 1983 , Kita et al 1983a), des enregistrements électrophysiologiques (Deniau et al 1978 , Hammond et al 1983) et des expériences de traçages indiquent qu'un seul neurone du NST envoie des collatérales d'axone au GP, au EP et à la SNr (Deniau et al 1978 , Van Der Kooy & Hattori 1980). Ce n'est pas le cas chez le primate où il a été montré à l'aide d'un marquage rétrograde (Parent & Hazrati 1995b, Parent & Smith 1987b, Parent et al 1989) que les

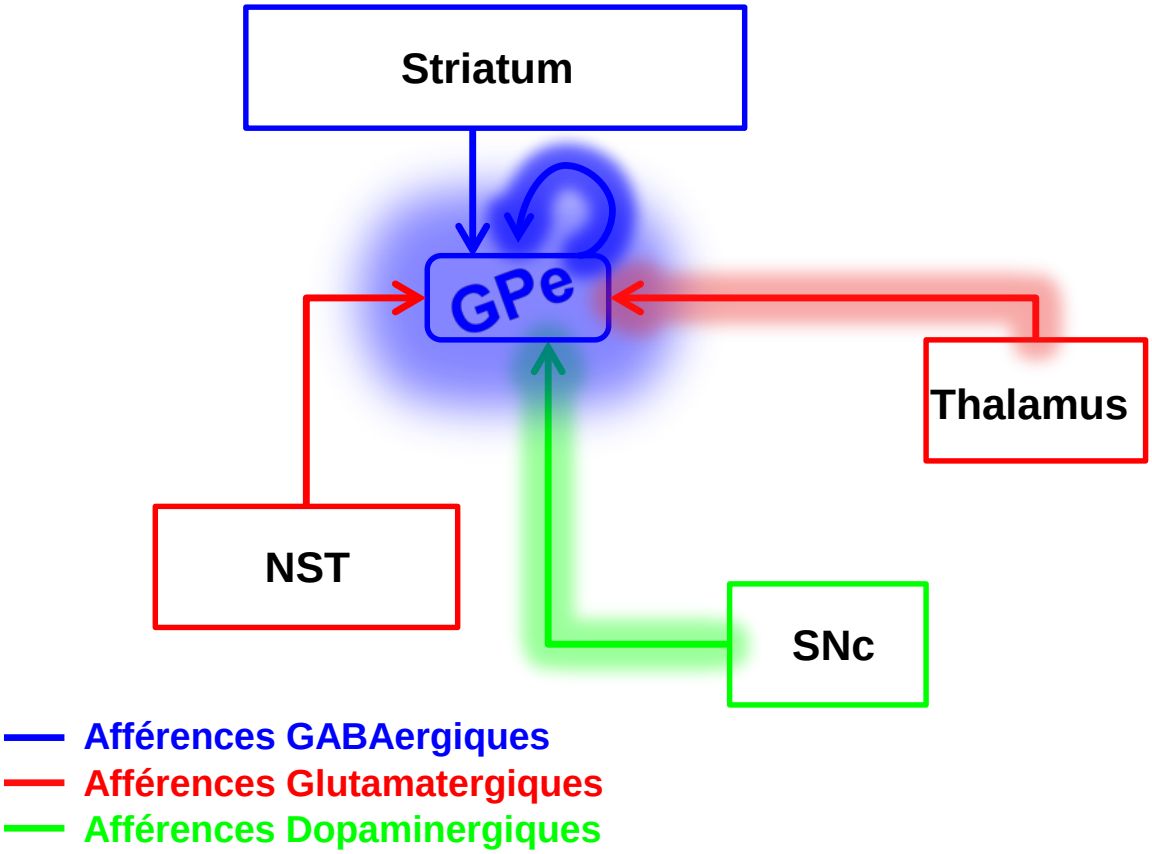


Figure 9 : Représentation schématique d'un modèle du réseau des GB décrivant les afférences du GP.

Le GP trouve dans ce modèle une fonction plus régulatrice que simple noyau relais de l'information motrice. Les **éfferences surlignées** représentent les afférences du GP décrites dernièrement.

neurones projetant sur le GPe et sur la SNr sont des populations distinctes spatialement au sein du NST (Parent & Smith 1987b). De même, il a été montré que les neurones du NST projetant sur le GPe étaient différents des ceux projetant sur le GPi (Parent & Hazrati 1995b , Parent et al 1989).

Ces projections forment des synapses de taille moyenne et asymétrique avec les neurones pallidaux (Kita & Kitai 1987 , Robledo & Feger 1990, Van Der Kooy & Hattori 1980). Beaucoup de neurones du NST qui reçoivent des entrées pallidales projettent en retour sur le GPe (Groenewegen & Berendse 1990 , Moriizumi et al 1987 , Mouroux & Feger 1993) indiquant une connectivité réciproque entre ces deux noyaux du moins à l'échelle macroscopique. En effet, actuellement il n'est toujours pas connu si un neurone du NST connecté par un neurone du GP, projette en retour sur ce même neurone.

L'autre source de glutamate du GP provient du thalamus. Ces projections thalamiques sont en fait des collatérales d'axones de neurones thalamostriataux issues du noyau parafasciculaire (Deschenes et al 1996 , Yasukawa et al 2004) **(Figure 9).**

3. Afférences dopaminergiques et sérotoninergiques

Enfin le GP reçoit des afférences dopaminergiques provenant de la SNc (Gauthier et al 1999 , Matsuda et al 2009) ainsi qu'une innervation sérotoninergique en provenance du raphé (Charara & Parent 1994) (**Figure 7**)**.**

L'existence d'une innervation dopaminergique du GP a été mise en évidence chez le rat, le singe et l'homme (Debeir et al 2005, Jan et al 2000)). Cette innervation, qui provient de collatérales d'axones nigro-striataux, est hétérogène pouvant être diffuse ou constituée de petites arborisations confinées dans une région du GP. L'analyse immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase (TH, enzyme de la voie de biosynthèse de la dopamine) au niveau du GPe de patients parkinsoniens a permis de montrer une dégénérescence de la voie nigro-pallidale suggérant que l'absence de modulation dopaminergique directe sur le GP pourrait contribuer aux perturbations d'activités électrophysiologiques mises en évidence dans ce noyau dans la maladie de Parkinson.

L'innervation dopaminergique du GP provient de collatérales d'axones nigrostriataux (Cossette et al 1999, Fallon & Moore 1978, Lindvall & Bjorklund 1979, Sato et al 2000). Il existe deux types d'axones nigrostriaux morphologiquement différents, un

qui innerve massivement le striatum et faiblement les structures extrastriatales comme le GP et un axone qui fait l'inverse (Cossette et al 1999). L'immunomarquage des fibres dopaminergiques par la tyrosine hydroxylase montrent qu'elles forment des contacts synaptiques avec les neurones du GP (Arluison et al 1984 , Zaborszky & Cullinan 1996).

D. La boucle Globus Pallidus externe / Noyau Sous-Thalamique

Les relations entre le GP et le NST semblent plus complexes qu'un « simple relais » entre le striatum et les structures de sortie. En effet, des projections du NST sur le GPe ont été mises en évidence chez le primate (Canteras et al 1990, Kita et al 1983a , Nauta & Cole 1978) puis l'existence de connections réciproques entre le GP et le NST ont été trouvées chez le rat (Kita & Kitai 1994 , Maurice et al 1998). Ce réseau constituerait une boucle de contrôle rétroactive de la voie « indirecte » (Parent & Hazrati 1995b , Robledo & Feger 1990 , Smith et al 1998). Le réseau GP-NST formant une boucle excitation-inhibition, ce dernier est considéré comme le générateur de rythme au sein du réseau des ganglions de la base (Bevan et al 2002a, Rubin & Terman 2000). Les données de la littérature *in vivo* suggèrent que l'activité oscillatoire du réseau GP-NST est fortement dépendante de l'activité corticale (Magill et al 2000) et, est aussi une caractéristique d'états physiopathologiques puisque cette activité oscillatoire et, corrélée entre ces deux noyaux a été observée chez le modèle rongeur de la maladie de Parkinson (Magill et al 2001) ou encore chez un modèle d'épilepsie (Paz et al 2005).

Il existe une étude *in vitro* suggérant que le réseau GP-NST peut générer des oscillations de manière autonome (Plenz & Kital 1999). Le mécanisme supposé de ces oscillations repose sur les propriétés particulières des neurones du GP et du NST. Ainsi, lors d'une forte inhibition d'origine pallidale, les neurones du NST répondent par un rebond post-inhibiteur qui correspond à une bouffée de potentiels d'actions qui fait suite à l'hyperpolarisation produite par l'inhibition GABAergique (Bevan et al 2002a, Bevan et al 2000). Cette bouffée de potentiels d'action va être renvoyée au GP via les projections glutamatergiques NST/GP et en retour, le GP va de nouveau inhiber le NST, ce qui permet ainsi l'entretien de cette activité oscillatoire alternée entre le NST et le GP (Gatev et al 2006).

	Caractéristiques des neurones du GP						
	Type	%	Activité spontanée	SAG	Rebond	Accommodation	Courant Ia
Nambu et Llinas, 1994	1	59	-	ND	-	+	+
	2	37	+	ND	+	-	-
	3	4	-	ND	-	-	+
Cooper et Stanford, 2000	A	63	-/+	+	+	ND	+
	B	32	+	-	-	ND	-
	C	4,5	-	-	-	ND	+
Bar-Gad et al., 2010	C	50	+	+	-	ND	ND
	B	18	+	+	+	ND	ND
	A	32	+	+	-	ND	ND
Gunay et al., 2012	Continuum neuronal						
Deister et al., 2013	Continuum neuronal						

Figure 10 : Tableau récapitulatif des propriétés électrophysiologiques des neurones du GP selon les études.

Les signes + et – désignent respectivement la présence ou l'absence des caractéristiques résumées dans le tableau. ND pour Non Déterminé signifie que ces paramètres n'ont pas été déterminés dans l'étude.

III. Propriétés électrophysiologiques des neurones du Globus Pallidus

A. Activité électrophysiologique des neurones du GP *in vitro*

Des études basées sur des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* réalisées sur des tranches aigües de cerveaux ont permis la caractérisation des propriétés membranaires des neurones du GP. Chez le cochon d'Inde, il a été suggéré l'existence de 3 types neuronaux au sein du GP (Nambu & Llinas 1994) appelés neurones de type 1, type 2 et type 3. Les neurones de type 1 sont des neurones silencieux mais qui s'activent et présentent une accommodation de leur décharge rapide avec l'injection de courant dépolarisant contrairement aux neurones de type 2 qui sont spontanément actifs et présentent une faible accommodation lors d'injection de courant dépolarisants. Les neurones de type 1 sont les plus nombreux (59%) par rapport aux neurones de type 2 (37%). Les neurones de type 3 sont minoritaires (4%) et correspondraient à des neurones silencieux ayant des PAs de longue durée. D'autres auteurs (Cooper & Stanford 2000) ont également suggérés l'existence d'une diversité électrophysiologique *in vitro* au sein du GP chez le rat selon les propriétés électrophysiologiques et la morphologie des neurones. Dans cette étude, ils décrivent 3 types neuronaux. Les neurones de type A, silencieux ou actifs sont les plus nombreux (63%). Ils sont identifiés par la présence d'un courant Ih, d'une AHP biphasique et d'une accommodation à la décharge qui est moyenne. Les neurones de type B sont spontanément actifs avec une AHP monophasique rapide. Ils deviennent irréguliers quand on les dépolarise et présentent alors une faible accommodation à la décharge. Ils ne présentent ni de rebond post-inhibiteur ni de courant Ih. Ils ont des courants K^+ de très grandes amplitudes et sont capables de décharger à très haute fréquence et sont caractérisés par une absence de courant Ih et de rebonds post-inhibiteurs mais possèdent une longue AHP biphasique. Il est possible de faire la corrélation entre ces différentes études. Les neurones de type A semblent correspondre aux neurones de type 2 décrit par Nambu et Llinas, tandis que les neurones de type B de plus petite taille présentent des similitudes avec ceux décrit par Millhouse (Millhouse 1986). Les types C, minoritaires, devraient correspondre aux grands neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert (**Figure 10**). Une étude plus récente vient aussi conforter l'existence de plusieurs

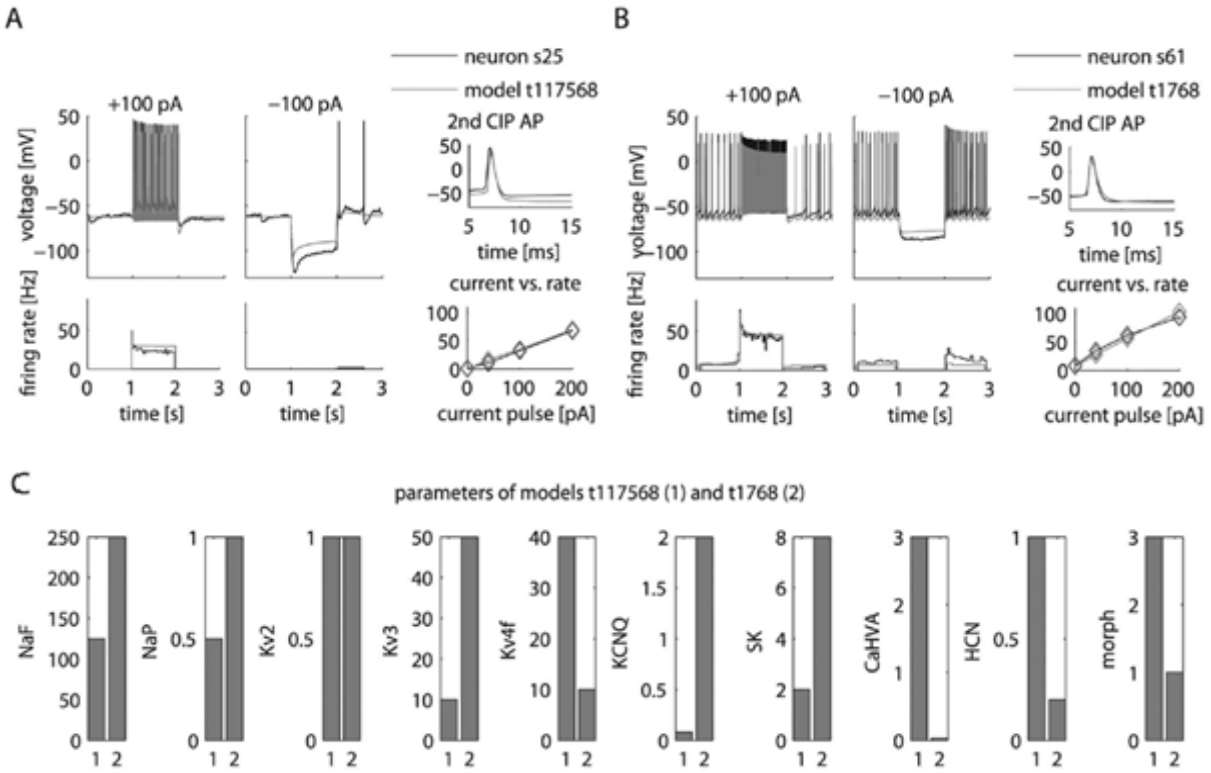


Figure 11 : Deux exemples d'activités électrophysiologiques extrêmes au sein du GP obtenues par modélisation d'un neurone du GP.

L'hétérogénéité neuronale au sein du GP est montrée par les deux exemples d'activité qui présentent des caractéristiques distinctes : une absence de décharge spontanée (A) ou une fréquence élevée (B) ou encore la présence ou non d'un « sag » en réponse à un créneau de courant hyperpolarisant.

Densité des différentes conductances en unités arbitraires permettant de modéliser l'activité des neurones du GP de type 1 ou de type 2 (C). D'après Gunay et al., 2008.

types neuronaux dans le GP en fonction de leur propriétés de décharge (Bugaysen et al 2010). Alors que l'ensemble de ces travaux semblent clairement indiquer l'existence de plusieurs types cellulaires dans le GP d'un point de vue électrophysiologiques, des données récentes viennent remettre en cause cette classification (Deister et al 2013, Gunay et al 2008).

La première étude réalisée par Gunay et collègues soutient l'existence d'un continuum neuronal au sein du GP (Gunay et al 2008). Celle-ci repose sur une comparaison entre les propriétés électrophysiologiques de plusieurs dizaines de neurones du GP enregistrés *in vitro* et la modélisation de ces données par un modèle informatique de neurone du GP. Grâce à ce modèle, la variabilité observée aux niveaux des propriétés intrinsèques des neurones du GP enregistrés en tranche a pu être reproduite en faisant varier la densité des canaux potentiels-dépendants présents sur les neurones du GP. Ainsi cette étude suggère qu'en fonction du niveau d'expression de certains canaux, il peut y avoir autant de types neuronaux dans le GP que de niveaux d'expression de canaux ioniques, ce qui implique qu'il n'est pas possible de classer les neurones du GP en sous-groupes sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques. A travers cet ensemble, les auteurs décrivent deux types d'activités électrophysiologiques extrêmes au sein du GP, sans décharge spontanée (**Figure 11A**) ou avec une fréquence de décharge spontanée élevée (**Figure 11B**). Ces deux types d'activité neuronale peuvent être reproduite par le modèle en manipulant la densité de plusieurs conductances ioniques présentent au niveau des neurones du GP (**Figure 11C**). Il existerait donc une hétérogénéité neuronale dans le GP liée à l'expression de certains canaux ioniques.

La seconde étude de Deister et collaborateurs (Deister et al 2013) ajoute, elle, un niveau de complexité supérieur en suggérant que l'activité des neurones du GP varie au cours du temps, ce qui rend là aussi impossible la classification des neurones du GP en sous-groupes en fonction de leur activité de décharge. Afin de mettre en évidence cette variation d'activité au cours temps, des neurones du GP ont été enregistrés en mode cellule attachée pendant plus vingt minutes consécutives, ce qui a permis de montrer d'importantes variations de fréquence de décharge instantanée au cours du temps, certains neurones passant d'une période silencieuse à une activité de décharge soutenue (Deister et al 2013).

Ces deux études viennent donc perturber la classification acceptée dans les années 1990-2000 et suggèrent donc que l'on ne peut pas se fier au mode de décharge des neurones du GP pour les classer en sous-populations.

De ces études *in vitro*, il ressort que dans la majorité des cas, les neurones du GP ont une activité pacemaker autoentretenue. Il a été montré que pas moins de 10 canaux potentiel-dépendants sont présents dans le GPe (Baranauskas et al 1999 , Chan et al 2004 , Mercer et al 2007, Surmeier et al 1994) qui, ensemble, déterminent les propriétés intrinsèques complexes de ces neurones (Gunay et al 2008). Si on s'intéresse maintenant aux conductances qui sont responsables de l'activité pacemaker des neurones du GP *in vitro*, deux types de canaux ioniques en particulier semblent jouer un rôle prépondérant. Comme pour de nombreux neurones pacemaker dans le cerveau (Beurrier et al 2000 , Bevan & Wilson 1999 , Do & Bean 2003 , Mercer et al 2007), les courants sodiques persistants (INaP) sont présents à la membrane des neurones du GP. Ces canaux présentent la particularité de ne pas s'inactiver et d'être ouverts à des potentiels de membranes inférieurs au seuil de déclenchement des potentiels d'action (seuil d'activation de *INaP* ~ -60 mV ; (Mittmann & Alzheimer 1998). Ainsi, ils dépolarisent en permanence le potentiel membranaire des neurones du GP et leur confèrent une activité pacemaker. En plus des courants INaP, les neurones du GP possèdent aussi des canaux HCN (Hyperlarisation-activated Non-specifique Cationic Channels) qui eux aussi participent au maintien du potentiel de membrane des neurones du GP à un niveau assez dépolarisé (Chan et al 2011, Chan et al 2004).

Les études menées sur des modèles rongeurs de la maladie de Parkinson suggèrent que les neurones du GP subissent des modifications de leur excitabilité cellulaire. Ainsi il a été montré que les neurones du GP perdent leur activité spontanée de décharge et deviennent silencieux suite à une réduction de l'expression des canaux HCN chez la souris 6-OHDA (Chan et al 2011). Ces résultats ont en parti été confirmés pour une étude réalisée dans notre équipe chez le rat 6-OHDA. Dans cette étude, une perte d'excitabilité a aussi été observée dans la majorité des neurones du GP. En revanche, les neurones restant ont une activité de décharge plus élevée qu'en condition contrôle, ce qui suggère une modification différentielle de l'excitabilité des neurones du GP (Miguelez et al 2012).



Figure 12 : Patrons de décharges typiques de deux neurones du GPe observés en absence de mouvement chez le primate.

Les neurones du GP peuvent être divisés en deux groupes : A : Les neurones du GPe déchargeant à haute fréquence (HFP) avec de longues pauses silencieuses, et en B : les neurones déchargeant à faible fréquence avec des bouffées de potentiels d'actions (LFB) (D'après DeLong, 1971).

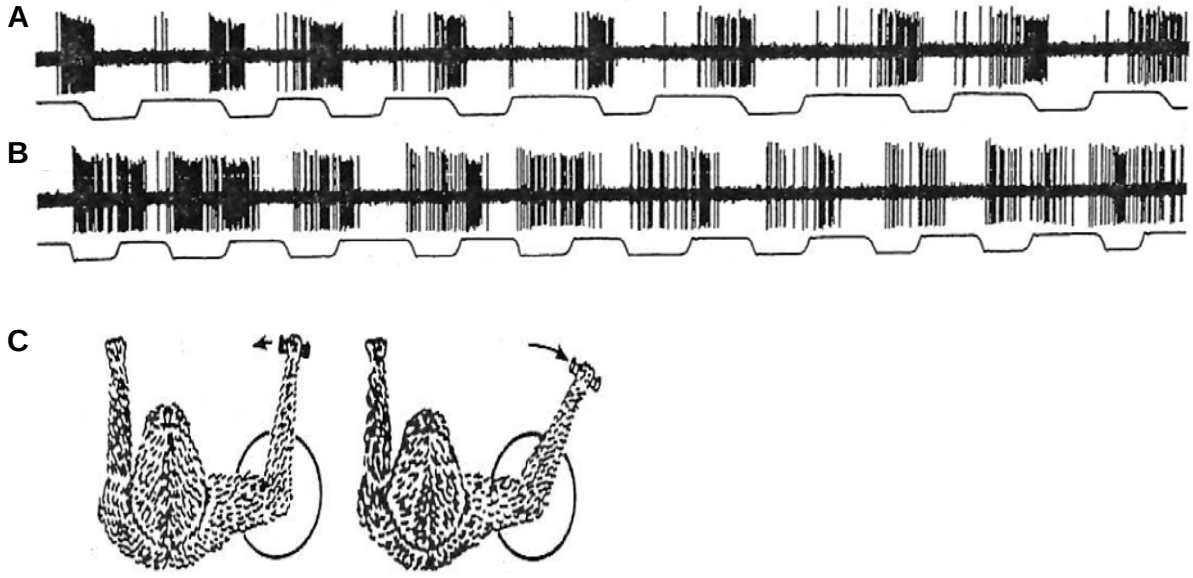


Figure 13 : Activité de décharge d'un neurone du GP durant des mouvements.

Mouvements de pousser-tirer (A) et de de latéralité (B) sur un levier. La ligne sous les tracés représente la position du levier. Pour les mouvements de pousser-tirer, le haut de la ligne représente le fait de tirer sur le levier alors que la ligne du bas représente le fait de pousser sur le levier. Pour les mouvements de latéralité (C), le haut du tracé (B) représente l'extension et le bas du tracé représente la flexion (D'après DeLong, 1971).

B. Activité des neurones du GP in vivo

1. En situation physiologique

1.1. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal éveillé

Chez l'animal éveillé et au repos, deux types neuronaux ont été mis en évidence chez le rat et le singe (Benhamou et al 2012, Bugaysen et al 2010 , DeLong 1971). La majorité des neurones du GP (80%) possèdent un patron d'activité tonique avec des pauses caractéristiques, ils sont appelés neurones « HFP » (high frequency pausers). Alors que les 20% restant présentent un patron d'activité moins tonique entrecoupé de bouffées de potentiels d'action ; ils sont appelés neurones « LFB » (low frequency busters) **(Figure 12)** (Benhamou et al 2012, Bugaysen et al 2010, DeLong 1971). La présence de pauses est considérée comme la signature électrophysiologique de ce noyau (Arkadir et al 2004 , Galvan et al 2005).

L'origine de ce patron d'activité reste discutée mais il a été observé que la probabilité d'apparition des pauses dans le GP est inversement proportionnelle au degré d'activité motrice du singe (Elias et al 2007). Nous ne savons pas comment est modifiée l'activité du GP lors d'un comportement moteur car peu d'études ont été réalisées afin de comprendre s'il jouait un rôle dans l'initiation ou la régulation du mouvement. Selon le schéma classique d'Alexander et Crutcher, le GP est activé afin d'inhiber le NST et les noyaux de sortie (SNr/GPi), et ainsi, libérer le thalamus pour que le mouvement soit initié. Mais aucune donnée électrophysiologique ne supporte cette activation. Il est juste acquis que l'activité des neurones du GP est modulée par le mouvement. Lors d'un mouvement, les neurones déchargent en bouffées de potentiels d'action avec une inhibition qui vient se caller en phase avec le mouvement (**Figure 13**). De plus les neurones du GP déchargent plutôt après le mouvement, ce qui va plus dans le sens d'un rôle dans la régulation plutôt que dans l'initiation du mouvement (DeLong 1971). De même, chez le rat il a été mis en évidence des changements d'activité des neurones du GP lors d'une tâche d'apprentissage de mouvement de la tête en réponse à un son (Gardiner & Kitai 1992). Ce changement d'activité est différent selon la direction du mouvement de la tête de l'animal. Enfin, une autre étude suggère que lors de la sélection (choix) d'un

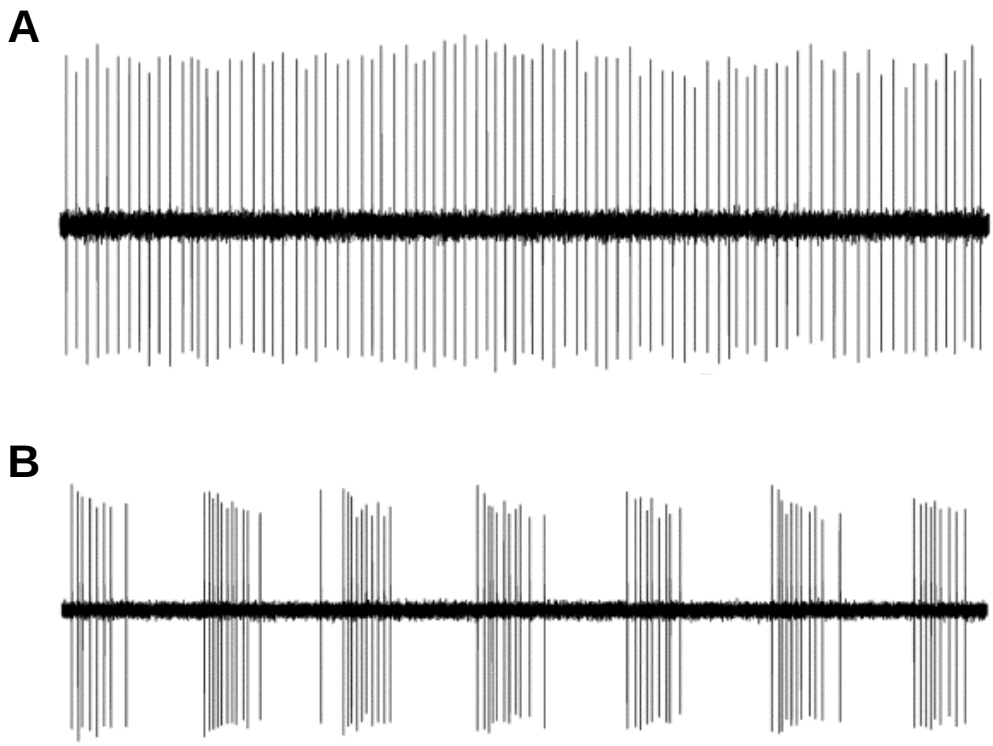


Figure 14 : Activité neuronale d'un neurone du globus pallidus chez le rat.

En **condition contrôle** (**A**), les neurones du GP presentent une patron de decharge régulier ; (**B**) en **condition de dépletion dopaminergique** chez le rat lésé à la 6-OHDA. En situation physiopathathologique, les neurones du GP déchargent en bouffées de potentiels d'action. (D'après Magill et al.,2001)

mouvement, les neurones du GP doivent être inhibés afin que les interneurones du striatum puissent augmenter leur activité (Gage et al 2010). Les modes de décharge caractéristiques sont conservés entre les espèces mais la fréquence de décharge est nettement plus basse chez le rat que chez le singe (Benhamou et al 2012). En effet, chez le singe, leur fréquence de décharge est comprise entre 30 et 50 Hz (Aldridge et al 1990 , Starr et al 2000). Chez le rat non anesthésié tête restreinte, l'activité des neurones du GP est plutôt régulière quel que soit l'état de vigilance de l'animal (Urbain et al 2000).

1.2. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal anesthésié

La majorité des neurones du GP étudiés chez le rat anesthésié présente des patrons de décharges avec des fréquences de 5 à 40 Hz et avec des PAs de courte durée (Kita & Kitai 1991 , Magill et al 2000 , Mallet et al 2008, Ni et al 2000).

Sous anesthésie à l'uréthane, l'activité des neurones du GP est principalement tonique avec un patron de décharge de type régulier (Magill et al 2000, Ni et al 2001). Dans ces conditions d'enregistrement, l'activité des neurones du GP n'est pas modulée dans le temps par les ondes lentes corticales (Mallet et al 2008) et l'activité entre paires de neurones n'est pas corrélée suggérant une absence de synchronisation (Mallet et al 2008).

2. En condition physiopathologique

2.1. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal éveillé

En situation de déplétion dopaminergique, l'activité des neurones du GP est profondément altérée (**Figure 14**). Les premiers travaux réalisés chez le singe MPTP ont permis la mise en évidence d'une réduction de la fréquence de décharge des neurones du GPe (Filion & Tremblay 1991, Miller 1987). L'activité régulière entrecoupée de pauses est remplacée par une activité en bouffée de potentiels d'action qui est une des signatures électrophysiologiques de la maladie de Parkinson (Filion & Tremblay 1991 , Nini et al 1995). Une autre caractéristique de la maladie de

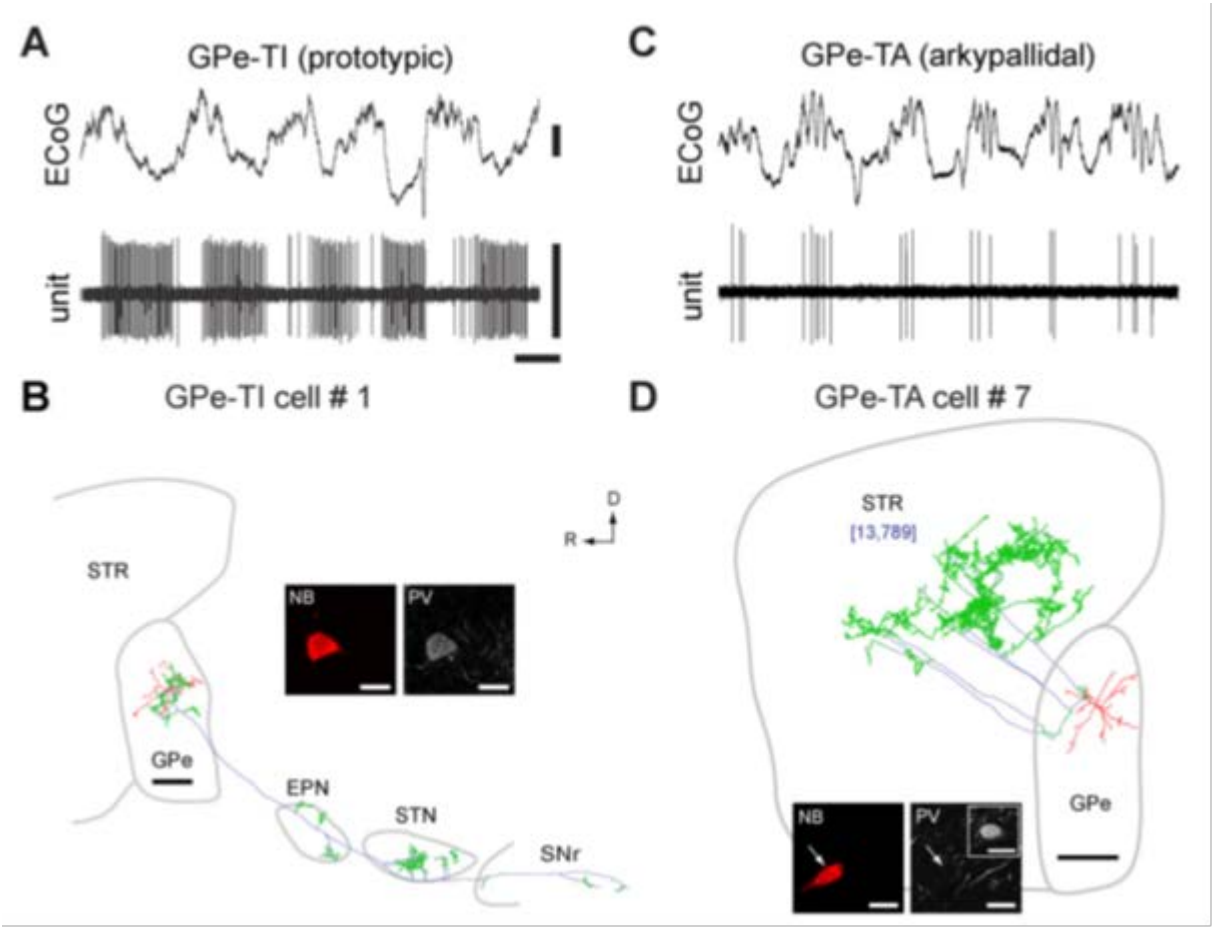


Figure 15 : Dichotomie anatomo-fonctionnelle des neurones du GP chez le rat 6-OHDA.

A-C: activité électrique d'un neurone GPe-TI (A) et d'un neurone GPe-TA (C) pendant les ondes lentes corticales.

B-D: Reconstruction complète d'un neurone GP-TI (B) et d'un neurone GP-TA (D) marqué par la neurobiotine (NB) sur une coupe sagittale et leurs images immunohistochimiques correspondantes illustrant la colocalisation et la non-colocalisation de la NB avec le neurone GP-TI exprimant la parvalbumine (PV) (B) et un neurone GP-TA n'exprimant pas la PV (D). L'innervation des neurones GP-TA est massive, dense et spécifique au striatum.

Les corps cellulaires et les dendrites sont dessinés en rouge, l'axone en bleu, et les boutons axonaux en vert. Voyez que le neurone descend innerver le thalamus et les autres noyaux de sorties des GB. EPN : noyau entopédonculaire, STN : noyau sous-thalamique, SNr : substance noire pars reticulata, GPe : globus pallidus externe et STR : striatum.

(Kato et al 2011)

Parkinson est l'émergence d'une synchronisation entre les neurones du GPe (Nini et al 1995). Les mécanismes responsables de cette synchronisation neuronale entre les neurones du GP ne sont pas connus, mais certains auteurs pensent que cette synchronisation peut apparaitre avec des changements de propriétés intrinsèques des neurones (Deister et al 2013).

2.2. Activité électrophysiologique des neurones du GP chez l'animal anesthésié

Chez le rat anesthésié, la plupart des neurones du GP ont aussi une fréquence de décharge réduite suite à une déplétion dopaminergique par rapport à la situation contrôle qui s'accompagne aussi d'une synchronisation entre les neurones (Mallet et al 2008). Il apparait aussi un excès d'activité dans la gamme des oscillations β (Mallet et al 2008) qui est aussi observé au niveau du NST (Mallet et al 2008, Sharott et al 2005).

Alors que chez les animaux témoins l'ensemble des neurones déchargent de manière régulière et non corrélée, en situation parkinsonienne deux types de neurones déchargeant en opposition de phase apparaissent (Mallet et al 2012, Mallet et al 2008). Ces deux types neuronaux ont respectivement été appelés GP-TA et GP-TI en fonction de leur activité de décharge pendant les ondes lentes de l'électrocorticogramme (ECoG). Ainsi, les neurones actifs lors de la phase active du tracé EcoG ont été dénommés GP-TA (**Figure 15C**) alors que ceux inactifs pendant la phase active de l'ECoG ont été appelés GP-TI (**Figure 15A**) (Mallet et al 2008). Quatre ans plus tard, ces mêmes auteurs ont suggéré l'existence d'une dichotomie anatomo-fonctionnelle au sein du GP (Mallet et al 2012). En effet en utilisant toujours le même critère pour classer les neurones, mais cette fois-ci complété par un marquage juxtacellulaire afin de reconstruire les neurones enregistrés et identifier le marqueur neuronal qu'ils expriment. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence que les neurones qui sont inactifs pendant la phase active de l'EcoG, les GP-TI, expriment la PV et projettent surtout sur les noyaux de sorties des GB (**Figure 15B**) alors que les neurones GP-TA, expriment la PPE et projettent uniquement sur le striatum (**Figure 15D**). Ces travaux ont donc permis la mise en évidence d'un type cellulaire au sein du GP, caractérisé par son type d'activité, son identité neurochimique et une innervation exclusivement dirigée vers le striatum. En raison de l'importance de cette innervation, les neurones GP-TA ont été dénommés neurones Arkypallidaux (Mallet

et al 2012). L'existence de ces deux populations en condition physiologique reste une question ouverte pour le moment.

IV. Le Globus Pallidus et le mouvement

Le rôle du globus pallidus dans le contrôle du mouvement a principalement été mis en évidence par des expériences de lésions ou de manipulations pharmacologiques.

A. Chez l'animal contrôle

La lésion à l'acide iboténique ou à l'acide kainique du globus pallidus chez le rat produit une akinésie, une catalepsie et une rigidité musculaire (Hauber et al 1998, Ossowska et al 1983). De manière similaire, une inactivation pharmacologique unilatérale de l'activité du GP induite par une potentialisation de la transmission GABaergique au niveau de ce noyau provoque un comportement rotatoire chez rat (Chen et al 2004 , Chen & Yung 2004). Ces expériences suggérant qu'une hypoactivité du GP entraine un syndrome hypokinétique. De façon opposé, le blocage de la transmission GABAergique par infusion de bicucculine au niveau du GPe chez le singe produit des dyskinésies sévères (Matsumura et al 1995).

B. Chez l'animal rendu parkinsonien

Une stimulation à haute fréquence chez le singe au sein du GPe et du GPi montre une amélioration des signes de la MP (Vitek et al 2004). L'ablation chirurgicale du GPe chez le singe MPTP entraîne une aggravation des symptômes moteurs de la MP, une altération de l'activité neuronale au sein du GPi et une réduction des effets de l'apomorphine (Zhang et al 2006). Ces résultats suggèrent que le GPe influence l'activité neuronale du GPi et est impliqué dans la MP.

V. Régulation dopaminergique du Globus Pallidus externe

A. Expression des récepteurs dopaminergiques au sein du Globus Pallidus externe

De nombreuses études suggèrent que les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 sont exprimés dans le GP (Camps et al 1990, Richfield et al 1987). Ces

récepteurs de la dopamine sont retrouvés soit au niveau des afférences synaptiques soit sur la membrane des neurones du GP.

Les récepteurs de la famille D2 sont situés sur les terminaisons axonales GABAergiques pallido-striatales (Deng et al 2006, Gerfen et al 1990 , Parent & Smith 1987a) et exerce un contrôle présynaptique de la libération de GABA (Cooper & Stanford 2001 , Shin et al 2003). En plus de leur présence au niveau présynaptique, les récepteurs D2 sont également exprimés sur les membranes post-synaptiques (Araki et al 2007, Mansour et al 1990 , Yung et al 1995). De plus, il a été suggéré que les neurones PPE positifs qui sont pallido-striataux expriment plus l'ARNm des récepteurs D2 que les neurones pallido-subthalamiques (Hoover & Marshall 2002 , Hoover & Marshall 2004), ce qui suggère que la dopamine modulerait l'activité d'une sous-population de neurone du GP. De manière plus controversée, il semble qu'un faible nombre de récepteurs D1 soient présents sur les terminaisons de synapses GABAergiques symétriques dans le GP du rongeur (Levey et al 1993 , Yung et al 1995). Quelques corps cellulaires des neurones du GP chez le rat ont montré une immunoréactivité pour les récepteurs D3 et D4 (Rivera et al 2003 , Khan et al 1998). Pour finir, des récepteurs D5 ont été identifiés dans le GP du rongeur et du singe (Ciliax et al 2000 , Khan et al 2000).

B. Effets des agonistes dopaminergiques sur les neurones du Globus Pallidus externe

La dopamine est indispensable au sein des GB pour avoir un fonctionnement moteur normal. La dopamine peut directement influencer la physiologie du GP par les collatérales dopaminergiques de la voie nigrostriée qui s'arborisent au sein du GP (Fallon & Moore 1978 , Gauthier et al 1999, Lindvall & Bjorklund 1979). Des expériences de microdialyses montrent que les terminaisons dopaminergiques au sein du GP sont fonctionnelles (Hauber & Fuchs 2000). De plus il a été montré chez le rat, que des injections systémiques d'agonistes dopaminergiques non-sélectifs augmentent la fréquence de décharge des neurones du GP et l'expression de la protéine c-fos. Cet effet semble apparaitre sous l'influence de la dopamine dans la voie striato-pallidale (Vargo et al 1996, Walters et al 1987).

Des études *in vitro* ont montré que l'agoniste des récepteurs D2 réduisait la fréquence des courants miniatures inhibiteurs dans le GP (Cooper & Stanford 2001 , Watanabe et al 2009). L'injection locale d'agoniste des récepteurs D2 supprime

l'inhibition induite par la stimulation striatale chez le GP du rongeur (Bergstrom & Walters 1984). Des études récentes *in vitro* ont révélé que la dopamine supprimait l'inhibition striato-pallidale et que cette suppression était due à l'action synergique de récepteurs D2 présynaptiques et de récepteurs D4 post-synaptiques (Chuhma et al 2011, Shin et al 2003 , Watanabe et al 2009).

L'application de dopamine par iontophorèse au sein du GP peut soit augmenter ou diminuer l'activité individuelle des neurones du GP (Bergstrom & Walters 1984 , Chrobak & Napier 1993, Huffman & Felpel 1981 , Maslowski & Napier 1991).

Bien que très peu d'études ont exploré les effets comportementaux de l'injection d'agonistes ou d'antagonistes localement au niveau du GP, ces dernières suggèrent que certains comportements moteurs impliquent les récepteurs dopaminergiques du GPe (Costall et al 1972 , Fletcher & Starr 1987 , Galvan et al 2001, Hauber & Lutz 1999).

La dopamine libérée au niveau du GP jouerait un rôle important dans le contrôle moteur car l'infusion locale d'un antagoniste des récepteurs D1 ou D2 entraîne des akinésies chez le rat (Hauber & Lutz 1999). En revanche, des infusions de DA dans le GP, permettent de restaurer partiellement les déficits moteurs chez un modèle de rat de la maladie de Parkinson (Galvan et al 2001). En conclusion, il semble que la dopamine exerce une modulation complexe de l'activité des neurones du GP, en agissant sur différents types de récepteurs localisés au niveau pré- et post-synaptiques.

VI. Objectifs

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, il existe un faisceau d'évidences suggérant l'existence d'une diversité neuronale au sein du GP, tant au niveau neurochimique, embryonnaire et électrophysiologique. De plus la mise en évidence d'une dichotomie fonctionnelle au niveau du GP (Mallet et al 2012) appelle à reconsidérer la place du GP dans réseau des GB ainsi que son rôle dans le contrôle de l'exécution du mouvement. Dans leur étude, Mallet et Collègues ont mis en évidence deux types neuronaux dans le GP, caractérisés par l'expression soit de la PV soit de la PPE ainsi que par leur activité électrophysiologique *in vivo*. La principale question à laquelle nous avons voulu répondre est de déterminer si cette différence d'activité *in vivo* peut reposer sur des propriétés membranaires distinctes

des neurones PV et PPE du GP. Afin de répondre à cette question, nous avons mis en place une étude multi-disciplinaire avec pour objectifs :

1) De caractériser sur le plan neurochimique et embryonnaire les différentes populations neuronales du GP,
2) De caractériser les propriétés électrophysiologiques *in vitro* des neurones du GP en fonction de l'expression de marqueurs neurochimiques spécifiques,
3) D'identifier les structures sur lesquelles projettent les principales populations neuronales du GP,
4) Enfin de manipuler l'activité de la population majoritaire du GP, les neurones exprimant la PV, et de déterminer l'effet de cette manipulation sur le comportement moteur de l'animal

Matériels et Méthodes

Chapitre 1 : Enregistrements électrophysiologiques sur des tranches fraîches de cerveau de rongeur

Chapitre 2 : Histologie

Composition (en mM)	NaCl	KCl	NaH_2PO_4	$CaCl_2$	$NaHCO_3$	$MgSO_4$	D-Glucose	Saccharose
Solution de prélèvement		2.5	1.25	0.5	26	10	10	250
ACSF standard	126	2.5	1.25	2	26	2	10	
ACSF modifié	126	3	1.25	1.6	26	1.5	10	

<u>Tableau 1</u> : Composition des solutions extracellulaires.

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

Matériels et Méthodes

Toutes les expériences de mon doctorat ont été réalisées en accord avec la directive du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) du Conseil de la Communauté Européenne, concernant l'utilisation d'animaux de laboratoire. Les protocoles expérimentaux ont aussi été validés par le Comité d'Ethique de l'Université de Bordeaux (n° d'agrément CE5012075-A).

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

A. Préparation des tranches

Les expériences électrophysiologiques ont été réalisées sur des tranches aigües de cerveau de rat (souche Sprague-Dawley) et de souris transgéniques de la lignée PV-Ai9 (cf paragraphe 2.6 du « matériels et méthodes »). Les rats et les souris utilisés dans notre étude sont issus de portées naturelles et âgés de 15 à 30 jours post-nataux pour les expériences d'électrophysiologies ou de 6 à 8 semaines pour les expériences d'optogénétique *in vitro*. Après anesthésie générale par injection en intra-péritonéale d'un mélange Kétamine (75mg/Kg) et Xylazine (10 mg/Kg), une thoracotomie est effectuée rapidement, suivie par une perfusion intracardiaque de 20 mL de solution enrichie en sucrose (solution de prélèvement, **tableau 1**), oxygénée par un mélange de 95% d'O_2 et 5% de CO_2 et préalablement refroidie entre 0 et 4°C. Cette étape permet de remplacer le sang du cerveau par la solution de prélèvement afin de ralentir le métabolisme cellulaire des neurones et de réduire l'excitabilité cellulaire et l'activité synaptique en raison de la faible concentration extracellulaire en ions sodium et calcium. L'animal est ensuite décapité, les os du crâne sont retirés et le cerveau est mis à nu. Les deux hémisphères sont séparés grâce à une incision au scalpel au niveau de la ligne médiane. Ils sont ensuite retirés et placés dans une boîte de Pétri contenant la solution de prélèvement froide et oxygénée. L'isolation du cerveau doit être effectuée rapidement pour garantir une bonne survie neuronale, mais le soin et la délicatesse des opérations sont des éléments importants pour obtenir des tranches de cerveau d'excellente qualité. Les 2 hémisphères sont collés séparément sur un porte échantillon afin d'être découpés en tranches de 350µm d'épaisseur dans le plan sagittal avec un vibratome (VT1200S, Leica Microsystems),

Composition (en mM)	$KMeSO_4$	NaCl	$MgCl_2$	HEPES	EGTA	Na_3GTP	MgATP
	135	3.8	1	10	0.1	0.4	2

Tableau 2 : Composition de la solution intracellulaire.

Ces solutions ont été utilisées pour les enregistrements de patch-clamp ; Osmolarité : 290-295 mOsm ; pH~ 7.2 ajusté avec du KOH

ce qui permet d'obtenir 3 tranches contenant le GP par hémisphère. Celles-ci sont ensuite recueillies et placées sur une membrane de nylon dans un bécher contenant une solution oxygénée de type extracellulaire appelée « artificial cerebrospinal fluid » (ACSF standard ; **tableau 1**). Le bécher est placé dans un bain-marie à 34°C pendant environ 1 heure avant de commencer les enregistrements, afin de permettre aux tranches de cerveau de récupérer de la coupe et de relancer les processus métaboliques.

B. Solutions

1. Solutions extracellulaires

Les solutions utilisées sont adaptées pour reproduire les milieux physiologiques (extracellulaires et intracellulaires) des neurones. L'osmolarité est particulièrement contrôlée pour éviter les chocs osmotiques entre l'intérieur et l'extérieur des neurones. A noter que les solutions sont maintenues à un pH de 7,3-7,4 grâce au bullage constant par un mélange gazeux O_2/CO_2 (95% / 5%). La concentration des différents sels est également calculée pour respecter les valeurs théoriques des potentiels d'équilibre des ions. Du pyruvate (110 mg/L) et du glutathion (1,5 mg/L), sont ajoutés dans la solution d'ACSF standard pour alimenter le cycle de Krebs et ainsi empêcher la mort cellulaire pendant le temps de récupération.

2. Solutions intracellulaires

Pour les enregistrements de patch-clamp, nous avons utilisé une solution intrapipette riche en potassium méthyl sulfate ($KMeSO_4$) dont la composition est décrite dans le **tableau 2** ci-dessous. Lors des expériences réalisées en mode *«cellule entière»*, 0.25-1% de biocytine est ajoutée le jour de l'expérience dans la solution intrapipette afin de pouvoir retrouver et identifier les neurones enregistrés après révélation immunohistochimique de la biocytine. Pour les expériences de patch perforé, 0,15 µL de solution stock de gramicidine (15 mg/mL) préparée fraîchement le jour de l'expérience dans du Dimethyl sulfoxide (DMSO) sont dilués dans 100 µL de solution intrapipette juste avant de remplir l'électrode. Pour faciliter l'établissement du gigaseal, la pointe de l'électrode est remplie avec de la solution sans gramicidine.

C. Enregistrements électrophysiologiques

1. La chambre d'enregistrement

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

2. La technique du patch-clamp

La technique du patch-clamp a été mise au point au début des années 1980 (Hamill et al 1981). Plusieurs modes d'enregistrements sont possibles avec cette approche en fonction des paramètres que les expérimentateurs souhaitent étudier (Sakmann & Neher 1984).

3. Enregistrements en configuration «cellule attachée»

Cette configuration consiste à l'aide d'un micromanipulateur à poser une microélectrode de verre d'un diamètre de pointe de l'ordre du µm sur la membrane du neurone, afin d'établir un contact mécanique et électrique fort entre les parois de l'électrode et la membrane appelé « giga-seal ». Il est nécessaire d'appliquer une pression positive à la pipette afin d'éviter qu'elle ne se bouche par des débris cellulaires lors de la descente. Les enregistrements en *«cellule attachée»* ont été faits exclusivement en voltage imposé en fixant le potentiel de membrane à -60 mV. Nous avons utilisé cette configuration pour réaliser des enregistrements de longue durée (> 20 minutes) en continu afin de déterminer la variabilité de la décharge des neurones du GP au cours du temps (Deister et al 2013). La configuration « cellule attachée » permet d'enregistrer l'activité électrique extracellulaire des neurones sans perturber le milieu intracellulaire.

4. Enregistrements en configuration «cellule entière»

Les propriétés de décharge des neurones sont le plus souvent étudiées en configuration « *cellule entière»*. Pour atteindre cette configuration, après l'obtention du « giga-seal » on casse le bout de membrane sous l'électrode afin d'accéder au milieu intracellulaire. Le potentiel de membrane du neurone peut alors être enregistré et manipulé grâce à l'injection de courants à travers l'électrode : ce mode d'enregistrement est appelé « courant-imposé ». La plupart de nos expériences ont été réalisées en courant-imposé. L'inconvénient de la configuration *«cellule entière»* est la dialyse du milieu intracellulaire des neurones, qui peut perturber les processus enzymatiques et affecter l'activité de décharge. Cet inconvénient devient un avantage pour faire diffuser de la biocytine dans les neurones.

5. Le patch perforé

La technique du patch perforé constitue une alternative à la configuration *«cellule entière»*, elle permet d'enregistrer sans dialyser et donc sans modifier le milieu intracellulaire du neurone et ainsi d'obtenir des enregistrements électrophysiologiques de meilleure qualité. Cette méthode mise au point par Horn et Marty (1988) (Horn & Marty 1988) utilise les propriétés des antibiotiques pour former des pores dans les membranes lipidiques perméables uniquement aux ions monovalents et aux molécules d'un diamètre inférieur à 10 Ä. L'antibiotique que nous avons utilisé est la gramicidine, qui a pour particularité de ne laisser passer que les cations monovalents. La gramicidine est mélangée avec la solution intracellulaire à une concentration finale de 15-20 µg/mL. Une fois la configuration cellule-attachée obtenue, la gramicidine va perméabiliser le morceau de membrane qui se trouve sous la pipette et, progressivement, produire un accès électrique à l'espace intracellulaire. Une fois la phase de perforation stabilisée, ce qui prend entre 30 et 45 minutes, il est alors possible d'enregistrer l'activité de décharge des neurones sans perturber le milieu cytoplasmique. Néanmoins, cette technique reste difficile à utiliser car le risque de passer au cours de l'expérience dans la configuration « cellule entière » n'est pas négligeable, et si le morceau de membrane se rompt sous l'effet de l'antibiotique, celui-ci diffuse alors librement dans la cellule et perméabilise l'ensemble des membranes cellulaires. Ce changement brutal de configuration se traduit par un saut du potentiel de membrane de quelques mV dans nos conditions

accompagné par une augmentation instantanée de l'amplitude des potentiels d'action. L'enregistrement est donc aussitôt arrêté.
Le patch perforé a pour inconvénient de produire des résistances série élevées. Pour les expériences de potentiel imposé, nous avons préféré la configuration *«cellule entière»* au patch perforé afin d'obtenir les résistances série les plus faibles possibles et ainsi préserver les cinétiques des courants ioniques.

6. Préparation des électrodes de patch-clamp

Les enregistrements de patch-clamp sont réalisés avec des pipettes de borosilicate préparées grâce à une étireuse horizontale (P-97 ; Sutter Instruments, Novato, CA). Une fois remplie avec la solution intracellulaire de KMeSO4, les pipettes ont une résistance comprise entre 4 et 6 MΩ. Pour les enregistrements électrophysiologiques en patch perforé, nous avons utilisé des pipettes sans filament (GC150-10 ; Warner Instruments, Hamden, CT) afin de retarder le mélange de la solution intracellulaire contenant la gramicidine avec la solution sans l'antibiotique présente à la pointe de l'électrode. Pour tous les autres enregistrements, nous avons utilisé du verre avec filament pour faciliter le remplissage de l'électrode avec la solution intracellulaire (GC150F-10 ou GC150-10 ; Warner Instruments, Hamden, CT).

7. Injection de biocytine pour l'identification immunocytochimique du neurone enregistré

Pour l'ensemble des expériences, nous avons injecté de la biocytine dans les neurones afin d'identifier leur nature neurochimique par post-immunohistochimie. Cette injection a été réalisée pour tous les neurones en configuration « cellule entière ». Ainsi, la biocytine (0.25-1%) directement supplémentée au milieu intra-pipette diffuse dans toute l'arborisation du neurone pendant la durée de l'enregistrement.
Nous avons donc, lors de nos expériences de « cellule attachée » et de « patch perforé », dû re-patcher nos neurones à l'aide d'une nouvelle électrode remplie de biocytine. Nous avons développé cette approche pour plusieurs raisons : i) la biocytine est une molécule trop grosse pour passer à travers les pores formés par la gramicidine en « patch perforé », ii) il est très difficile de rompre la membrane sous la pipette après un certain temps d'enregistrement en « patch perforé » et en « cellule

attachée », iii) passer en configuration *«cellule entière»* directement avec l'électrode contenant de la gramicidine provoquerait la perméabilisation par l'intérieur de toute la membrane plasmique et la mort du neurone.

8. Avantages et limites de la technique de patch-clamp et des tranches

Le patch-clamp est une technique qui s'est avérée très utile depuis 35 ans mais elle présente certaines limites, comme toute technique utilisée en biologie. Dans notre étude, son apport majeur est de nous permettre de définir les propriétés intrinsèques des neurones en bloquant les transmissions glutamatergiques et GABAergiques majeures. Son premier avantage est l'utilisation d'une tranche de cerveau qui nous permet de pouvoir observer avec précision les neurones à enregistrer. De plus, la tranche permet de choisir les éléments d'un réseau que l'on veut préserver ou non dans la tranche. En effet, de nombreuses structures interagissent entre elles et l'étude d'une communication *in vivo* peut être biaisée par la mise en jeu de nombreuses boucles. Le patch-clamp permet donc d'étudier des communications neuronales dans le détail, alors que les méthodes *in vivo* permettent d'avoir des informations sur les interactions de réseau. En revanche, la sélectivité des communications en tranche fait que l'on peut passer à côté de certains mécanismes justement parce que le réseau n'est pas intact. De plus, certains neurones ont leur axone ou leurs dendrites coupés par l'axe de coupe, ce qui peut changer leur physiologie. La coupe du cerveau en tranches induit également la libération de facteurs inflammatoires par les neurones et les cellules gliales qui peuvent affecter les mécanismes étudiés. Le deuxième point concerne le patch-clamp en lui-même. D'un côté, la configuration *«cellule entière»* est très pratique car elle permet d'enregistrer des courants très faibles (jusqu'à 1 pA). Il est également possible de tester certaines hypothèses en changeant les concentrations ioniques ou en ajoutant des agents pharmacologiques. D'un autre côté, les milieux intra- et extracellulaires ne sont pas exactement identiques aux milieux réels, ce qui peut affecter la physiologie des neurones. Par exemple, certains processus de phosphorylation peuvent être inhibés par l'envahissement de la cellule par le milieu intracellulaire artificiel. Pour éviter cela, notre alternative est la technique du patch perforé.

9. Pharmacologie

Tous les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés en présence de CGP 55845 (1 µM, (2*S*)-3-[[(1*S*)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl) phosphinic acid hydrochloride), d'APV (50 µM, D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid), de DNQX (20 µM, 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione) et de GABAzine (SR95531, 20 µM, 6-Imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6*H*)-p yridazinebutanoic acid hydrobromide) afin de bloquer respectivement les récepteurs $GABA_B$, NMDA, AMPA/Kainate et $GABA_A$. L'ensemble de ces produits a été obtenu chez Abcam. Pour les expériences de potentiel imposé, de la tétrodotoxine (TTX, 1µM) a aussi été ajoutée dans l'ACSF afin de bloquer les canaux sodiques potentiel-dépendants (Na_V).

10. Acquisition des données et protocoles utilisés

Les signaux électrophysiologiques ont été mesurés grâce à un amplificateur de patch-clamp (Multiclamp 700B, Molecular Devices) connecté à une interface analogue/digital (Digidata 1320, Molecular Devices). L'acquisition des données électrophysiologiques a été réalisée avec le logiciel PClamp 9.2.

10.1. Enregistrements en courant imposé.

Pour les expériences en mode courant imposé, nous avons utilisé deux types de protocoles :

- des créneaux de courants hyperpolarisants (entre 0 et -150 pA par incrément de 10 pA) d'une durée de 500 ms afin de déterminer la courbe I/V des neurones.
- des créneaux de courants dépolarisants (0-250 pA, par incrément de 25 pA) d'une durée de 2 secondes pour rétablir la relation fréquence de décharge en fonction du courant injecté (courbe f/i).

10.2. Enregistrements en potentiel imposé.

Pour étudier les canaux sodiques persistants (INaP), des rampes de potentiel entre -70 et -15 mV ont été imposées aux neurones à une vitesse de 11 mV/s afin d'inactiver les canaux responsables des courants sodiques rapides responsables du potentiel d'action.

11. Analyse des données

L'analyse des enregistrements électrophysiologiques a été faite à l'aide des logiciels Clampfit 9.2 et Origin 7.

11.1. Analyse des paramètres du potentiel d'action

Les caractéristiques du potentiel d'action (PA) ont été mesurées sur les enregistrements de décharge spontanée des neurones. Le point le plus hyperpolarisé après le potentiel d'action (AHP) est mesurée manuellement à l'aide de Clampfit alors que le seuil de déclenchement du PA (sdPA) est calculé avec la méthode du diagramme de phase. Cette méthode permet de déterminer de manière fiable et indépendamment de l'expérimentateur le sdPA. Pour obtenir le diagramme de phase du PA, le potentiel est dérivé (dV/dt) et représenté en fonction du potentiel (V) (voir **Figure 25 Aii-Cii**), cette représentation permet facilement d'identifier les différentes phases du PA tel que l'AHP et l'overshoot qui correspondent aux points où la vitesse est nulle. Le sdPA correspond lui, au point où la vitesse de dépolarisation du potentiel commence à augmenter et plus précisément au moment où l'accélération est la plus forte. Ainsi pour définir le sdPA, nous utilisons la dérivée seconde du potentiel.

11.2. Mesure de l'adaptation à la décharge des neurones du GP

En plus de la courbe f/i, nous avons analysé deux autres paramètres lors des injections de créneaux dépolarisants, l'index de bouffée qui correspond au ratio entre la fréquence instantanée entre les deux premiers PA (f2/f1) et l'index d'adaptation qui correspond au ratio entre la fréquence instantanée entre le dernier et le premier PA (fn/f1). Cette analyse a été utilisée au niveau du cortex pour différencier différents types cellulaires (Christophe et al 2005 , Shepherd 2013).

11.3. Mesure du sag et correction des valeurs de potentiel en patch perforé

Les neurones du GP expriment des canaux HCN (hyperpolarization-activated Cationic Non-specific channels) qui sont activés par des créneaux hyperpolarisants et dont l'ouverture entraîne une dépolarisation qui vient s'opposer à l'hyperpolarisation produite par l'injection de courant négatif. La différence de potentiel entre le début (Vpic) et la fin (Vstable) du créneau hyperpolarisant qui est

appelée « sag » permet de mesurer de manière indirecte l'activation de ces canaux. La résistance série est élevée en patch perforé (de l'ordre de 40 à 100 MΩ), ce qui induit une erreur de lecture du potentiel de membrane du neurone lors de l'injection de courant. Nous avons donc corrigé les potentiels mesurés en mesurant la résistance série (Rs) du neurone et en corrigeant le potentiel par la valeur obtenue en multipliant Rs par le courant injecté (Vcorrigé = Vmesuré – (Rs x Courant injecté)). L'ensemble des potentiels mesurés lors d'injection de courant a donc été corrigé pour la mesure du sag.

11.4. Analyse du rebond post-inhibiteur

Le rebond post-inhibiteur correspond à une décharge de potentiels d'action, le plus souvent à haute fréquence, qui se développe à la fin d'un créneau hyperpolarisant et qui met en jeu des canaux calciques à bas seuil de la famille CaV3. Si la fréquence de décharge du neurone après l'hyperpolarisation est supérieure à la fréquence basale moyenne de ce neurone plus 3 fois l'erreur standard à la moyenne, nous avons considéré que le neurone possède un rebond-post-inhibiteur. De plus, nous avons analysé plusieurs paramètres comme la fréquence maximale de décharge et la fréquence moyenne du rebond, sa durée ainsi que le temps de latence du premier PA déclenché après la fin de créneau hyperpolarisant.

11.5. Analyse des courants sodiques persistants

Pour activer les courants INaP, nous avons effectué des rampes de potentiel dépolarisantes en potentiel imposé en absence et en présence de TTX. Le courant INaP est obtenu en soustrayant du courant en condition contrôle le courant mesuré en présence de TTX. Nous avons ensuite transformé ce courant en conductance (g) en utilisant la formule $g=i/(V_m-V_{Na})$. Cette courbe a été ajustée avec une fonction de Boltzman ($y= A2 + (A1-A2) / (1+ e^{((V-V_{1/2})/k)}$) afin d'obtenir le potentiel auquel 50% des canaux sont activés ($V_{1/2}$).

12. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Prism. La taille de nos échantillons étant le plus souvent trop faible pour déterminer si la répartition des données suit une loi normale, nous avons utilisé des tests non-paramétriques. Pour

les données appariées, nous avons utilisé le test de Wilcoxson et pour les données non appariées, celui de Mann-Whitney. Pour les comparaisons entre trois groupes, nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis avec une procédure post-hoc de Dunn. Les données ont été considérées comme significativement différentes pour des valeurs de p inférieures à 0,05. Tous les résultats dans les figures sont présentés sous la forme de la valeur moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne).

II. Histologie

A. Marquages immunohistochimiques

27 rats mâles de souche Sprague Dawley, âgés de 30 à 35 jours ont été profondément anesthésiés par de l'uréthane 20%. L'oreillette droite est incisée puis une aiguille placée dans le ventricule gauche permet de perfuser les animaux, tout d'abord au moyen de 100 mL d'un tampon phosphate (PBS ; 0.1M, pH=7.4) puis avec 200 mL d'une solution fixatrice de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS avec une vitesse de perfusion constante de 15 mL/min afin d'évacuer tout le sang au niveau du cerveau et de fixer le tissu cérébral. Les animaux sont ensuite décapités, leur cerveau rapidement prélevé et post-fixé par immersion dans du PFA 4% et stocké à 4°C pendant la nuit. Les cerveaux sont ensuite placés durant 24 heures dans une solution de PBS-sucrose 20% afin de cryo-protéger le cerveau en vue de la congélation. Celle-ci s'effectue lorsque le cerveau est complètement imbibé de sucrose en le plongeant dans de l'isopentane préalablement refroidie à -45°C. Le cerveau est ensuite conservé à -80°C jusqu'au moment de la coupe. Des coupes de 50 µm d'épaisseur contenant le GP sont réalisées à -19°C selon le plan frontal au cryostat (Leica, CM3000) et sont conservées dans une solution protectrice de PBS-azide (0.2% de sodium azide) à 4°C, afin de les protéger de toute infection fongique en attendant d'effectuer les différentes immunohistochimies.

Après un lavage de 5 minutes dans du PBS, les coupes sont placées deux heures dans une solution de saturation/perméabilisation PBS-BSA (bovin serum albumin) 1% - Triton 0.3%. Le Triton permet de perméabiliser les membranes cellulaires pour permettre la pénétration des anticorps et la BSA de saturer les sites de fixation non spécifiques. Pour les immunohistochimies visant à détecter la préproenképhaline (PPE), une étape de démasquage antigénique est réalisée. Celle-ci consiste à chauffer les coupes à 80°C pendant 3 heures au bain-marie dans une solution de

PBS-citrate-NaOH (10mM, pH=6) (Jiao et al 1999). Ce traitement permet aussi de dégrader la PPE présente dans les terminaisons neuronales striatales afin d'obtenir un marquage des corps cellulaires du GP uniquement. Les coupes sont ensuite lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS avant d'être incubées une nuit à température ambiante en présence d'une combinaison de 2 ou 3 anticorps primaires parmi lesquels : l'anti-PPE (PENK, LSBio, LS-C23084, lapin ; dilution 1/5000^{e}) et l'anti-PV (Parvalbumine ; Synaptics system, 195004, cochon d'Inde, d=1/1000^{e}) et l'anticorps de souris anti-NeuN (Neuron nuclei ; millipore, MAB377d=1/500^{e}), l'anticorps de chèvre anti-FoxP2 (Forkhead Box 2 Protein ; Santa Cruz ; d=1/200^{e}), l'anticorps de lapin anti-Nkx2.1 (anti-TTF-1 ; Santa Cruz ; d = 1/500^{e}) dilués dans du PBS-BSA 1%-Triton 0.3%, pendant 1 nuit. Les coupes sont ensuite lavées 6 fois 5 minutes dans du PBS, avant d'être incubées 3 heures avec les anticorps secondaires dilués au 1/500^{e} couplés à différents fluorophores (Alexa-488 ; Alexa-568 ; Alexa-649). Enfin les coupes sont lavées 6 fois 5 minutes puis sont montées sur des lames gélatinées, sous lamelle avec un milieu de montage préservant la fluorescence (H-1000 Vectashield ; Vector laboratories).

1. Acquisitions d'images

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

2. Quantification du marquage immunohistochimique

L'analyse quantitative du nombre de neurones PV, FoxP2, PPE, Nkx2.1 ou NeuN positifs a été réalisée à l'aide du logiciel de traitement d'images *Image J* sur des acquisitions d'images réalisées avec un microscope équipé d'un spinning-disk (Leica, DMI 6000) couplé à une caméra et contrôlé par le logiciel Metamorph. C'est un microscope confocal disposant d'une roue criblée de trous (ou « pinholes ») et

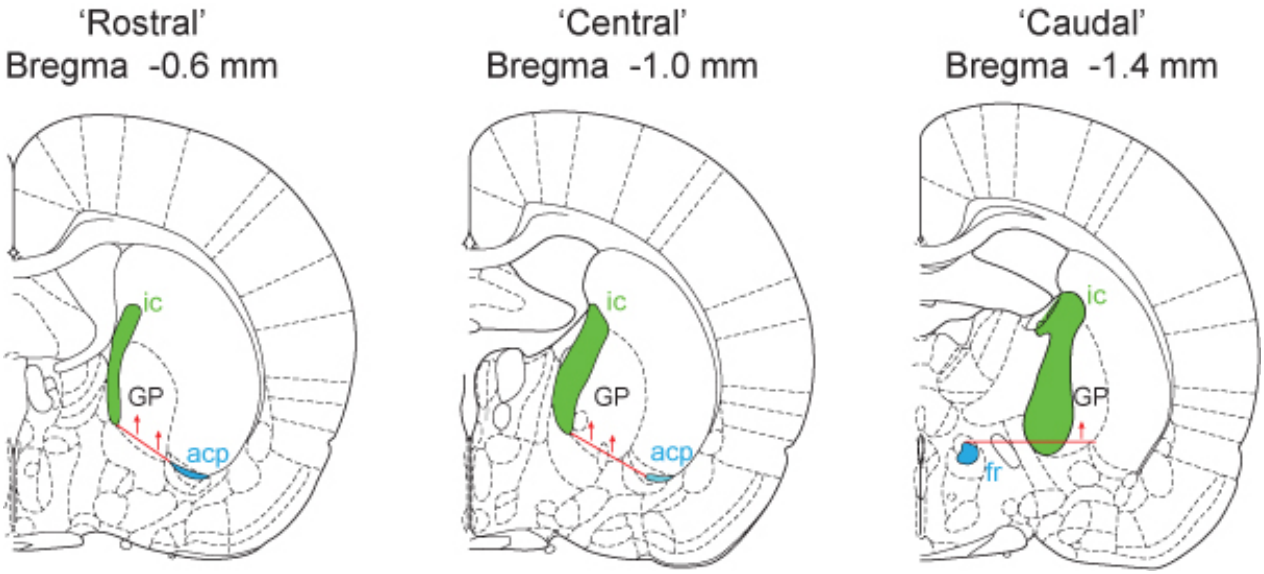


Figure 16 : Coupes coronales d'atlas de rat.

Ces coupe indiquent les différents plans utilisés sur l'axe rostro-caudal pour les comptages neuronaux. Les repères utilisés pour définir les bords du GP sont la capsule interne (ic), la commissure antérieure (acp) et la ligne entre le bas du GP et le fornix (fr).

tournant à 5000 tours/minute, par laquelle passent les ondes lumineuses afférentes et efférentes à l'échantillon observé. Ceci permet d'éviter tout blanchiment de l'échantillon et d'observer une surface importante en un temps plus court qu'avec un microscope confocal classique. Nous avons réalisé des acquisitions en mosaïque 3D en prenant des champs de pixels. Chaque champ de pixel est effectué sur 18 à 20 stacks espacé de 1 µm. Ensuite les champs de pixel sont assemblés les uns aux autres dans les 3 plans x, y et z afin d'obtenir une image représentant l'intégralité du GP. Cette reconstruction en mosaïque 3D s'effectue en utilisant le programme Macro issu du logiciel Metamorph.

Le comptage des neurones PV, PPE, FoxP2, Nkx2.1 ou NeuN positifs est effectué manuellement à l'aide du logiciel *Image J* en utilisant la fonction « cell counter ». Le comptage neuronal et la co-localisation entre les marqueurs neuronaux du GP a été effectué par 2 ou 3 expérimentateurs différents. Les résultats obtenus ont été moyennés. Nous avons compté dans une épaisseur de 10 µm la colocalisation des doubles marquages. Afin d'estimer le nombre de neurones exprimant un marqueur donné, nous avons compté le nombre de neurones marqués soit uniquement par l'anti-NeuN et ceux doublement marqués NeuN/autre marqueur. L'addition de ces deux chiffres nous donnant le nombre total de neurones par coupes du GP, nous avons pu déterminer la proportion de chacun des marqueurs étudiés. La même procédure a été suivie pour l'analyse de la colocalisation entre chacun des marqueurs neuronaux. Ce comptage a été réalisé après des doubles immunohistochimies sur 3 coupes différentes dans l'axe rostro-caudal afin de nous affranchir d'une possible distribution hétérogène des populations neuronales au sein de ce noyau (**Figure 16**).

3. Immunohistochimie post électrophysiologie

La réalisation d'une immunohistochimie après les enregistrements électrophysiologiques nécessite une procédure particulière afin d'optimiser la détection des marqueurs d'intérêts. Cette procédure qui consiste principalement à resectionner les tranches de 350 µm en coupes plus fines est détaillée ci-dessous. Après diffusion de la biocytine dans les neurones à la fin de chaque expérience d'électrophysiologie, les tranches de 350 µm d'épaisseur sont fixées dans une solution de paraformaldehyde 4% dans un tampon phosphate, PBS 0.1 M., puis conservées dans cette même solution pendant une nuit à 4°C. Les tranches fixées

sont ensuite immergées dans une solution de sucrose à 20 % pendant une nuit à 4°C. Chaque tranche est ensuite placée sur une lame non gélatinée, recouverte de tissu-teck (Freeze Gel, path) plongée dans de l'isopentane refroidi à -45°C et enfin placée dans un congélateur pendant au moins 2 heures à -80°C pour une conservation optimale. Chaque tranche est recoupée en coupes fines de 50 µm d'épaisseur au cryostat afin de permettre une meilleur pénétration des anticorps.
Les coupes (5 ou 6 par tranches) sont récoltées dans du tampon phosphate (PBS 0.1 M).
Les tranches de 50 µm sont lavées (2 x 5 min) dans du PBS 0.1 M, puis dans une solution d'eau oxygéné H_2O_2 dilué à 3% dans du PBS 0.1M durant 15 min, afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les tranches sont à nouveau lavées au PBS-Triton 0.3% durant 10 minutes (2 x 5min) avant d'être immergées dans du PBS-Triton 0.3%-Blocking reagent 0,5% (Individual fluorescein tyramide reagent Pack, PerkinElmer) durant 30 minutes afin de saturer les sites aspécifiques et de perméabiliser la membrane pour faciliter la pénétration des anticorps. Après cette étape, les tranches sont incubées toute la nuit à température ambiante avec les anticorps primaires anti-PV (Synaptic System, cochon d'Inde, d=1/10000e) et anti-FoxP2 (chèvre, d=1/200e) et de la Streptavidine 568 (d=1/500^e) (ligand à très haute affinité de la biocytine) afin de révéler respectivement PV, FoxP2 et la biocytine.
Les coupes sont lavées dans du PBS-Triton 0.3%-Blocking reagent 0,5% (6 x 5min), puis elles sont ensuite incubées pendant une heure dans du PBS-Triton 0.3%-Blocking reagent 0,5% avec les anticorps secondaires, anti-cochon d'Inde HRP (d=1/1000^e) et l'anti-chèvre Alexa 649 (d=1/500^e). Les tranches subissent de nouveau un rinçage au PBS-Triton 0.3% (6 x 5min). À la fin du rinçage, elles sont incubées avec de la tyramide fluorescéine (d=1/100^e dans une solution de diluent amplificateur) pendant 7 minutes. Enfin, elles sont de nouveau rincées pendant 30 min (6 x 5min), pour être montées sur des lames gélatinées dans du vectashield puis recouvertes par une fine lamelle.

4. Stéréotaxie

Plusieurs de nos expériences ont nécessité des injections intracérébrales de vecteurs viraux chez le rat ou la souris. Ici, nous allons décrire brièvement la procédure de chirurgie stéréotaxique que nous avons utilisée. Les animaux ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale (4 mL/kg) d'un mélange de kétamine

(75 mg/Kg) xylazine (10 mg/Kg). L'animal est ensuite fixé sur un appareil stéréotaxique (Kopf) par deux barres d'oreilles et une barre de mâchoire. Les yeux de l'animal sont protégés de la lumière et de la déshydratation par un gel protecteur oculaire (Ocryl-gel) ainsi que par un morceau de papier placé entre le museau et la barre de maintien vertical de la tête. Le crâne est mis à nu puis séché afin de distinguer les repères anatomiques à la surface du crâne : bregma et lambda. Le crâne est positionné pour qu'il soit le plus horizontal possible et que le bregma et le lambda soient en position identique sur l'axe de la profondeur. La peau du crâne est désinfectée par badigeonnage avec une solution antiseptique (Bétadine Dermique 10%), puis injectée intradermiquement d'une solution de lurocaïne afin de ne faire ressentir aucune douleur à l'animal. Le crâne de l'animal est ensuite trépané afin de faire descendre la pipette d'injection dans le cerveau de l'animal selon les coordonnées stéréotaxiques définies en fonction de l'expérience à réaliser. Les injections de vecteurs viraux ont été réalisées bilatéralement à l'aide d'une seringue de 2 mL en exerçant une pression positive. La micropipette d'injection est laissée en place pendant 5 min avant d'être remontée, afin de laisser le temps au virus de bien diffuser dans le tissu. Une fois les injections terminées, la peau est suturée puis désinfectée à la Bétadine dermique 10%. L'animal est ensuite laissé en observation dans la cage au-dessus d'une source de chaleur jusqu'à son réveil.

5. Traçage rétrograde

Afin d'analyser la connectivité axonale des différents sous-types neuronaux du GP, nous avons utilisé une stratégie de traçage rétrograde avec un vecteur viral permettant l'expression de la « green fluorescent protein », GFP (pLV-NMD-GFP). Le vecteur en question est un lentivirus pseudotypé qui est modifié avec une glycoprotéine du virus de la rage ce qui lui confère la propriété d'être capté au niveau des terminaisons synaptiques et transporté de manière rétrograde dans les neurones (Kato et al 2007). Les neurones projetant sur la structure d'intérêt peuvent ainsi être identifiés par la détection de la GFP. Nous avons procédé à des injections stéréotaxiques bilatérales de vecteur viral chez 6 rats adultes (300g), 3 au niveau du striatum et 3 au niveau du NST. Pour le striatum, 1 µL de vecteur a été injecté à deux profondeurs différentes (coordonnées (en mm) : Antéro-postérieur (AP) = + 0,8 ; Latéralité (L) = ± 2,6 ; Profondeur (P) = 3,4 et 4,2 ; volume : 0,5 µL/site) à l'aide d'un seringue connectée à une micropipette de verre et à une vitesse de 0,5 µL/min. Pour

le NST, 0.2 µL de vecteur ont été injectés à un seul point (coordonnées (en mm) : AP = -3 ; L= ± 2,5 ; P = 6,5 et 6,8). Deux à trois semaines après la chirurgie, temps nécessaire à une transfection optimale, les animaux ont été à nouveau anesthésiés, puis perfusés intracardiquement par 100 mL de PBS, puis 100 mL de PAF à 4%, et leurs cerveaux récupérés, cryoprotégés et coupés en section de 50 µm au cryostat pour procéder à la détection en immunohistochimie de la GFP, de la PV et de FoxP2 comme décrit précédemment.

6. Souris transgéniques et recombinaison Cre-Lox

Au cours de mon doctorat, j'ai utilisé une lignée de souris transgénique afin de manipuler l'activité électrophysiologique d'une sous-population de neurones du GP, celle exprimant la parvalbumine. Cette lignée, appelée PV-Ai9 a été obtenue par le croisement entre la lignée PV-ires-Cre et la lignée Ai9 (Madisen et al 2010) que nous avons achetée au Jackson Labs aux Etats-Unis. Pour la lignée PV-ires-Cre une recombinase bactérienne (Cre) est exprimée de manière spécifique dans les neurones exprimant la parvalbumine. La lignée Ai9 est une lignée reportrice, c'est-à-dire que l'ensemble des cellules de la souris possède le gène de la protéine double-tomato (dt) flanquée de deux sites LoxP. Ainsi l'expression de la dt est conditionnée à la présence de la Cre dans les neurones.

La protéine Cre est une recombinase, identifiée chez le bactériophage P1. Elle agit lorsqu'elle reconnaît, dans un segment d'ADN, une séquence de 34 paires de bases, appelée *loxP* (Kilby et al 1993). Lorsque deux sites *loxP* sont orientés dans le sens contraire, la Cre recombinase induit la délétion et la rotation dans le bons sens de la séquence d'ADN située entre les deux sites loxP permettant ainsi son expression. L'utilisation du système Cre /loxP permet d'obtenir des expressions conditionnelles chez l'animal en cours de développement et chez l'adulte (Gu et al 1994). Le principe est de développer dans un premier temps des souris porteuses d'un allèle dans lequel deux sites loxP encadrent une partie d'intérêt du gène d'intérêt sans pour autant perturber son fonctionnement. Ces souris sont ensuite croisées avec une souris transgénique qui exprime la Cre dans un type cellulaire, grâce à l'emploi de séquences régulatrices appropriées. Chez les souris issues de ce croisement, la recombinase entraîne l'excision et la rotation des séquences situées entre les sites loxP et induit donc une expression conditionnelle dans un type cellulaire donné.

Description	Provenance	Titre (pi/mL)	Utilisation	Effet de la protéine activée
AAV2/1.EF1a.DIO-**ChR2**(H134R)-EYFP	University of Pennsylvania core facility	1,54E13	*In vitro*	*activation*
AAV2/1.EF1a.DIO.**eNpHR**-EYFP.WPRE.hGH	University of Pennsylvania core facility	2,46E13	*In vitro*	*inhibition*
AAV-FLEX-**ArchT**-GFP	University of North Carolina core facility	5E12	*In vivo*	*inhibition*
AAV-EF1a-DIO-**hChR2**(H134R)-EYFP	University of North Carolina core facility	6,4E12	*In vivo*	*activation*

Tableau 3 : Vecteurs viraux utilisés pour nos expériences d'optogénétique.

Nous avons utilisé la lignée PV-Ai9 pour visualiser *in vitro* les neurones PV du GP par détection de la dt en épifluorescence, mais aussi pour manipuler l'activité de ces derniers avec l'approche optogénétique en utilisant des vecteurs viraux utilisant le système conditionnel d'expression Cre-lox.

7. Optogénétique

7.1. Généralités

Le terme optogénétique fait référence aux outils génétiques utilisant la lumière pour contrôler l'activité neuronale. Contrôler l'activité d'une population bien définie de neurones, sans activer les autres cellules nerveuses adjacentes dans le tissu était auparavant difficile, voire impossible. La lumière peut être utilisée pour contrôler le vivant, cette méthode, très simple et peu agressive, est surtout utilisée chez l'animal comme une sorte d'alternative à la stimulation par les électrodes. Une électrode de stimulation électrique produit un champ qui a un effet sur toutes les cellules indépendamment de leur type. De plus, elles produisent des artéfacts de stimulations qui peuvent souvent gêner l'analyse des signaux enregistrés. Les outils optogénétiques peuvent être des canaux membranaires photoactivables similaires à ceux que l'on retrouve dans les cellules de la rétine (cônes et bâtonnets) tout au fond de la cavité oculaire ou bien des pompes ioniques modifiées de sorte que leur activité puisse être induite ou inhibée par un stimulus lumineux. Plusieurs stratégies ont été mises de l'avant pour contrôler l'activité électrique des neurones à l'aide de stimuli lumineux. Karl Deisseroth a proposé l'introduction de la protéine Channelrhodopsin-2 (ChR2) dans la membrane neuronale, un canal perméable aux cations provenant d'une algue, afin de dépolariser les neurones et les activer (Boyden et al 2005). Tout l'appareillage nécessaire à l'activation de la cellule est contenu dans une seule protéine (nécessitant un seul gène) rendant cette approche simple et universelle. De plus, la précision temporelle de ChR2 rapportée par le groupe de Deisseroth, offre la possibilité de contrôler la génération de potentiel d'action de manière fiable. Cette découverte a été le catalyseur d'une série de publications qui a donné un essor au domaine de l'optogénétique. Aujourd'hui, plusieurs versions de canaux ou pompes photosensibles permettant l'activation ou l'inhibition d'une cellule sont disponibles ou en voie de l'être (cf. **tableau 3** listant des principaux outils de contrôle optique utilisés dans nos expériences).

L'apport majeur de l'optogénétique est d'établir des relations de causalité entre l'activité électrique de populations neuronales spécifiques et l'activité d'un réseau de neurones ou un comportement.

7.2. Optogénétique *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons souhaité valider *in vitro* les vecteurs viraux permettant l'expression des opsines uniquement dans la population du GP exprimant la PV. Pour cette étape, nous avons procédé à des injections stéréotaxiques de virus adeno-associés (AAV) permettant l'expression conditionnelle d'un transgène en utilisant le système de recombinaison Cre-Lox décrit précédemment en utilisant la lignée de souris PV-Ai9. Les transgènes que nous avons utilisés sont la channelrhodopsine (ChR2, un canal cationique photoactivable à 480 nm) soit l'halorhodopsine (NpHR, une pompe à Cl- photoactivable à 584 nm). Ainsi, ChR2 ou NpHR sont exprimés sélectivement à la membrane des neurones PV-positifs du GP. Nous pouvons donc contrôler leur activité *in vitro.* La procédure chirurgicale est identique à celle décrite précédemment à l'exception de certains points qui sont décrits ci-après. Les souris de la lignée PV-Ai9 ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane durant toute la chirurgie. L'injection du virus dans le GP s'est faite via une seringue Hamilton en utilisant un pousse-seringue électrique. Deux injections de 200 nL dans chaque hémisphère ont été réalisées selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes en mm par rapport au bregma selon l'atlas de Paxinos et Watson : AP = +0.5; L = +/- 2; P = -4.3 et -4.6. Nous avons procédé aux enregistrements électrophysiologiques *in vitro* trois semaines après l'injection stéréotaxique des vecteurs d'expression viraux chez des souris âgées de 6 à 8 semaines.

La source lumineuse que nous avons utilisée est un laser (Erroll, prototype) connecté à une fibre optique (Jenoptec, 50µm de diamètre). La puissance en bout de fibre optique est de 80 mW/cm^2 à 473 nm et de 30 mW/cm^2 à 561 nm.

7.3. Optogénétique in vivo

Nos expériences d'optogénétique *in vivo* ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr C. Herry du Neurocentre Magendie (Unité INSERM U862). Pour ces expériences, nous avons utilisé la lignée PV-ires-Cre (Hippenmeyer et al 2005) âgées de 8 semaines au moment de l'intervention chirurgicale. Deux chirurgies

stéréotaxiques ont été nécessaires pour ces expériences. La première pour injecter les vecteurs viraux AAV-ChR2 et AAV-ArchT au niveau du GP selon les coordonnées suivantes par rapport au bregma : AP= +0.5; L= +/- 2; P= -3.5 (injections bilatérales, volume 0.3 µL/hémisphère), et la seconde 15 jours après la première chirurgie pour implanter les fibres optiques aux mêmes coordonnées (diamètre : 200 µm, ouverture numérique : 0.37, Doric Lenses). Pour l'implantation des optrodes, 4 petits trous sont percés pour installer de petites vis qui serviront à les maintenir solidement en place. Du ciment dentaire est appliqué autour des optrodes et des vis pour les consolider.

8. Comportement

Deux semaines après la chirurgie de l'implantation des optrodes, les animaux sont habitués à être maintenus en contention dans la main de l'expérimentateur 2 fois par jour. Cette habituation se déroule quelques jours avant la phase d'expérimentation pendant laquelle les animaux sont placés dans un openfield afin de vérifier leur locomotion lors de la modulation de l'activité des neurones PV du GP par stimulation lumineuse. Le mouvement est évalué grâce à un système automatisé de détection par faisceaux infrarouges situé sur le plancher de la boîte d'expérimentation (Coulbourn Instruments). L'intensité de la lumière est de 20 mW par fibre implantée. La lumière est émise par un laser (OptoDuet 473/593 nm, Ikecool) et est transmise jusqu'à la souris par deux cordons de raccordements (diamètre, 200 µm, Doric Lenses) reliés par un joint tournant sur les optrodes ce qui permet aux souris de se déplacer librement au sein de l'openfield. Au cours du test comportemental, les animaux ont été stimulés de manière bilatérale et unilatérale avec des impulsions lumineuses d'une, deux et cinq secondes délivrées en continu. L'impact de la stimulation optique sur le comportement de l'animal a ensuite été analysé par visionnage des vidéos réalisées au cours du test.

Résultats

Chapitre 1 : Classification neurochimique au sein du Globus Pallidus

Chapitre 2 : Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des principaux types neuronaux du GP

Chapitre 3 : Courant sodique persistant pour des neurones PV- et FoxP2-positifs

Chapitre 4 : Action de la dopamine sur les neurones du GP

Chapitre 5 : Analyse du connectome des neurones du GP

Chapitre 6 : Manipulation optogénétique des neurones PV-positifs in vitro et in vivo

Chapitre 7 : Implication d'une dichotomie fonctionnelle au niveau du globus pallidus sur la sélection d'un programme moteur

Chapitre 8 : Manipulation optogénétique des interneurones PV-positifs du cortex prélimbique chez l'animal vigile et libre de ses mouvements

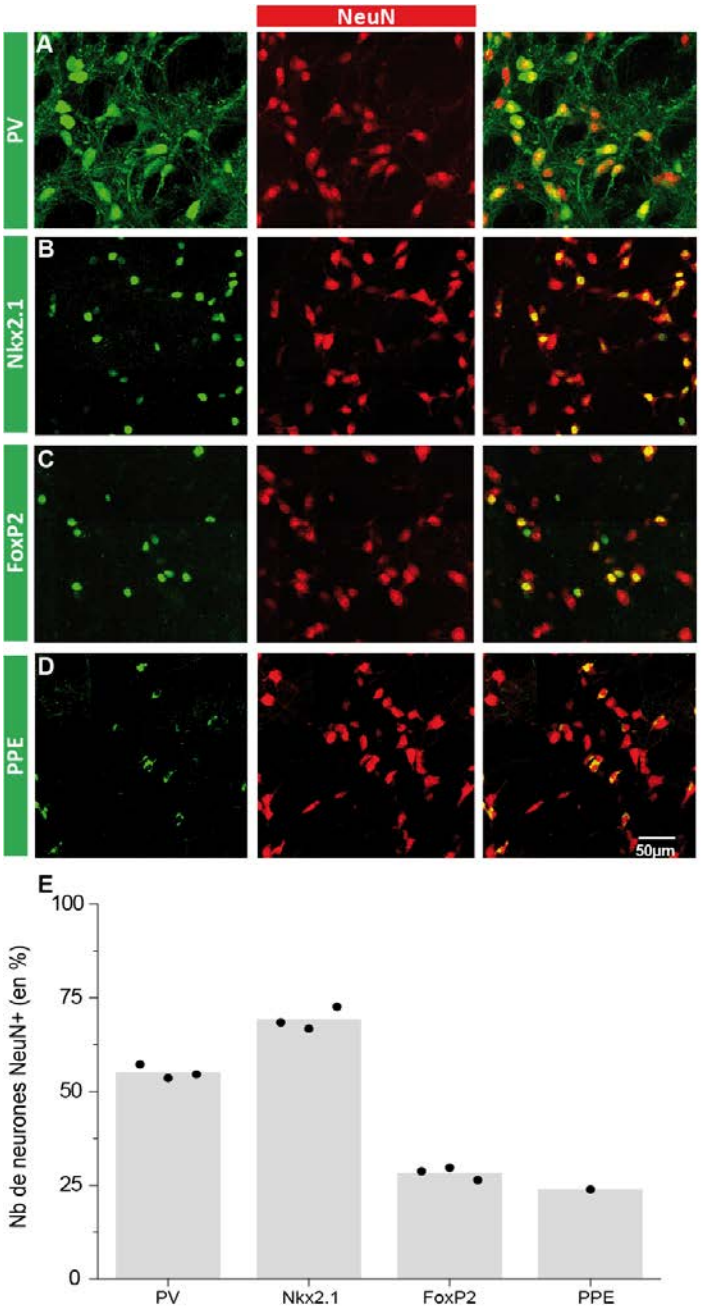


Figure 17 : Estimation de la proportion de neurones du GP exprimant la PV, Nkx2.1, FoxP2 et la PPE chez le rat.

A-D: Images de marquages immunofluorescents de la PV, Nkx2.1, FoxP2, ou de la PPE (cadran de gauche) et du marqueur neuronal NeuN (cadran du milieu). Superposition des marquages (cadran de droite). **E**: Proportion (en %) du nombre total de neurones du GP (tiré du nombre de noyaux marqués par NeuN exprimant chacun de ces quatre marqueurs). Chaque point noir représente les comptages obtenus pour un animal.

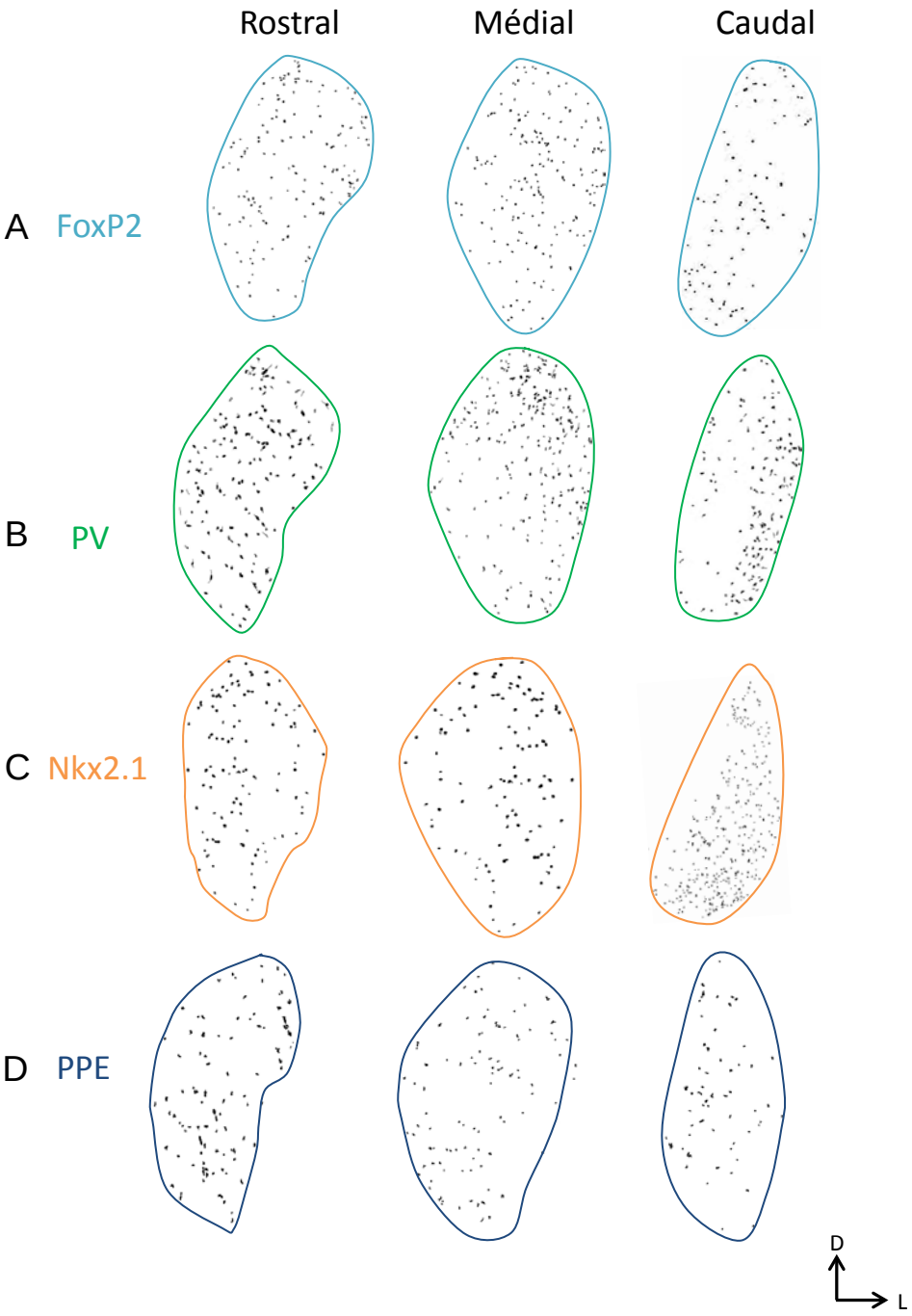


Figure 18 : Répartition des neurones du GP selon l'axe rostro-caudal.

A-D : distribution des différentes populations neuronales FoxP2-positive (A), PV-positive (B), Nkx2.1-positive (C) et PPE-positive (D) dans le GP montre qu'il n'y a pas de localisation particulière.

Résultats

I. Classification neurochimique au sein du Globus Pallidus

Il est admis depuis longtemps que les neurones du GP expriment la PV et la PPE (Hoover & Marshall 1999 , Hoover & Marshall 2002). Plus récemment, il a aussi été démontré que des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation et la migration neuronale sont aussi exprimés dans le GP (Nobrega-Pereira et al 2010), suggérant l'identification de plusieurs sous-populations au niveau de cette structure. Nous avons procédé à une révélation immunohistochimique de divers marqueurs afin d'établir une classification des principaux types cellulaires.

A. Identification des principales populations neuronales par immunohistochimie

Nous avons utilisé deux marqueurs cytosoliques connus pour être présents dans les neurones du GP, la PV et la PPE ainsi que deux facteurs de transcription nucléaires, Nkx2.1 et FoxP2. Afin d'estimer le nombre de neurones du GP exprimant ces marqueurs, nous avons réalisé des combinaisons de doubles immunohistochimies entre le marqueur NeuN (protéine nucléaire spécifique des neurones), qui permet d'obtenir le nombre total de neurones par coupe, et l'une des quatre protéines d'intérêt (PV, Nkx2.1, FoxP2 et PPE ; **Figure 17A-D**). La distribution de ces protéines pouvant être topographiquement organisée, nous avons réalisé nos marquages immunohistochimiques à trois différents niveaux du GP sur l'axe rostro-caudal (cf. matériel et méthodes, II-2-2). L'analyse à cette échelle macroscopique de la distribution des différentes protéines dans le GP n'a pas montré de distribution particulière (**Figure 18**). Pour chacune de nos immunohistochimies, nous avons obtenu deux groupes de neurones, soit uniquement positifs pour NeuN soit doublement marqués (NeuN/marqueur d'intérêt) que nous avons comptés afin d'obtenir la proportion de neurones positifs pour la PV, Nkx2.1, FoxP2 et la PPE (**Figure 17E**). Nous avons trouvé que 55,13 ± 1,08 % des neurones du GP expriment la PV, 69,26 ± 1,73 % expriment Nkx2.1, 28,27 ± 0,97 % expriment FoxP2, et 23,85 ± 4,94 % expriment la PPE. La somme de ces proportions est supérieure à 100% ce

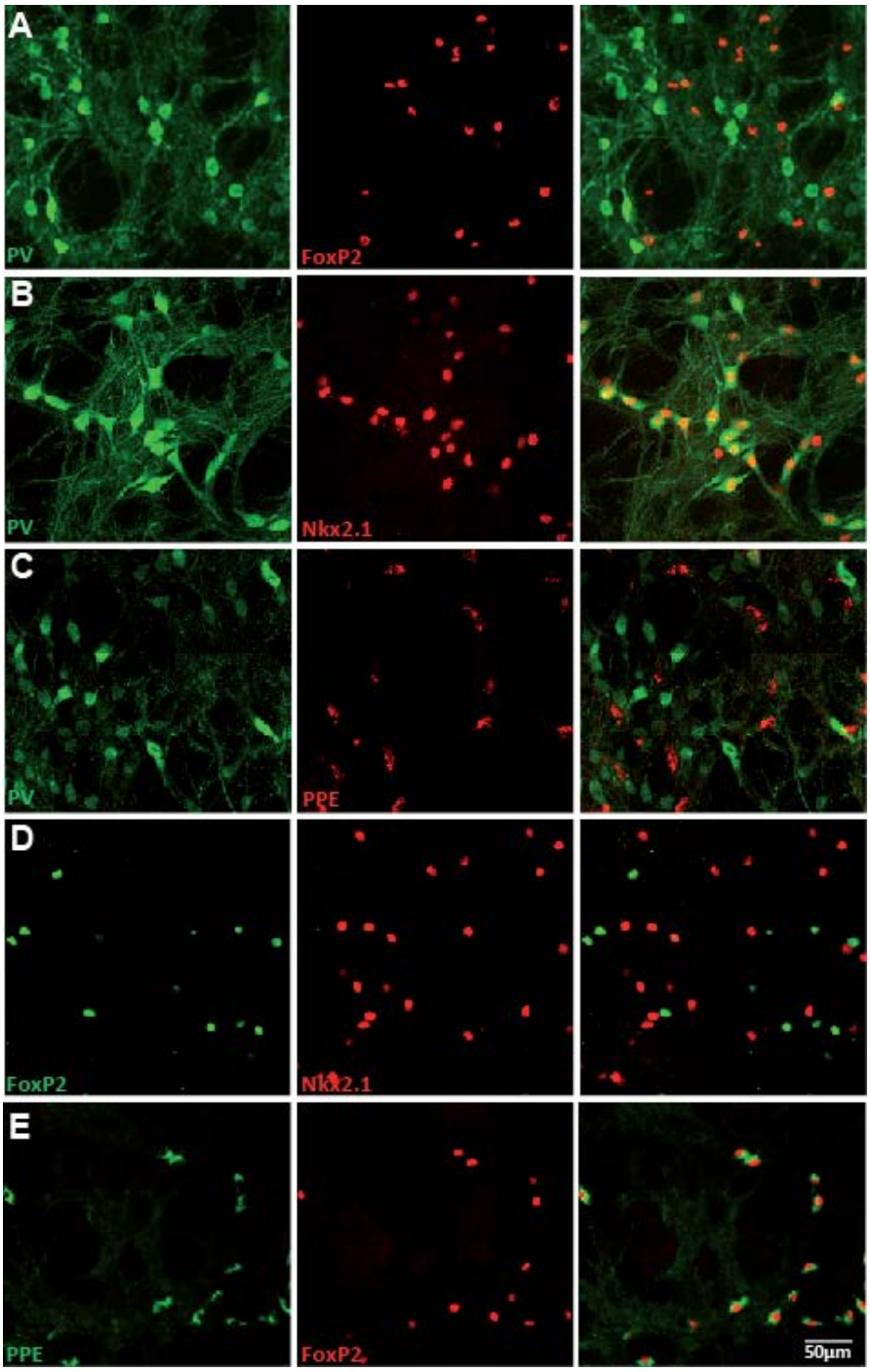


Figure 19 : Colocalisation préférentielle de certains marqueurs neuronaux dans les neurones du GP chez le rat.

A-E : Images représentative de différentes combinaisons des marqueurs PV, Nkx2.1, FoxP2 et PPE.

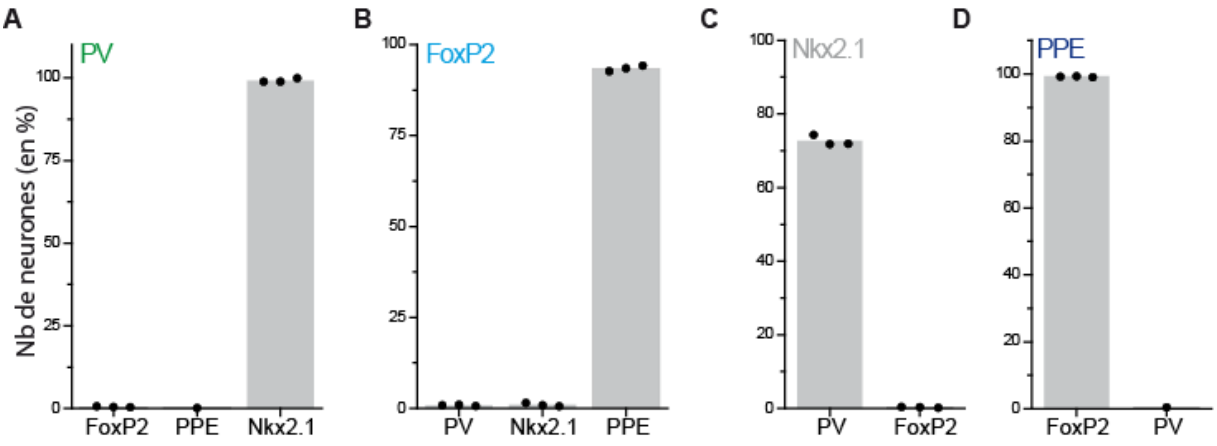


Figure 20 : Graphique montrant le degré de colocalisation des marqueurs neuronaux.

A-D : Pourcentage de colocalisation entre les différents marqueurs neuronaux testés. Chaque point noir correspond au pourcentage obtenu sur un animal.

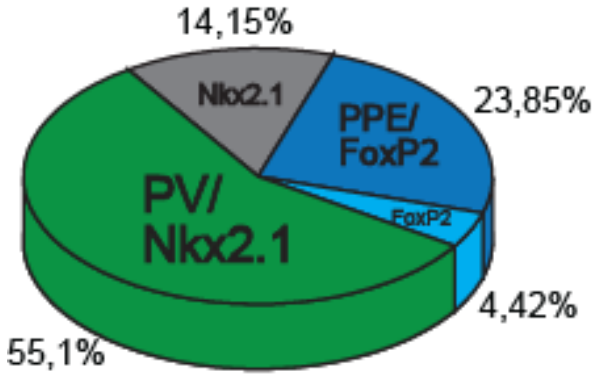


Figure 21 : Répartition en pourcentage des 4 principales populations neuronales du GP.

qui suggère que certains de ces marqueurs sont colocalisés dans les mêmes neurones.

Nous avons donc réalisé des expériences complémentaires de double-immunohistochimie afin de déterminer la co-localisation entre ces différents marqueurs (**Figure 17**). Nous avons trouvé que la quasi-totalité des neurones immunopositifs pour la PV expriment également le facteur de transcription Nkx2.1 (99,2 ± 0,34 %, **Figure 19B** et **Figure 20A**) alors qu'aucun des 2 autres marqueurs étudiés en l'occurrence FoxP2 et la PPE ne semblent être exprimés dans les neurones PV (respectivement 0,48 ± 0,078 % et 0,122 %, **Figure 19A, C** et **Figure 20A**).

En revanche, nos résultats montrent que 93,47 ± 0,45 % des neurones exprimant FoxP2 sont également immunopositifs pour la PPE (**Figure 19E** et **Figure 20B**) mais que ce marqueur cellulaire ne colocalise pas avec la PV et Nkx2.1 (0,84 ± 0,109 % et 0,99 ± 0,281 %, respectivement, **Figure 19A, D** et **Figure 20B**). Il est important de noter que quasiment tous les neurones qui sont PPE-positifs sont aussi FoxP2 (99,44 ± 0,283 % ; **Figure 19D**) et que environ les 2/3 des neurones Nkx2.1-positifs expriment aussi la PV (69,26 ± 1,73 % ; **Figure 20C**).

Cette première série d'expériences nous a donc permis d'identifier quatre types neuronaux sur le plan neurochimiques : les populations PV/Nkx2.1 (55,1%) et FoxP2/PPE (23,85%) représentant les deux principaux sous-types neuronaux du GP (**Figure 21**). Les deux autres populations sont caractérisées par la présence de Nkx2.1 (14,15%) ou la présence de FoxP2 (~4,5% des neurones). Il ressort de cette caractérisation que l'ensemble des neurones PV expriment Nkx2.1 et que FoxP2 représente un bon marqueur de substitution pour la PPE puisque FoxP2 est retrouvé dans tous les neurones PPE-positifs.

II. Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des principaux types neuronaux du GP

L'existence d'une diversité neuronale au niveau des propriétés membranaires des neurones du GP a été suggérée par plusieurs groupes (Bugaysen et al 2010, Cooper & Stanford 2000 , Nambu & Llinas 1994), mais elle est actuellement vivement débattue (Deister et al 2013, Gunay et al 2008). Une des raisons pour

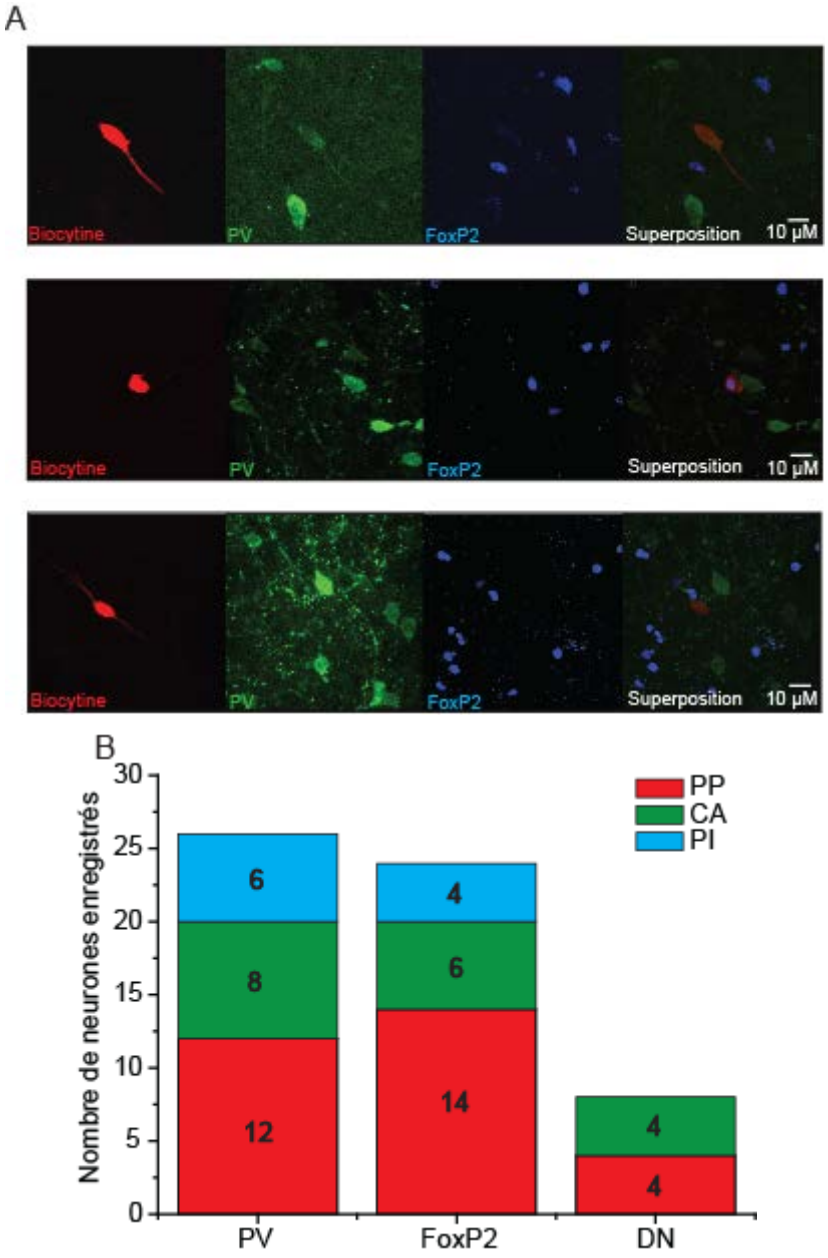


Figure 22 : Identification immunohistochimique des neurones du GP enregistrés en patch-clamp.

A : Exemples de neurones révélés par la présence de biocytine (images de gauche) et marqués soit par la PV (ligne du haut), soit par FoxP2 (ligne du milieu), ou par uniquement la présence de biocytine (DN : double négatif, ligne du bas). B. Répartition des neurones de chaque groupe en fonction de la technique électrophysiologique utilisée. PP: patch perforé ; CA: *«cellule attachée»* ; PI: potentiel imposé en configuration *«cellule entière»*.

laquelle ce débat n'est toujours pas tranché aujourd'hui est l'absence de corrélation entre les données électrophysiologiques et l'identité neurochimique des neurones. Nous avons donc réalisé des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches fraîches de cerveau de rat au cours desquelles chaque neurone a été dialysé avec une solution intrapipette contenant de la biocytine. Et nous avons ensuite déterminé l'identité neurochimique de chacun des neurones par post-immunohistochimie. Etant limité à l'observation de trois fluorophores en immunohistochimie, nous avons choisi de tester la présence de la PV et de FoxP2 en plus de la révélation de la biocytine, puisque ces deux protéines permettent l'identification des deux principales populations neuronales du GP. Nous avons donc classé les neurones que nous avons étudiés en trois groupes suivant leur marqueur intracellulaire: les neurones positifs pour la biocytine et la PV, ceux positifs pour la biocytine et FoxP2 et ceux uniquement positifs pour la biocytine (que nous avons dénommé double-négatifs, DN) (**Figure 22**). La **figure 22B** récapitule la répartition des neurones de ces trois groupes en fonction du type d'expériences électrophysiologiques que nous avons réalisé.

Tous les résultats présentés ci-après (**Figure 23** à **Figure 30**) ont donc été obtenus en deux phases successives : une expérience d'électrophysiologie suivie d'une expérience d'immunohistochimie.

A. Caractérisation des propriétés d'excitabilité intrinsèques des neurones du Globus Pallidus

Après avoir groupé en fonction de leurs marqueurs neuronaux les neurones que nous avons enregistrés, nous avons étudié leurs propriétés électrophysiologiques. Afin de garder intact le milieu intracellulaire des neurones, nous avons réalisé notre caractérisation électrophysiologique en configuration « patch perforé » qui est la méthode permettant le moins de perturbation de l'activité de décharge des neurones. L'ensemble de nos enregistrements électrophysiologiques a été réalisé en présence d'APV, de DNQX, de GABAzine et de CGP55845 afin de bloquer respectivement les récepteurs NMDA, AMPA/Kainate, $GABA_A$ et $GABA_B$.

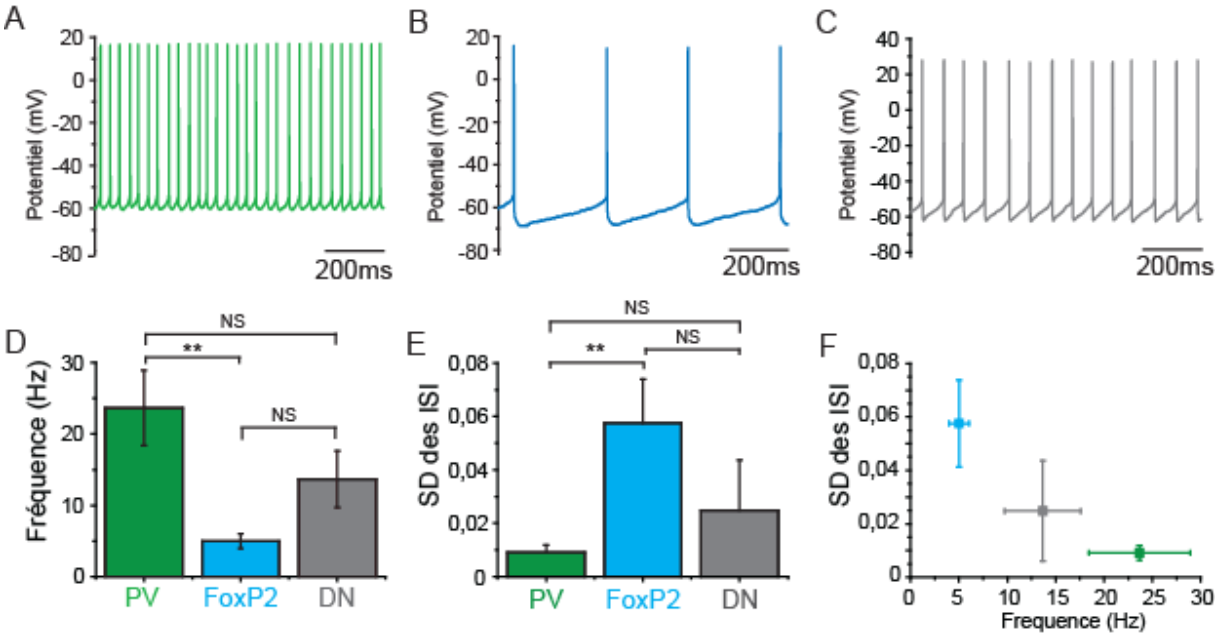


Figure 23 : Décharge spontanée des neurones du GP chez le rat.

A-C: Exemples d'enregistrements de la décharge spontanée des neurones PV-positifs, FoxP2-positifs et les doubles négatifs (vert : PV ; Bleu ; FoxP2 ; Gris : DN). D-E : Graphes illustrant la fréquence de décharge moyenne (D) et la déviation standard des intervalles interspikes (SD des ISI). E : Graphe de la déviation standard des intervalles interspikes en fonction de la fréquence de décharge. Neurones PV-positifs, n=12 ; Neurones FoxP2-positifs, n=14 ; Neurones DN, n=4. Configuration « patch perforé », mode courant imposé et courant maintenu nul.

Nos résultats portent donc sur l'excitabilité intrinsèque des neurones puisque nous avons inhibé les transmissions glutamatergiques et GABAergiques rapides et la neuromodulation GABAergique.

1. Activité de décharge spontanée des neurones

Le premier paramètre que nous avons mesuré est la décharge spontanée des neurones. La comparaison de la fréquence moyenne de décharge spontanée indique que les neurones PV déchargent à une fréquence significativement plus élevée que les neurones du groupe FoxP2 (Fq PV = 23,67 ± 5,24 Hz, n=12 ; Fq FoxP2 = 5 ± 1,02 Hz, n=14 ; $p<0,05$, Test de Dunn ; **Figure 23 A-C, D**) alors qu'il n'y pas de différence entre ces deux groupes et celui des DN (Fq DN = 13,7 ± 3,9 Hz, n=4). Nous avons aussi testé la régularité de la décharge des trois types neuronaux en calculant la déviation standard des intervalles interspike (SD des ISI). Nous avons trouvé que les neurones FoxP2 ont une activité de décharge plus irrégulière que les neurones PV (PV, SD des ISI = 0,009 ± 0,0027 ; FoxP2, SD des ISI = 0,057 ± 0,016 ; $p<0.05$; **Figure 23E**). Si l'on représente la SD des ISI en fonction de la fréquence de décharge de chaque neurone on note que les populations PV et FoxP2 forment deux groupes distincts sur le plan de leur régularité et de leur fréquence de décharge (**Figure 23F**). Le groupe de neurones DN a des propriétés intermédiaires entre celles des neurones PV et FoxP2.

2. Analyse de la régularité de la décharge au cours du temps

Une étude récente a montré, grâce à des enregistrements *in vitro* et *in vivo* continus de longue durée (> 15 min) que l'activité de décharge peut varier considérablement au cours du temps ; les auteurs soutiennent donc qu'il est impossible de les classer dans des sous-groupes sur la base de leur fréquence de décharge spontanée (Deister et al 2013). Nous avons souhaité déterminer si cette variabilité était retrouvée pour les classes de neurones que nous avons mises en évidence dans nos expériences de « patch perforé ». Nous avons donc réalisé des enregistrements de longue durée en configuration *«cellule attachée»* (condition d'enregistrement utilisée dans l'étude de Deister et collègues *in vitro*). Nous avons enregistrés 18 neurones en continu pendant au moins 20 minutes et analysé la régularité de leur activité au cours du temps avec la même analyse que l'équipe de

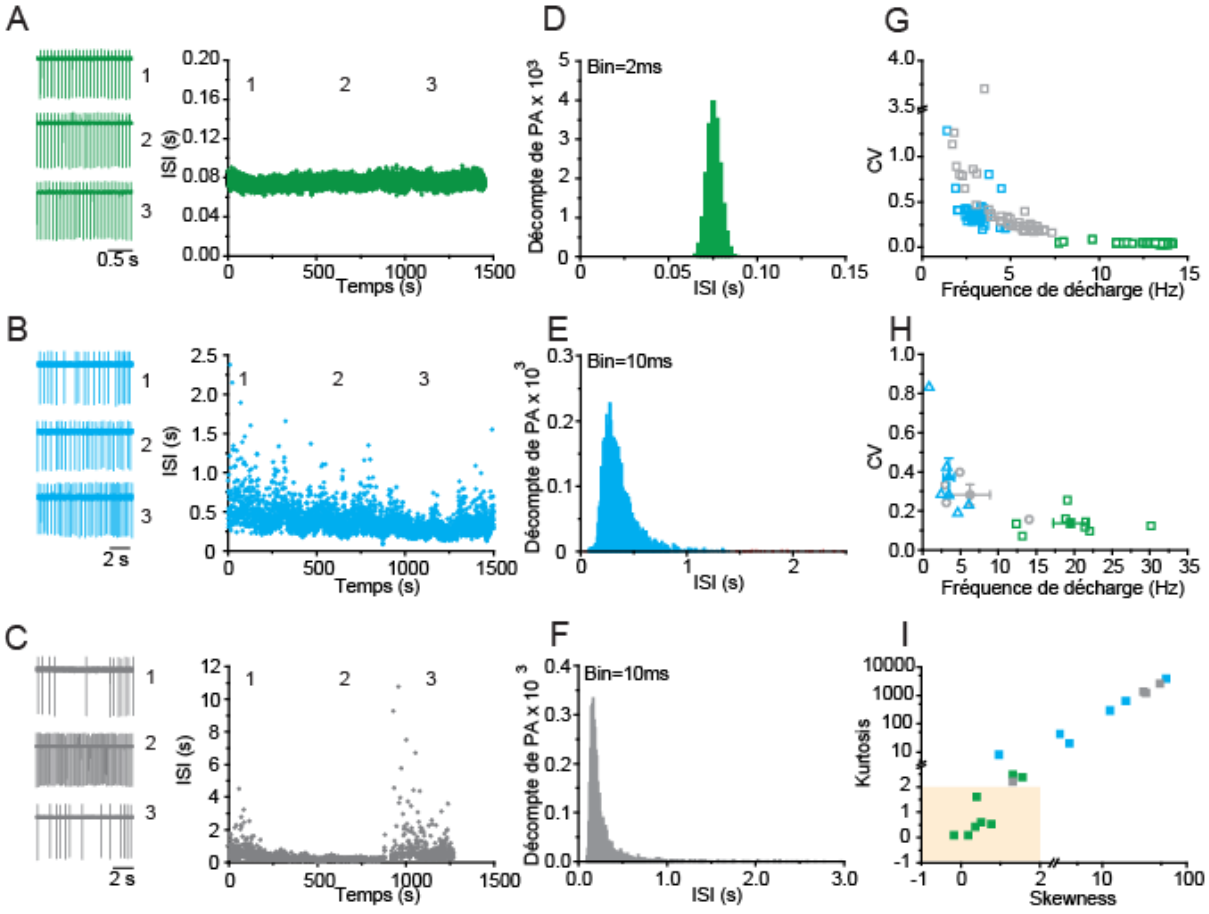


Figure 24 : Analyse de régularité de la décharge des neurones du GP au cours du temps. Seuls les neurones PV-positifs ont une fréquence de décharge régulière.

A-C: Distribution des intervalles interspikes (ISI) en fonction du temps pour un neurone PV-positif (A), un neurone FoxP2-positif (B) et un neurone double négatif (DN,C). A gauche des graphes, sont représentées des séquences d'activités neuronales à différents moments de l'enregistrement. D-F: Distributions des ISI correspondants. G: Coefficient de variation (CV) en fonction de la fréquence de décharge mesuré par groupes de 100 PAs sur l'intégralité de l'enregistrement des 3 neurones montrés en A, B et C. H: CV de la fréquence de décharge en fonction de la fréquence moyenne pour chaque neurone enregistré en *«cellule attachée»*. I: Graphe récapitulatif de l'ensemble des données obtenu pour 8 neurones PV-positifs, 6 FoxP2-positifs et 4 DN. L'ordonnée représente les valeurs de l'aplatissement « kurtosis » et l'abscisse l'asymétrie « skewness » calculées à partir d'un échantillon de 2000 intervalles interspikes. Le cadre grisé indique la gamme de valeurs pour lesquelles les ISI sont distribués de manière normale avec un aplatissement et une asymétrie inférieurs à 2. Seuls les neurones PV-positifs montrent des ISI distribués de manière normale.

Deister, pour faciliter la comparaison entre leurs données et les nôtres. Ces neurones ont été identifiés ensuite comme PV-positifs (n=8), FoxP2-positifs (n=6), et les DN (n=4) après immunohistochimie.

L'analyse la plus simple a consisté à représenter l'ensemble des ISI au cours du temps ainsi que leur distribution pour chaque groupe neuronal (**Figure 24 A-F**). Cette première analyse nous a permis de mettre en évidence que la distribution des ISI des neurones PV semble gaussienne, suggérant une fréquence neuronale qui ne varie pas autour de la fréquence moyenne, alors que la distribution des ISI des neurones FoxP2 et DN apparait asymétrique suggérant une activité beaucoup plus variable au cours du temps (**Figure 24 E-F**).

Nous avons découpé les enregistrements de longue durée afin de calculer le coefficient de variation (CV) et la fréquence tous les 100 PAs afin de regarder la variation de la décharge du neurone. Chaque point de la **figure 24G** correspond donc à la mesure du CV et de la fréquence pour 100 PAs consécutifs. La distribution des 3 neurones présentés correspond aux 3 neurones des exemples A, B et C sur la **Figure 24**. Cette analyse met en évidence que chaque type neuronal subit des variations de son activité neuronale, mais que les neurones du groupe PV reste très régulier alors que les neurones des groupes FoxP2 et DN ont une activité beaucoup plus irrégulière puisque la variation de leur CV est important d'un paquet de 100 PA à un autre. Ces particularités sont retrouvées à l'échelle de la population pour chaque sous-type (**Figure 24 H**). Une des hypothèses du travail de Deister et al., est que l'activité d'un neurone donné peut osciller d'un état régulier à un état irrégulier voir silencieux si on suit son activité pendant un temps assez long. Nos données suggèrent en revanche, qu'en fonction de son identité moléculaire l'activité d'un neurone reste confiné soit dans une gamme d'activité de décharge lente et plutôt irrégulière (pour les neurones FoxP2) soit dans une gamme d'activité de décharge soutenue et régulière (pour les neurones FoxP2). Les neurones DN en revanche se situe à la frontière entre ces deux modes bien distincts d'activité. Pour valider sur le plan statistique la régularité de la décharge d'un neurone, nous avons utilisé le test de normalité qui stipule que si la distribution des ISI a une valeur d'aplatissement « kurtosis » et d'asymétrie « skewness » entre -2 et 2, la distribution suit une loi normale (**Figure 24 I**). 6 des 8 neurones PV remplissent ces critères statistiques (et les deux autres en sont très proches) alors que ce n'est le cas d'aucun des neurones des groupes FoxP2 et DN.

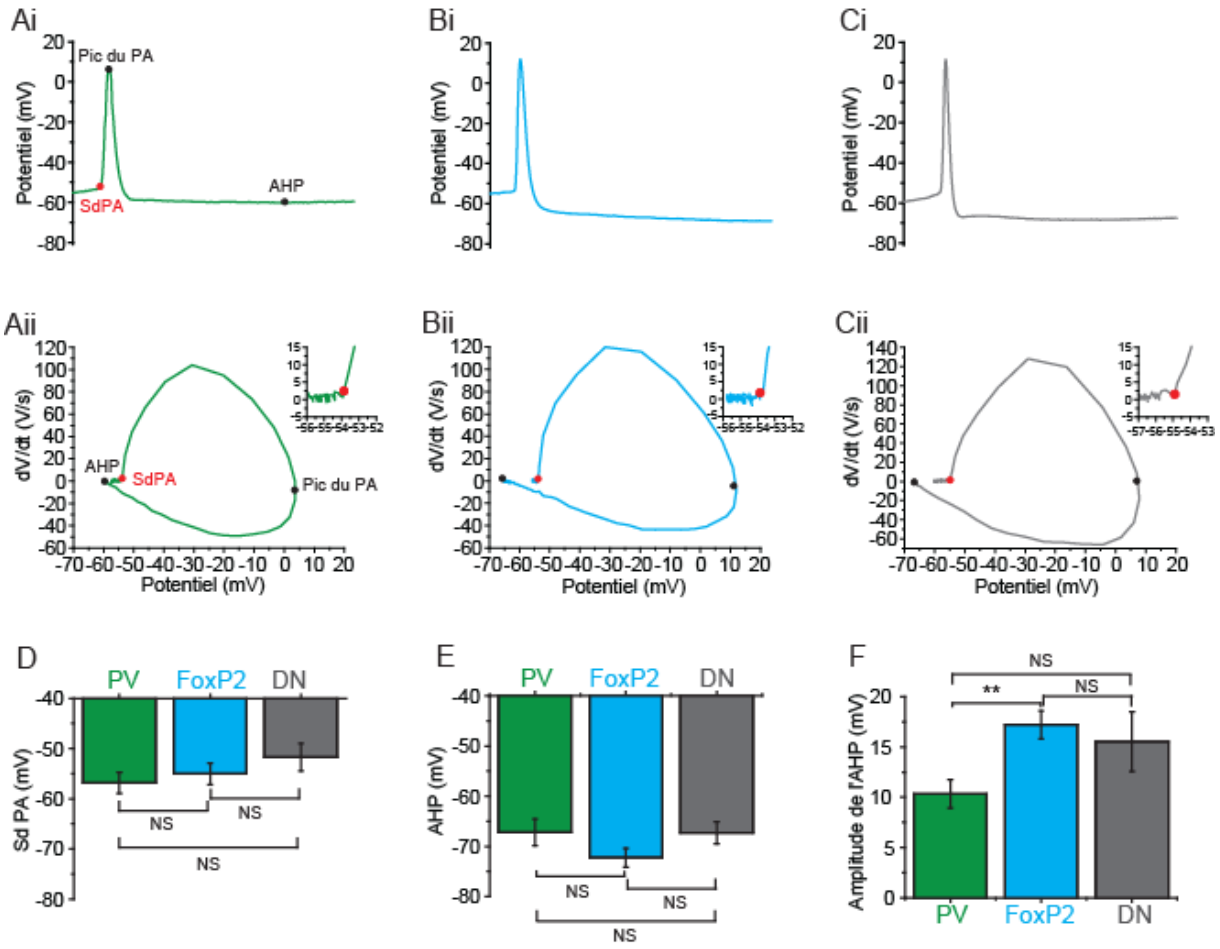


Figure 25 : Paramètres des potentiels d'action des neurones PV-positifs, FoxP2-positifs et doublement négatifs. Seule la valeur de l'hyperpolarisation consécutive au potentiel d'action diffère significativement.

A-C: Décours temporel des potentiels d'action (PA) des neurones PV-positifs, FoxP2-positifs et doublement négatif (DN) (Ai-Ci) accompagnés des diagrammes de phase correspondant (Aii-Cii). D-F: Comparaison de la valeur du seuil de déclenchement du PA (sdPA, D), de la valeur de l'hyperpolarisation consécutive au PA, l'AHP (E), et de l'amplitude de l'AHP (F) entre les trois groupes. L'amplitude de l'AHP est la différence entre le potentiel atteint lors de l'AHP et le seuil du PA.

Neurones PV-positifs, n=12 ; Neurones FoxP2-positifs, n=14 ; Neurones DN, n=4.

Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

3. Caractéristiques des potentiels d'action des neurones du GP

Les caractéristiques des potentiels d'action (PA) des neurones permettent souvent de distinguer des groupes neuronaux distincts au sein d'une même structure. Nous avons donc analysé les paramètres des PA de chacun des 3 types cellulaires du GP afin de déterminer d'éventuelles différences **(Figure 25 Ai-Ci)**. Nous nous sommes tout d'abord intéressés au seuil de déclenchement des PA (sdPA). Afin de le mesurer de manière fiable, nous avons utilisé l'analyse du diagramme de phase (**Figure 25 Aii-Cii**). Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les sdPA des neurones PV-positifs, FoxP2-positifs et DN (**Figure 25 D**). Les neurones du GP n'ayant pas de potentiel de repos en raison de leur activité pacemaker, nous avons mesuré la valeur de l'hyperpolarisation consécutive au potentiel d'action (AHP) (**Figure 25 E**). Nous avons observé que bien que les potentiels les plus négatifs atteints lors de l'AHP ne soient pas différents, l'amplitude de l'AHP (mesurée entre l'AHP et le sdPA) des neurones FoxP2 est significativement plus grande que celle des neurones PV (PV, AHP amp = 10,34 ± 1,42 mV, n=12 ; FoxP2, AHP amp = 17,22 ± 1,39 mV, n=14 ; $p<0.05$; **Figure 25 F)**.

4. Activité de décharge évoquée

4.1. Réponses des neurones du GP à des créneaux dépolarisants

Nous avons également effectué des protocoles d'injections de courants dépolarisants afin d'obtenir plusieurs autres paramètres de décharge, tels que la fréquence moyenne de décharge évoquée ainsi que son adaptation.

Nous avons utilisé une gamme d'injection de courant allant de 0 à 200 pA pour construire la courbe de fréquence de décharge en fonction de l'intensité du courant injecté (f/i) des neurones du GP. Les autres paramètres ont été analysés pour des créneaux de courants de +100 pA (**Figure 26 A-C**). A cette intensité de courant, nous pouvons nous apercevoir que les neurones PV déchargent à des fréquences significativement plus élevées que les neurones FoxP2 que ce soit au début, pendant les 100 premières millisecondes (PV, Fq = 76,09 ± 10,56 Hz, n = 11 ; FoxP2, Fq = 38,44 ± 4,408 Hz, n = 13 ; $p< 0,05$; **Figure 26 D**) ou à la fin, pendant les 100 dernières millisecondes du créneau de courant (PV, Fq = 59,97 ± 7,68 Hz ; n = 11 ; FoxP2, Fq = 31,38 ± 3,14 Hz, n = 13; $p< 0,05$; **Figure 26 E**).

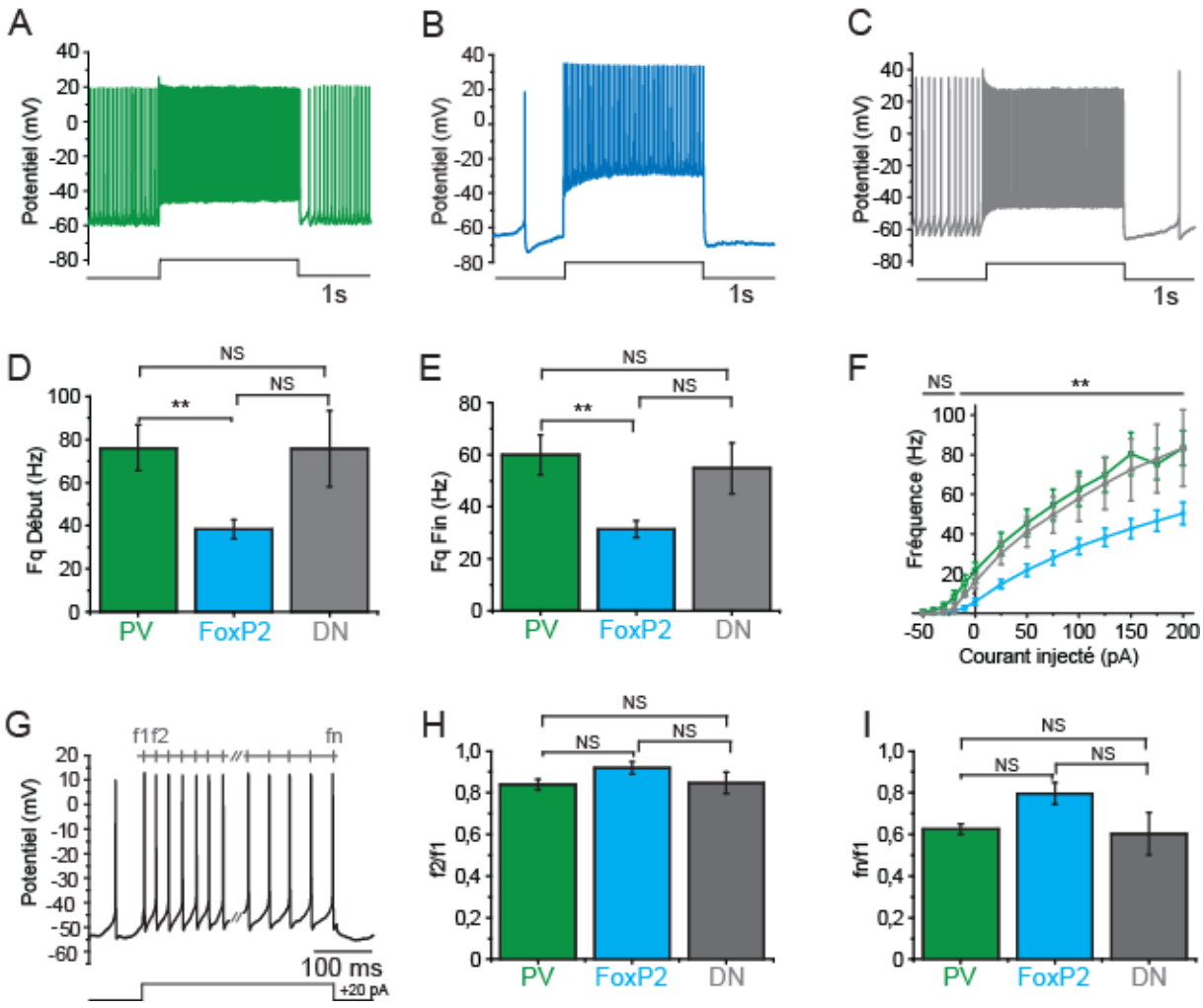


Figure 26 : Activité de décharge évoquée des neurones du GP. La décharge des neurones PV-positifs diffère de celle des neurones FoxP2 et des doubles négatifs.

A-C : Exemples de réponses des 3 neurones PV-positifs, FoxP2-positifs et des doubles negatifs (DN) à un créneau dépolarisant (+100pA ; durée : 2,5 s). D-E : Comparaison des fréquences moyennes de décharges lors des 100 premières ms (D) et des 100 dernières ms du créneau dépolarisant (E). F: Relation entre la fréquence de décharge moyenne des neurones en fonction du courant injecté (courbe f/i). G : Illustration de la méthode utilisée pour mesurer l'index de bouffée (f2/f1) et l'index d'adaptation (fn/f1). H-I : Graphes représentant l'index de bouffée (H) et l'index d'adaptation (I) des 3 types de neurones du GP. Neurones PV-positifs, n=12 ; Neurones FoxP2-positifs, n=14 ; Neurones DN, n=4.
Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

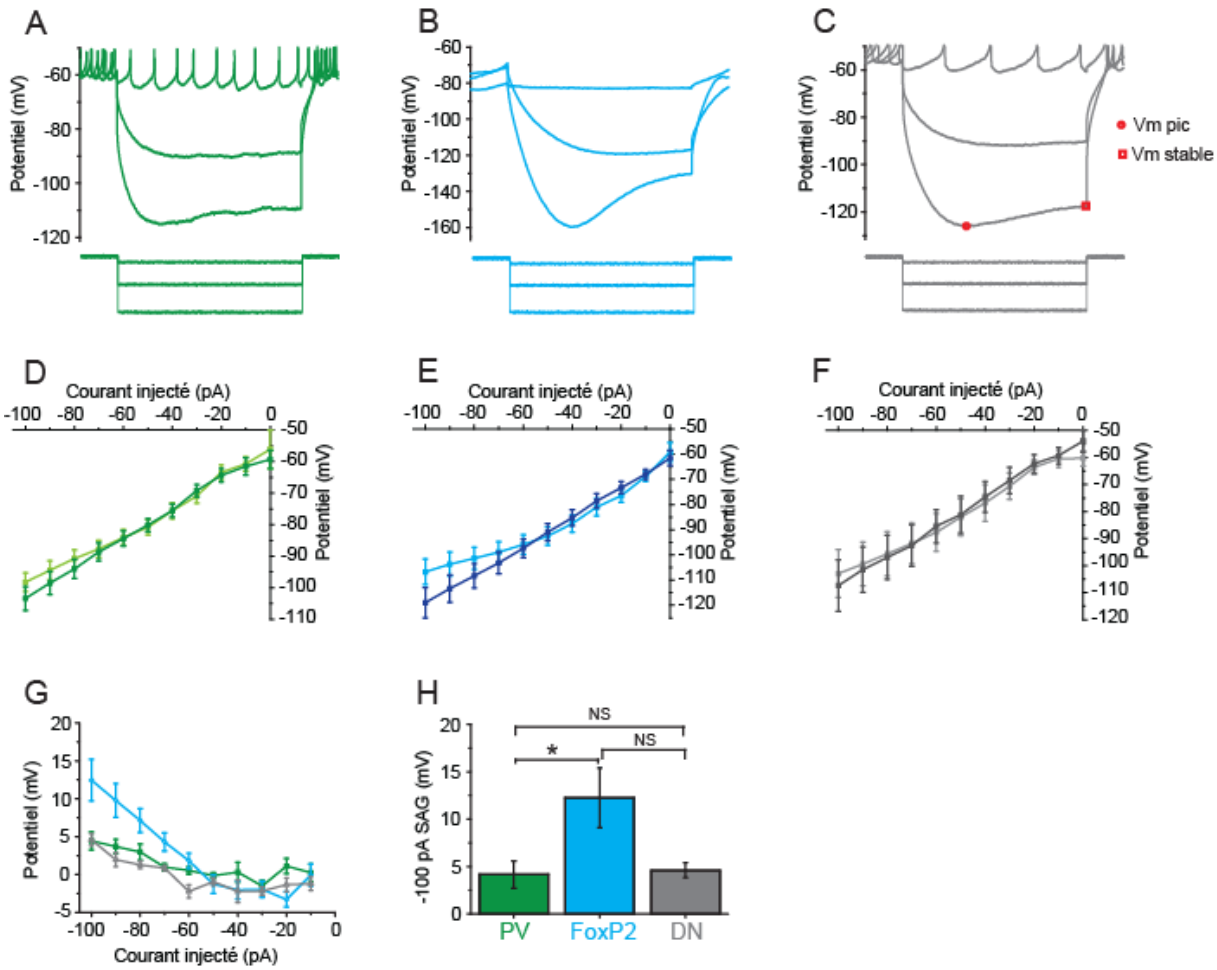


Figure 27 : Réponses des neurones du GP à des créneaux de courants hyperpolarisants chez le rat.

A-C : Exemples de réponses à l'injection de créneaux de courants hyperpolarisants de -10, -50 et -100 pA. D-F : Relation entre le potentiel de membrane et l'amplitude du courant injecté (courbe I/V) mesuré au pic de l'hyperpolarisation (*Vpic*) et à la fin du créneau de courant (*Vstable*). G : Mesure du « sag » (différence entre Vstable et Vpic) en fonction du courant injecté. H : Histogramme représentant l'amplitude du « sag » lors de l'injection d'un courant de -100 pA.

Neurones PV-positifs, n=12 ; Neurones FoxP2-positifs, n=14 ; Neurones DN, n=4.

Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

Cette différence de décharge s'observe aussi sur l'ensemble de la courbe f/i (**Figure 26 F**). En revanche, la différence de profil de la courbe f/i entre les neurones PV et FoxP2 suggère que ces neurones vont intégrer le message synaptique excitateur de manière distincte, ce qui peut avoir des conséquences fonctionnelles importantes (voir § VII des résultats).

Nous avons aussi analysé l'adaptation de la décharge des neurones du GP au début et à la fin du créneau de courant **(Figure 26 G)**. Que ce soit pour le rapport f2/f1 (index de bouffée) ou le rapport fn/f1 (index d'adaptation/accomodation) nous n'avons pas observé de différence significative entre les neurones (**Figure 26 H-I**).

4.2. Réponses des neurones du GP à des créneaux hyperpolarisants.

Nous avons également déterminé la relation courant-potentiel (courbe I/V) des neurones lors d'injection d'une gamme de créneaux de courant entre -100 et -10 pA (**Figure 27 D-F**)**.** Cette courbe I/V a été mesurée pour les valeurs de potentiel les plus hyperpolarisées (Vpic) mais aussi à la fin du créneau de courant hyperpolarisant (Vstable) car les neurones du GP possèdent tous à leur membrane des canaux HCN (Hyperpolarization-activated Cationic Non-specific channnels) qui sont activés par l'hyperpolarisation du potentiel de membrane et qui viennent s'opposer à cette hyperpolarisation. La soustraction des potentiels Vpic et Vstable permet de déterminer de combien de millivolts ces canaux dépolarisent les neurones et ainsi d'avoir une idée de leur efficacité (**Figure 27 C**). La différence de potentiel entre Vpic et Vstable est communément appelée « sag ». La comparaison de la valeur du sag montre que les neurones FoxP2 semblent avoir un sag de plus grande amplitude par rapport aux neurones PV lors de créneaux de courants de -100 pA mais les moyennes ne sont pas significativement différentes (**Figure 27 G-H et Figure 28 Ai-Ci**).

Nous avons également examiné une autre propriété des neurones du GP qui est leur capacité à générer un rebond post-inhibiteur suite à une hyperpolarisation. Nous avons défini le rebond post-inhibiteur comme la durée pendant laquelle la fréquence de décharge en réponse à un créneau hyperpolarisant de -150pA est supérieure à la fréquence basale de décharge ± 3 déviation standard (**Figure 28 Aii-Cii**). Notre premier résultat est que les neurones PV-positifs et DN sont capables de faire des

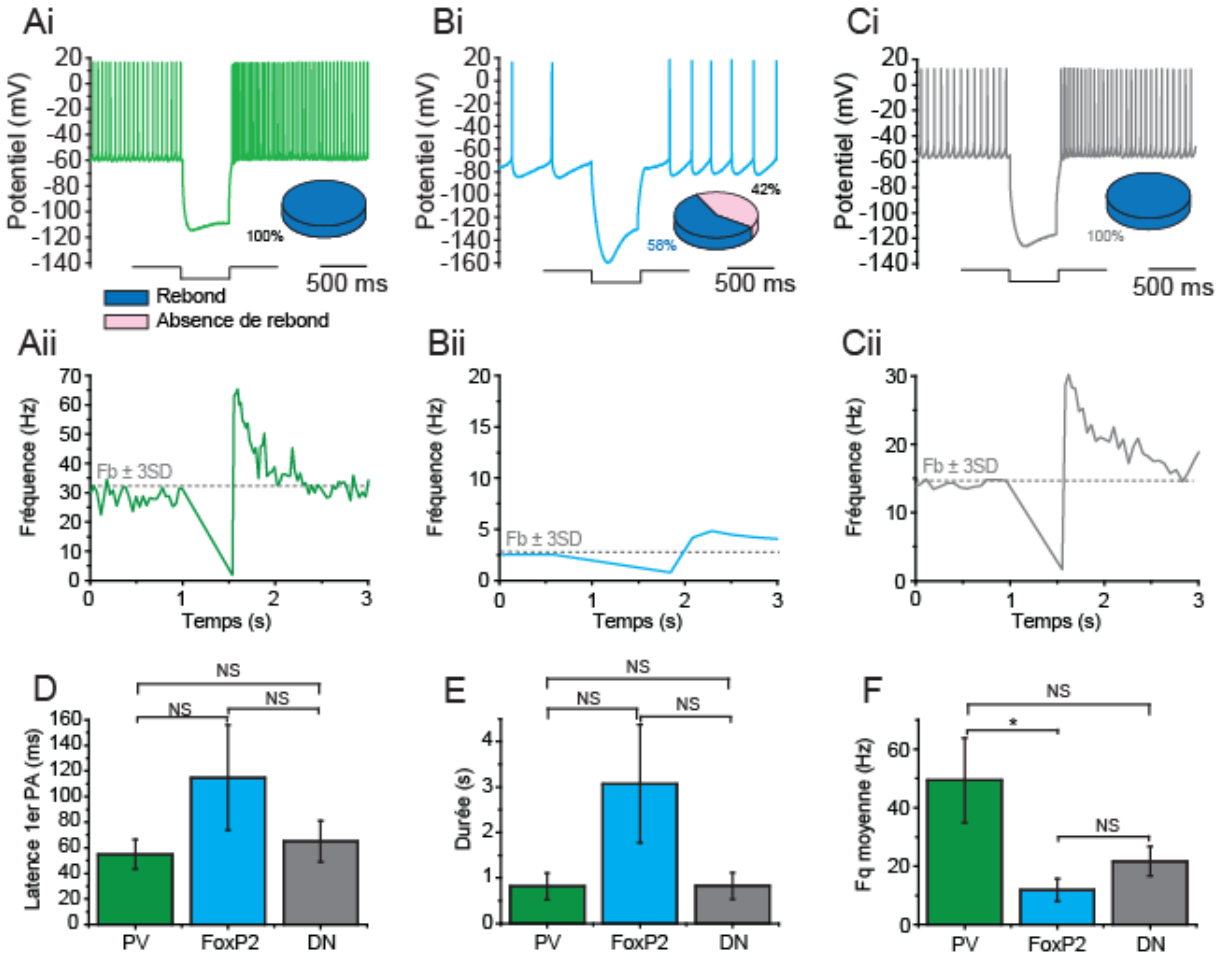


Figure 28 : Caractéristiques des rebonds post-inhibiteurs des neurones du GP chez le rat.

Ai-Ci : Exemples de rebonds générés par les neurones du GP suite à un créneau de courant hyperpolarisant (intensité: -150 pA; durée: 500 ms). En insert, la proportion de neurones du GP (en %) doués de cette propriété. Aii-Cii : Graphes représentant la fréquence de décharge instantanée en fonction du temps. Les traits en pointillés correspondent à la fréquence basale (Fb) ± 3 SD pour le neurone considéré. Le rebond est défini comme l'activité électrique qui se produit pendant la période où la fréquence instantanée est supérieure à Fb + 3SD. D : Histogramme représentant le temps de latence entre la fin du créneau hyperpolarisant et la genèse du premier PA entre les trois types neuronaux. E: Histogramme représentant la durée du rebond post inhibiteur. F: Histogramme représentant la fréquence de décharge moyenne pendant le rebond.

Neurones PV-positifs, n=12 ; Neurones FoxP2-positifs, n=14 ; Neurones DN, n=4.

Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

rebonds suite à un créneau hyperpolarisant, alors que seulement 48% des neurones FoxP2 sont doués de cette propriété.

Les neurones PV-positifs et DN ont une durée de rebond quasi-identique, contrairement aux neurones FoxP2-positifs qui semblent faire un rebond de plus longue durée bien que cette différence ne semble pas être significative (PV, durée= 815,1 ± 289,9 ms, n=11 ; DN, durée= 825,7 ± 291 ms, n=4 ; FoxP2, durée= 3072 ± 1304 ms, n=7 ; p= 0,24 ; **Figure 28 E**). Par contre les neurones PV-positifs ont une fréquence de décharge moyenne durant le rebond significativement plus elevée que les neurones de type FoxP2 et DN (PV, Fq= 49,34 ± 14,46 Hz, n=11 ; FoxP2, Fq= 11,91 ± 3,88 Hz, n=7 ; DN, Fq= 21,72 ± 5,09 Hz, n=4 ; p <0,05 ; **Figure 28 F**).

Une autre particularité des neurones FoxP2-positifs, est qu'ils possèdent un retard à la décharge qui se traduit par une latence plus importante lors du déclenchement du premier PA après la fin du créneau de courant hyperpolarisant (**Figure 28 D**), mais à nouveau ce paramètre n'est pas significativement différent.

III. Caractérisation des courants sodiques persistants des neurones PV- et FoxP2-positifs

D'après les travaux du groupe de Jaeger (Gunay et al 2008), des différences de densité de canaux potentiel-dépendants seraient responsables de la grande variabilité de fréquence de décharge observée *in vitro*. D'après leur modèle mathématique de neurone du GP, des différences de densité des canaux sodiques responsables des courants persistant INaP pourraient être à l'origine de décharges très différentes. La **figure 23D** a mis en évidence une fréquence de décharge spontanée moyenne de l'ordre de 20 Hz chez les neurones PV-positifs et de 5 Hz chez les neurones FoxP2-positifs alors que l'AHP est d'amplitude plus élevée chez les neurones FoxP2-positifs que chez les neurones PV-positifs (**Figure 25F**). Nous avons étudié les courants INaP afin de trouver une base moléculaire à ces différences de propriétés électrophysiologiques. Pour caractériser les courants INaP de ces deux groupes neuronaux, nous avons utilisé des rampes dépolarisantes avec une faible vitesse en configuration « cellule entière » et en mode « potentiel imposé ». Ce protocole permet d'inactiver les canaux sodiques responsables des courants rapides générés lors des PAs. Les rampes ont été réalisées en condition contrôle puis en

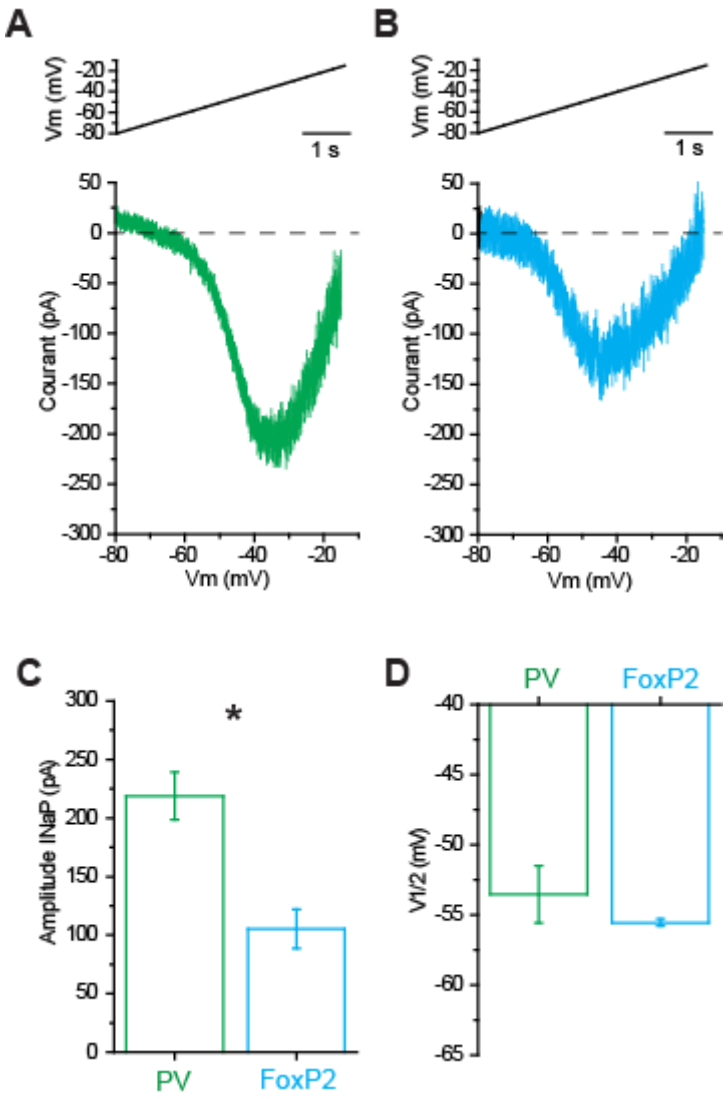


Figure 29 : Mesure et comparaison des courants sodiques persistants (INaP) entre les neurones du GP exprimant la PV ou FoxP2.

A-B : Exemples de tracés de courant sodique persistant (INaP). Ces traces sont obtenues par soustraction du courant en présence de TTX de celui obtenu en condition contrôle lors d'une dépolarisation du potentiel de membrane par une rampe de potentiel. C: Histogramme représentant l'amplitude moyenne du pic du courant INaP. D : Histogramme représentant les valeurs moyennes de V1/2 correspondant au potentiel auquel la moitié du courant INaP est activé.

Neurones PV-positifs, n=6 ; Neurones FoxP2-positifs, n=4.

Configuration « cellule entière », mode potentiel imposé, potentiel maintenu à -80 mV.

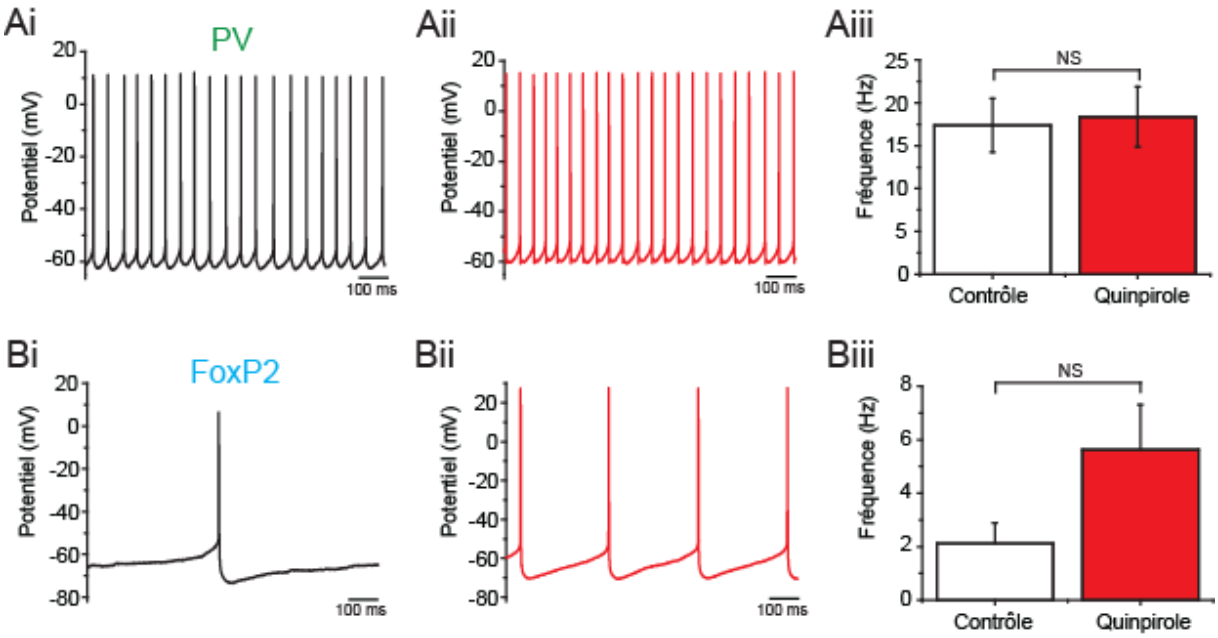


Figure 30 : Modulation de l'excitabilité des neurones du GP par les récepteurs dopaminergiques de type D2 chez le rat : résultats préliminaires.

Ai-Bi: Exemple de l'activité spontanée d'un neurone PV-positif (Ai) et d'un neurone FoxP2-positif (Bi) en condition contrôle. (Aii-Bii) Activité spontanée obtenue par activation spécifique des récepteurs dopaminergiques de type D2 (en présence de 2 µM de quinpirole) Aiii-Biii: Histogrammes montrant la fréquence de décharge moyenne en condition contrôle et en présence de quinpirole pour les neurones PV-positifs (Aiii, n=3) et pour les neurones FoxP2-positifs (Biii, n=3).

Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

présence de TTX dans le bain de perfusion, afin d'isoler par soustraction la composante INaP de l'ensemble des courants (**Figure 29 A-B**).
La mesure de l'amplitude des courant INaP nous a permis de mettre en évidence des courants significativement plus importants dans les neurones PV du GP (PV, amplitude INaP = 218,66 ± 20,38 pA, n=6 ; FoxP2, amplitude INaP = 105,51 ± 16,73 pA, n=4 ; P<0,05 ; **Figure 29 C**) alors que les propriétés d'activation des courants INaP semblent identiques (**Figure 29 D**). Ces résultats suggèrent que les neurones PV et FoxP2 ont des courants INaP dont les propriétés biophysiques sont identiques mais dont l'expression est plus forte chez les neurones exprimant la PV. Ce résultat, pourrait donc expliquer en partie la différence de fréquence de décharge spontanée observée entre les neurones PV- et FoxP2-positifs.

IV. Action de la dopamine sur les neurones du GP

Les données de biologie moléculaire et d'immunohistochimie suggèrent que les neurones du GP expriment des récepteurs dopaminergiques. En particulier, il a été proposé que certains neurones du GP (Hoover & Marshall 2002) possèdent des récepteurs de la famille D2 à leur membrane. Nous avons voulu tester s'il existait une modulation différentielle des populations PV- et FoxP2-positives par les récepteurs de la famille D2. Nous avons utilisé des outils pharmacologiques afin de tester cette hypothèse. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'ajout de l'agoniste D2, le quinpirole n'affecte pas la décharge spontanée des neurones PV-positifs (**Figure 30 Ai-Aii**). Par contre, pour les neurones FoxP2-positifs, nous avons une tendance à l'augmentation de la décharge (**Figure 30 Bi-Bii**) puisque leur fréquence de décharge moyenne est 2,5 fois plus élevée en présence de quinpirole (Fq contrôle : 2,11 ± 0,77 Hz ; n=3 ; Fq quinpirole : 5,63 ± 1,67 Hz ; n=3 ; p=0,0647, t-test, **Figure 30 Biii**). Il sera nécessaire de compléter les 2 groupes afin de confirmer ce résultat.

V. Analyse du connectome des neurones du GP

Il a été montré récemment que des neurones PPE-positifs projettent uniquement sur le striatum (Mallet et al 2012). Cette étude ayant été réalisée dans un modèle expérimentale de déplétion dopaminergique (rat lésé par la 6-OHDA) et donc en situation physiopathologique, il est légitime de se demander si cette

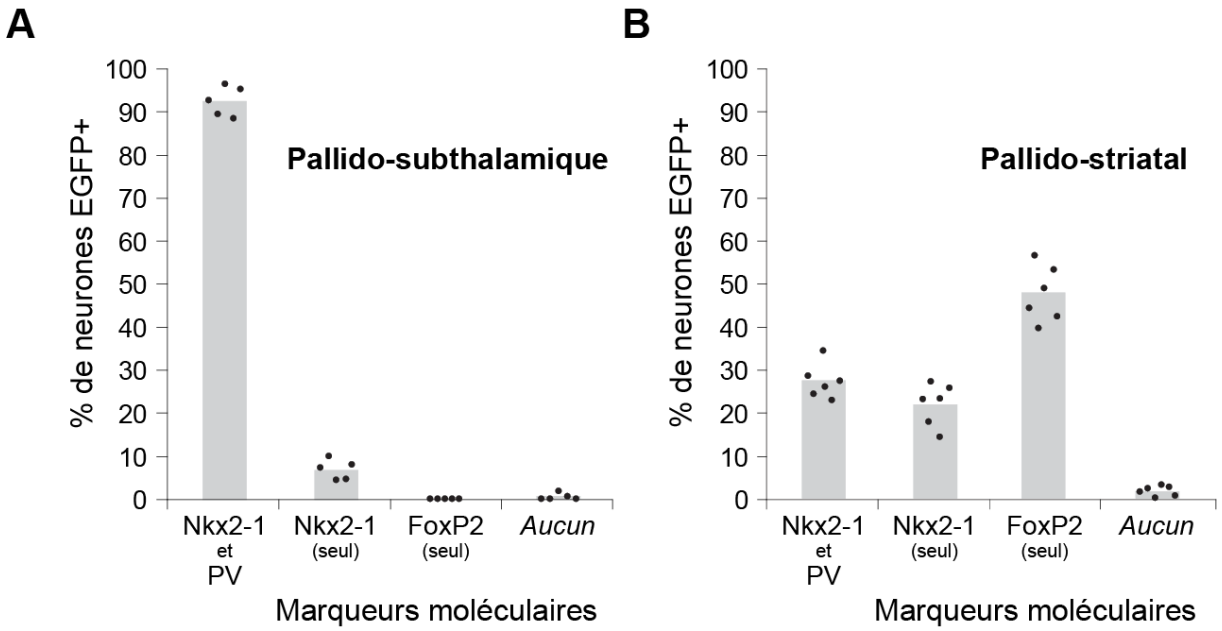


Figure 31 : Projection différentielle des neurones Nkx2.1-, PV-, et FoxP2-positifs du GP chez le rat.

A : Proportion de neurones pallido-suthalamiques en fonction de leur profil moléculaire. B : Idem mais pour les neurones pallido-striataux. Les points sur chaque colonne représentent les valeurs obtenues pour chaque animal.

caractéristique est une adaptation du réseau à l'hypodopaminergie ou une caractéristique normale des neurones. Nous avons donc transduit l'EGFP à l'aide d'un vecteur lentiviral rétrograde au niveau du striatum dorsal et au niveau du NST d'animaux normaux afin de déterminer les sites de projection des neurones du GP. Nous avons ensuite réalisé des immunohistochimies pour révéler les marqueurs PV, FoxP2 et Nkx2.1 et donc l'identité neurochimique des neurones pallido-striataux et pallido-subthalamiques (**Figure 31**). La vaste majorité des neurones du GP EGFP-positifs rétromarqués à partir du NST (377 neurones provenant de 5 rats) co-expriment Nkx2.1 (**Figure 31 C**). La plupart de ces neurones EGFP-positifs/Nkx2.1-positifs (93%) sont aussi PV-positifs. En revanche, aucun des neurones pallido-subthalamiques n'expriment FoxP2 (**Figure 31 C**). Ces données confirment que les neurones Nkx2.1-positifs (PV-positifs) constituent la principale population pallidale innervant le NST, alors que la population FoxP2 (PPE) ne projette pas sur ce noyau. L'injection du vecteur lentiviral dans le striatum dorsal de 6 autres rats a abouti à la transduction de nombreux neurones du GP (**Figure 31 D**), mais leur phénotype neurochimique est différent de ceux innervant le NST. En moyenne, la moitié (48%) des neurones EGFP-positifs innervant le striatum (n= 390) expriment FoxP2 mais pas Nkx2.1 ou la PV (**Figure 31 D**). Quasiment tous les neurones restant EGFP-positifs/FoxP2-négatifs (96%) expriment Nkx2.1 et parmi eux 50% expriment aussi la PV (**Figure 31 D**). Ainsi, nos résultats montrent que les neurones FoxP2-positifs innervent uniquement le striatum chez le rat normal et ils représentent la population pallido-striatal majoritaire. Néanmoins, la population de neurones pallido-striataux comporte aussi une cohorte de neurones Nkx2.1-positifs/PV-négatifs et Nkx2.1-positifs/PV-positifs.

VI. Manipulation optogénétique des neurones PV-positifs *in vitro* et *in vivo*.

Après avoir caractérisé les différentes populations neuronales du GP sur le plan neurochimique, électrophysiologique et anatomique, nous avons voulu tester la fonction de la population neuronale majoritaire du GP dans le contrôle du mouvement volontaire. La population majoritaire est celle des neurones PV-positifs qui projettent sur les structures de sorties. Pour cela, nous avons manipulé l'activité

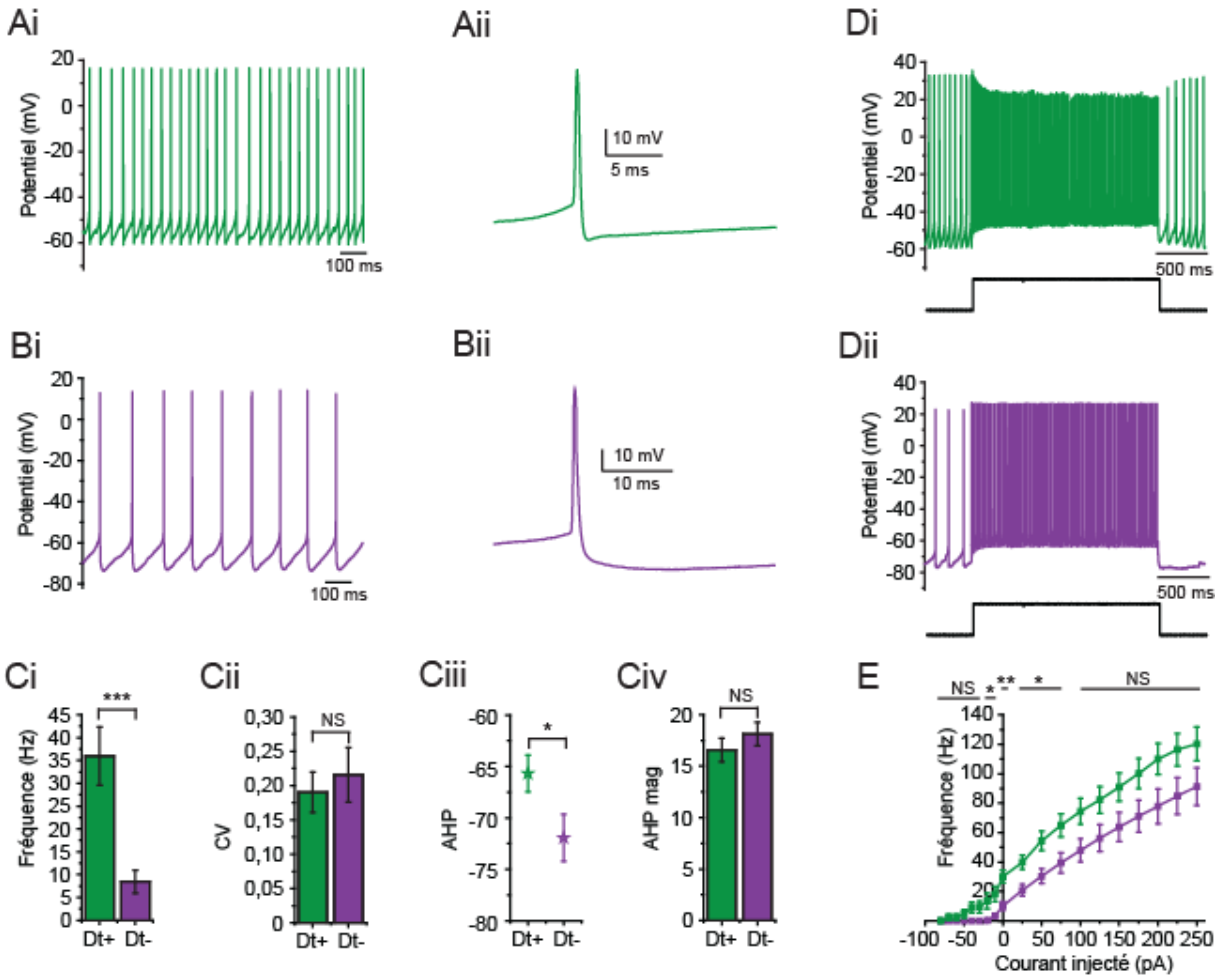


Figure 32 : Propriétés électrophysiologiques des neurones du GP chez la souris transgénique PV-Ai9.

Ai : Exemple d'enregistrement de l'activité spontanée d'un neurone double tomato positif. Ce neurone exprime la PV, visualisable en fluorescence par la présence de la protéine double tomato dans son cytoplasme (dt+, Ai). Bi, Exemple d'enregistrement de l'activité spontanée d'un neurone d'un autre sous-type neuronal non fluorescent (n'exprimant pas la PV, dt-). Aii-Bii: Exemples montant le décours temporel d'un PA pour les neurones en Ai-Bi. Ci-ii: Graphes représentant la fréquence de décharge (Ci) et le coefficient de variation (Cii) pour ces deux groupes neuronaux. Ciii-iv: Comparaison de la valeur de l'AHP (Ciii) et de son amplitude (Civ) pour ces deux groupes neuronaux. Di-Dii: Exemples de réponse à un créneau de courant dépolarisant (+100 pA). E: Courbe f/i des neurones dt+ et dt-. Neurones dt-positifs, n=17 ; Neurones dt-négatifs, n=10. Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

électrique des neurones grâce à l'optogénétique chez l'animal libre de ses mouvements. Pour réaliser ce type de manipulation d'une sous-population neuronale, nous avons choisi d'utiliser une approche transgénique. En effet il existe des souris transgéniques exprimant la recombinase bactérienne Cre, qui permet avec le système cre-lox de transduire de manière spécifique les neurones PV-positifs afin d'exprimer soit des protéines fluorescentes, telle que la double tomato (dt), ou des channelrhodopsine (ChR2, NpHR ou ArchT) spécifiquement dans ces neurones. Avant de manipuler l'activité des neurones PV-positifs du GP chez l'animal vigile, plusieurs étapes de validation *in vitro* ont été nécessaires. Ces dernières sont détaillées ci-dessous avant l'expérience *in vivo* proprement dite.

A. Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des neurones PV-positifs du GP chez la souris PV-Ai9.

Nous avons utilisé des souris PV-Ai9 issues du croisement d'animaux de la lignée PV-Cre et de la lignée reporter Ai9. La lignée Ai9 porte la séquence de dtomato (dt) entre deux séquences LoxP. Les animaux PV-Ai9 ont donc une expression de la dt restreinte aux neurones exprimant la PV. Ainsi il est possible de visualiser les neurones dt+ dans la tranche et de patcher sélectivement cette population neuronale.

Nous avons voulu tout d'abord vérifier que les propriétés des neurones du GP chez ces souris étaient identiques à celles observées chez le rat. Nous avons donc comparé les propriétés électrophysiologiques des neurones dt+ et dt- dans des tranches fraîches de souris PV-Ai9.

Comme chez le rat, nos enregistrements réalisés sur les neurones dt+ et donc PV-positifs montrent que ces neurones ont une activité pacemaker et une fréquence de décharge élevée (**Figure 32 A**, Fq_{rat}= 23,67 ± 5,24 Hz, n=12 ; Fq_{souris}= 35,95 ± 6,38 Hz, n=17 ; p= 0,16). Si on compare les propriétés des neurones dt+ à celles des dt-, il apparait une différence significative de fréquence de décharge, du CV et aussi de la valeur de l'AHP (**Figure 32 Ci-iii**), mais pas de l'amplitude de l'AHP (**Figure 32 Civ**). Ce dernier résultat diverge de ceux obtenus chez le rat, mais cette différence provient certainement du fait que les neurones dt- que nous avons enregistrés englobent à la fois les neurones de la population FoxP2 et les neurones DN.

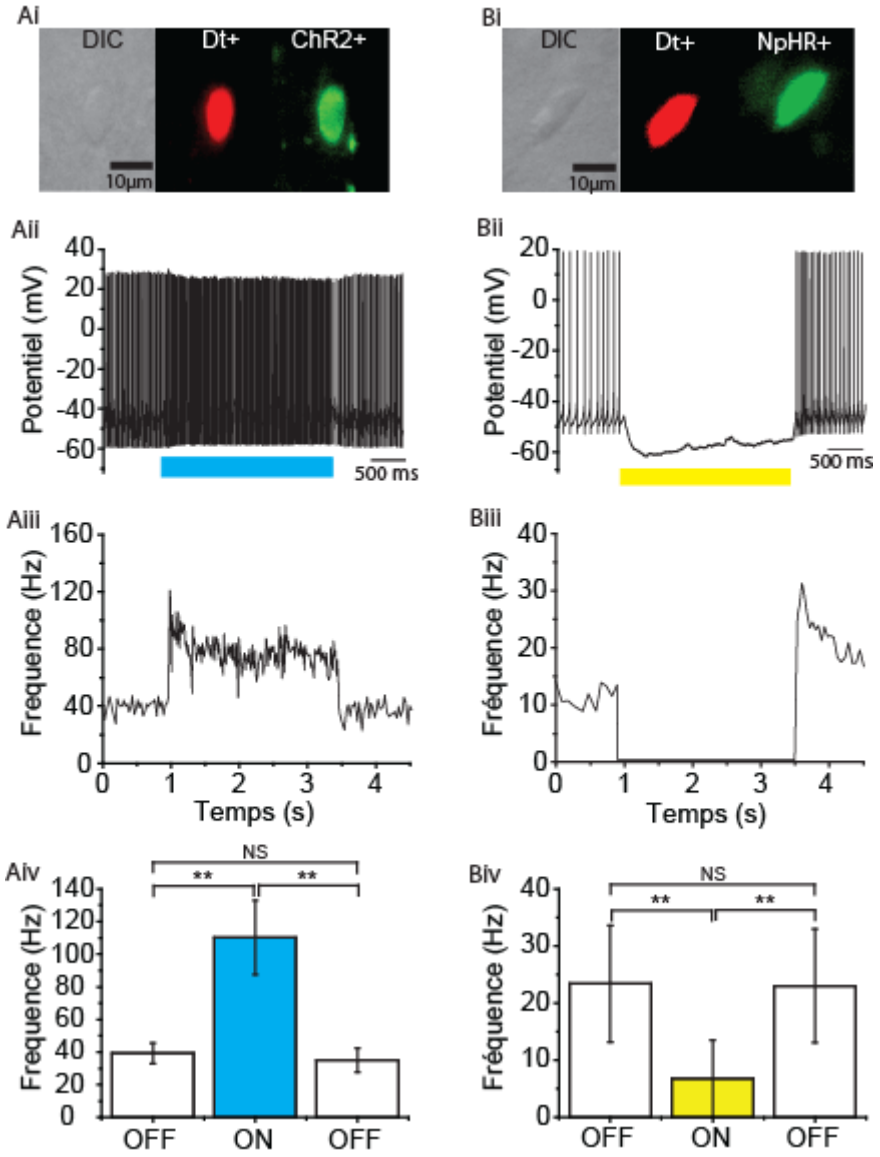


Figure 33 : Contrôle optogénétique *in vitro* de l'activité de décharge des neurones PV du GP chez la souris PV-Ai9.

Ai : Microphotographie prise en contraste différentiel interférentiel (DIC) et en épifluorescence pendant l'enregistrement électrophysiologique d'un neurone PV du GP (dt+) transfecté avec la channelrhodopsine-2 fusionnée à l'YFP (ChR2+). Aii-iii: Activation du neurone provoqué par un flash de lumière bleue (λ = 473 nm) pendant 2 secondes et graphe de sa fréquence de décharge instantanée. Aiv : Graphe résumant l'effet de l'activation de ChR2 par des flashs de λ = 473 nm (ON) sur la fréquence de décharge des neurones du GP par comparaison à la fréquence de décharge pré- et post-flash (OFF). Bi-iv : Idem pour un neurone PV-positif exprimant l'halorhodopsine fusionnée à l'YFP (NpHR+). L'activation par un flash de lumière jaune (λ = 561 nm) entraîne une hyperpolarisation et une inhibition de la fréquence de décharge des neurones. Neurones ChR2+, n=9 ; Neurones NpHR+, n=6. Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

En effet, cela s'observe sur la courbe f/i où nous trouvons uniquement des différences de décharge lors d'injection de courant compris entre -10 mV et +100 mV (**Figure 32 E**). Comme chez le rat, ces résultats suggèrent que les neurones dt+ sont capable de décharger à des fréquences plus élevées que les neurones dt- lors d'injection de courants dépolarisants même si nous n'avons pas trouvé de différence significative entre ces deux groupes pour certaines valeurs en raison de l'hétérogénéité du groupe dt-.

Ces résultats montrent que la population de neurones PV de la souris PV-Ai9 représente l'équivalent de celle du rat, puisque la plupart de leurs propriétés sont identiques.

B. Les neurones PV peuvent être modulés par la lumière *in vitro*

La seconde étape importante de validation consiste à montrer *in vitro*, 1) qu'il est possible de manipuler l'activité des neurones du GP en utilisant la lumière 2) que l'infection virale et l'expression des protéines exogènes (ChR2, NpHR) ne modifient pas la physiologie des neurones transfectés. Le montage de la **Figure 33 Ai-Bi** montre un neurone en optique infra-rouge (cadran gauche), l'expression de la PV après immunohistochimie (cadran milieu) et la ChR2 que l'on détecte avec la présence de l'YFP (cadran droite). La stimulation avec un laser bleu (λ= 473 nm) augmente l'activité de décharge de ce neurone (**Figure 33 Aii**) ce qui se traduit par une augmentation significative de la fréquence de décharge (**Figure 33 Aiii-Aiv**). En moyenne les fréquences sont : Fq avant Flash = 39,22 ± 6,42 Hz; Fq pendant Flash= 110,23 ± 22,60 Hz ; n=9 ; p=0,0021. Dès que les neurones ne sont plus stimulés par le laser bleu, ils reviennent à leur fréquence de décharge basale (Fq après flash = 35,09 ± 7,39 Hz ; p=ns). Nous avons renouvelé cette expérience cette fois dans le but d'inhiber l'activité des neurones PV en jouant avec des flashs de lumière jaune (λ= 584 nm) sur les canaux NpHR. Malgré la fréquence de décharge élevée des neurones PV du GP, la stimulation optique abolit totalement la décharge des neurones dans la plupart des cas (5/6 neurones) (**Figure 33 Bii**). Ceci se traduit par une diminution significative de la fréquence de décharge (Fq avant Flash= 23,38 ± 10,18 Hz ; Fq pendant Flash = 6,75 ± 6,75 ; n=6 ; p= 0,0026 ; **Figure 33 Biii**). A l'arrêt de la stimulation optique, les neurones produisent un rebond post-inhibiteur

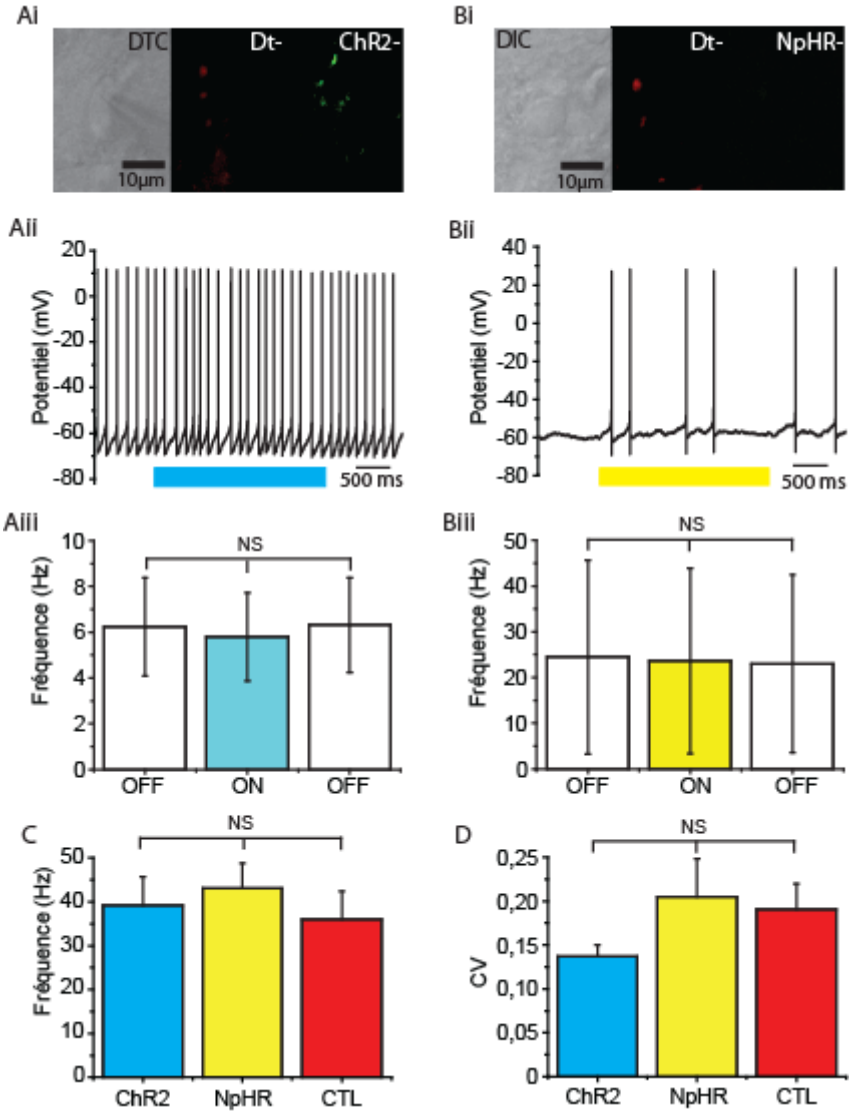


Figure 34 : Spécificité de la transfection chez les souris PV-Ai9.

Ai-Bi : Exemples de neurones de type PV-négatifs (pas de fluorescence de la dtomato) et n'exprimant pas ChR2-YFP (Ai) ou NpHR-YFP (Bi). Aii-Bii : Application de flashs de lumière bleue (λ = 473 nm) ou jaune (λ = 561 nm) de 2,5 s. Aiii-Biii : Fréquence de décharge moyenne avant, pendant et après la stimulation lumineuse par la lumière bleue (Aiii) ou par la lumière jaune (Biii). C-D : Graphes montrant l'absence d'effet de la stimulation lumineuse sur la fréquence de décharge des neurones et sur leur régularité. Neurones ChR2-, n=5 (Aiii) ; Neurones NpHR-, n=4 (Biii). Neurones ChR2+, n=5 (C) ; Neurones NpHR6, n=4 (D); Neurones CTL=17 (E). Configuration « cellule entière », mode courant imposé, courant maintenu nul.

puis reprennent une activité de décharge régulière (Fq après flash = 22,98 ± 9,96 Hz). (**Figure 33 Bii**).

Ainsi, nous montrons que nous pouvons contrôler efficacement l'activité des neurones PV du GP avec la lumière.

Nous avons comparé la fréquence de décharge moyenne et la régularité de neurones dt+ non transfectés avec celles de neurones dt+ transfectés soit par la ChR2 ou par NpHR (**Figure 34 C-D**). Nous ne trouvons pas de différence significative entre ces trois groupes ni pour la fréquence de décharge, ni pour le coefficient de variation (Fq dt+ CTL= 35,95 ± 6,38 Hz, n=17 ; Fq dt+ ChR2= 39,22 ± 6,42 Hz, n=9 ; Fq dt+ NpHR= 23,38 ± 10,18, n=6 ; p= 0,16) (CV dt+ CTL= 0,19 ± 0,03, n= 17 ; CV dt+ ChR2= 0,14 ± 0,01, n=9 ; CV dt+ NpHR= 0,20 ± 0,04, n=6 ; p=0,37). Ces résultats montrent que la transfection des neurones par ces virus et l'expression de ChR2 et NpHR n'a pas d'impact sur l'excitabilité intrinsèque des neurones.

Afin de vérifier l'absence de « fuite » du système d'expression cre-lox, c'est-à-dire une expression de protéines dans des neurones n'appartenant pas à la population PV du GP, nous avons examiné des neurones dt-. Nous avons tout d'abord constaté l'absence de fluorescence YFP dans ces neurones (suggérant l'absence d'expression de ChR2/NpHR). De plus, nous n'avons jamais observé de modification de la décharge des neurones dt- lors de la stimulation optique (**Figure 34 Aii-Biii**). L'ensemble de ces expériences montre que nous pouvons manipuler l'activité des neurones PV-positifs de manière spécifique sans que la physiologie de ces neurones ne soit altérée. Il suggère qu'il est possible de manipuler l'activité des neurones du GP *in vivo* chez l'animal vigile libre de ses mouvements.

C. Contrôle bilatéral des neurones PV-positifs du GP *in vivo* chez l'animal vigile libre de ses mouvements

La population PV-positive du GP constitue classiquement le premier relai de la voie indirecte des GB. Ainsi selon le modèle d'Alexander et Crutcher, la stimulation de ces neurones devrait favoriser le mouvement et leur inhibition devrait avoir l'effet opposé. Nous avons transfecté de manière bilatérale deux groupes de souris PV-Cre : 6 animaux avec un vecteur viral permettant l'expression de ChR2, et 6 autres celle de ArchT dans les neurones PV du GP. A notre connaissance, aucune

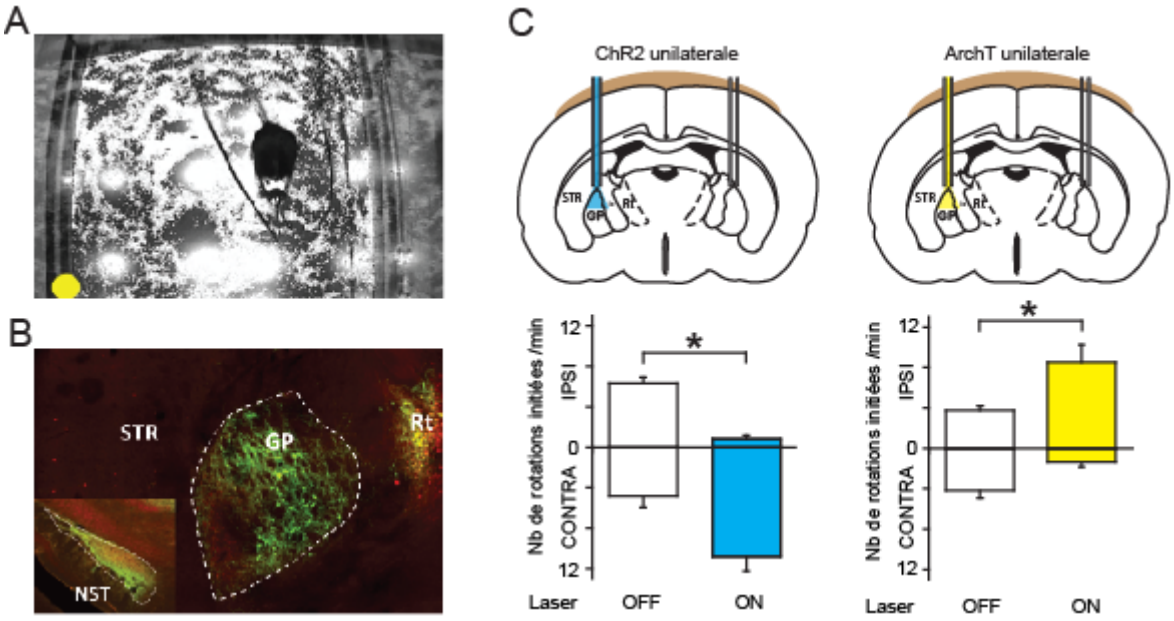


Figure 35 : La manipulation unilatérale des neurones PV-positifs du GP provoque un comportement rotatoire chez la souris PV-Ai9 vigile et libre de ses mouvements.

A : Image extraite d'un enregistrement vidéo montrant une souris PV-Ai9 dans l'openfield où se déroule le test comportemental. Des optrodes ont été implantées par stéréotaxie au niveau de ses GP, bilatéralement. L'animal est stimulé unilatéralement avec une fibre optique posée sur l'hémisphère droit. B: Contrôle histologique démontrant la transfection (vert/YFP) des neurones PV du GP (rouge/dt). En insert, image montrant la présence d'axones pallidaux transfectés au niveau du noyau sous-thalamique. C : Analyse quantitative du comportement rotatoire des souris après activation (ChR2) ou inhibition (ArchT) unilatérale. Animaux transfectés avec ChR2+, n=6 ; Animaux transfectés avec ArchT+, n=6.

expérience de stimulation/inhibition bilatérale, réversible, électrique ou optique, n'a été réalisée jusqu'à présent au niveau du GP.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de stimulations optiques bilatérales de longue durée sur l'ambulation des animaux dans un openfield. Chaque stimulation d'une durée d'1 à 5 secondes était suivie d'1 seconde de récupération à la fréquence de 0.5 à 0.11 Hz, ceci pendant une durée de 30 secondes. Chaque phase de stimulation de 30 secondes est suivie d'une phase sans stimulation de 30 secondes. En condition contrôle, la souris se déplace dans l'openfield et explore son environnement (**Figure 35 A**). L'activation bilatérale de ChR2 entraîne des perturbations de l'ambulation des souris avec des difficultés à exécuter des mouvements et de brefs moments d'immobilité. Bien que visuellement il apparaisse clairement que la stimulation ait un effet sur le comportement de l'animal, la quantification de cet effet s'est avérée décevante, étant donné l'absence de comportements stéréotypés nets (immobilité supérieure à 2s, par exemple). Pour le groupe d'animaux exprimant ArchT, il nous a semblé cette fois que le déplacement des animaux était plus rapide, mais ici aussi la quantification s'est avérée difficile. Ainsi, nos expériences de manipulations bilatérales des neurones du GP ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet clair sur le comportement moteur des animaux.

D. Contrôle unilatéral des neurones PV du GP

Nous avons examiné l'effet de stimulations unilatérales avec pour objectif de créer un déséquilibre entre les deux hémisphères sur le contrôle du mouvement ce qui selon le modèle d'Alexander et Crutcher, doit créer des désordres moteurs. Pour cela, chaque souris a été placée dans un openfield et l'initiation d'un déplacement à gauche ou à droite par l'animal a été quantifiée. Notre protocole a consisté en des stimulations optiques continues de 30 secondes suivies de 30 secondes sans stimulation et répétées 2 fois, soit un test d'une durée totale de 2 minutes. En situation basale, en absence de stimulation, les souris se déplacent en allant sur leur droite ou leur gauche sans préférence particulière. En revanche, pendant la stimulation optique de ChR2 et donc l'activation des neurones PV du GP nous avons observé un comportement rotatoire chez nos six animaux avec des rotations initiées du côté controlatéral à la stimulation (**Figure 35 C**). Nous avons comptabilisé plus de

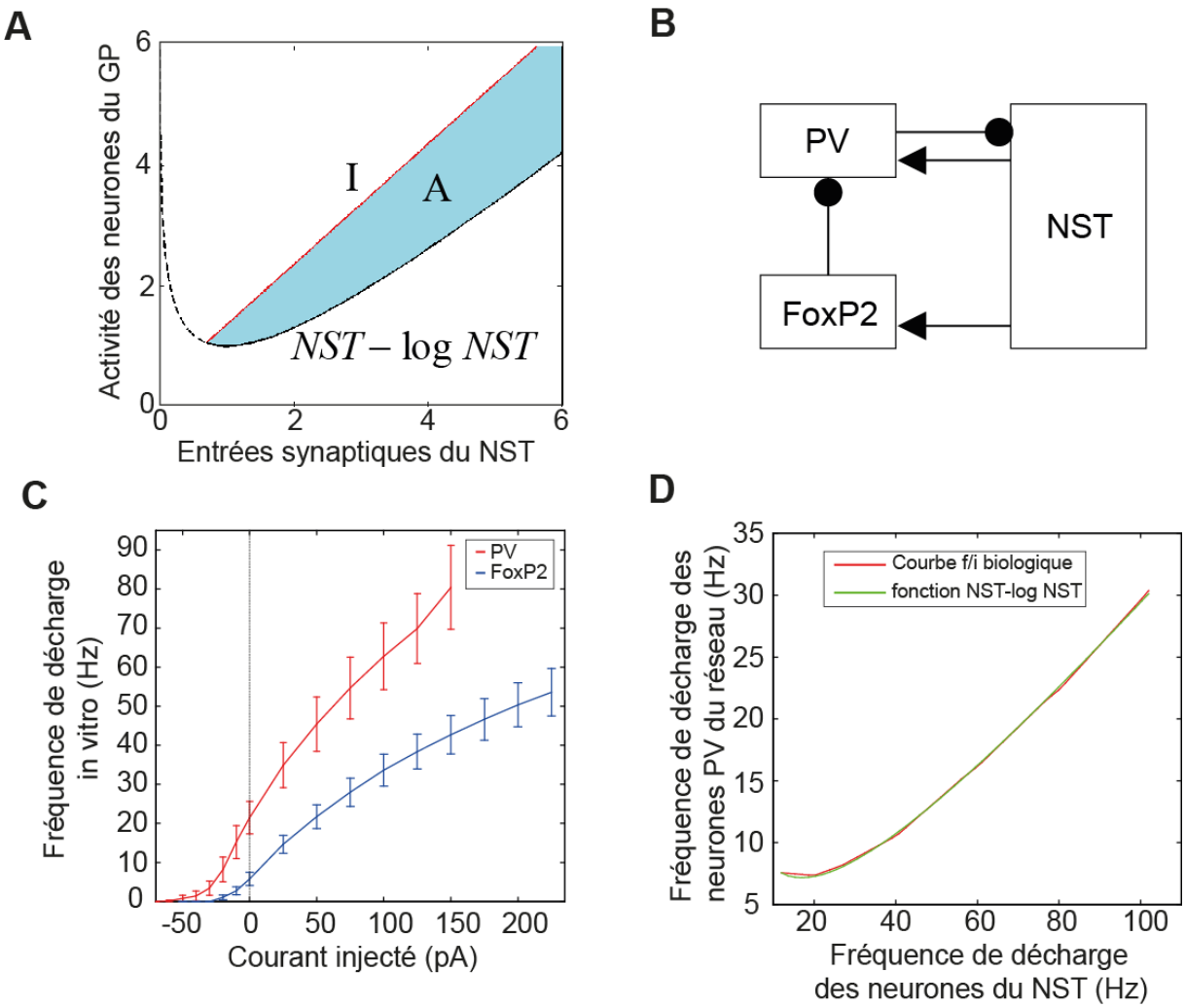


Figure 36 : Les propriétés et la connectivité des neurones du GP permettent une sélection optimale d'un programme moteur.

A: Décomposition de la fonction *NST* – log *NST* (courbe en noir) sous la forme de la différence entre une fonction initiale (I, ligne rouge) et une zone d'ajustement (A, en bleue). B : Circuit neuronal hypothétique calculant la fonction *NST* – log *NST* (les flèches indiquent les connections excitatrices, les lignes finissant avec un cercle plein, les connections inhibitrices). I dénote la population neuronale avec la courbe f/I correspondant à la fonction I du graphe A. L'activité des neurones I est ajustée par l'inhibition de la courbe f/I correspondant à la zone en bleue sur le graphe A. C : Courbe f/I des neurones PV et FoxP2. D : Estimation de la réponse des neurones TI (PV) dans le réseau comparée avec une version mise à l'échelle de la fonction *NST* – log *NST.*

10,83 ± 1,43 rotations initiées du côté controlatéral et 0,83 ± 0,33 du côté ipsilatéral lors de l'activation des neurones PV du GP. La manipulation des neurones par l'activation d'ArchT a abouti à l'initiation de rotations du côté ipsilatéral à la stimulation optique chez nos six animaux (**Figure 35 C**). Les souris ont fait en moyenne 8,5 ± 1,73 rotations initiées du côté ipsilatéral et 1,33 ± 0,51 du côté controlatéral lors de l'inhibition des neurones PV alors qu'en conditions basales les souris effectuent autant de rotations du côté ipsi- que controlatéral. Ces résultats montrent que l'activation ou l'inhibition des neurones PV du GP a des effets opposés sur l'exécution du mouvement, ce qui suggère que les effets comportementaux que nous avons observé sont spécifiques. La vérification histologique de la transfection du GP et de l'emplacement des optrodes est actuellement en cours de réalisation. Nos premières immunohistochimies ont confirmé que les neurones PV du GP ont bien été transfectés par ChR2, puisque un nombre important de neurones du GP sont doublement marqués par l'YFP et la PV. De plus, l'observation de nombreuses fibres YFP-positives au niveau du NST indique bien que la voie pallido-subthalamique a été transfectée de manière efficace (**Figure 35 B**).

VII. Implication d'une dichotomie fonctionnelle au niveau du globus pallidus sur la sélection d'un programme moteur

De nombreux modèles computationnels ont suggéré de quelle manière le réseau des GB peuvent sélectionner des actions motrices de manière optimale sur le plan statistique. Ces modèles prédisent que pour réaliser une sélection optimale, le GP doit envoyer un « feedback » vers le NST qui correspond à une fonction particulière de l'activité des neurones du NST. La complexité de cette fonction (STN-log STN ; **Figure 36 A**) rend peu probable qu'un neurone du GP puisse calculer cette dernière. Nous avons lancé une collaboration avec le groupe du Dr Bogacz à Bristol afin de proposer un modèle composé de deux types cellulaires distincts dans le GP permettant de calculer cette fonction. Le détail complet du modèle est disponible dans l'article en préparation joint à la fin de cette section. Brièvement, celui-ci repose sur la connectivité particulière entre les neurones du GP et du NST qui découle du travail de Mallet et collègues 2012 (**Figure 36 B)** et les propriétés électrophysiologiques des neurones PV et FoxP2 du GP que nous avons décrites (**Figure 36 F**) permettent aux GB de sélectionner de manière optimale une action

donnée. Ainsi, la relation entre la fréquence de décharge des neurones et le courant injecté des neurones PV et FoxP2 correspondent exactement aux paramètres requis par le modèle pour une sélection optimale (**Figure 36 C-D**).

VIII. Travaux annexes : Manipulation optogénétique des interneurones PV-positifs du cortex prélimbique chez l'animal vigile et libre de ses mouvements.

Pendant mon doctorat, j'ai pris en charge les tests *in vitro* de validation des protocoles d'optogénétiques que l'équipe du Dr Cyril Herry a appliqué à l'animal vigile.

Le cortex pré-limbique (CPL) est une structure associée à l'expression de la peur (Sotres-Bayon & Quirk 2010). Des études ont montré que sa lésion (Morgan & LeDoux 1995) ou son inhibition pharmacologique (Corcoran & Quirk 2007) bloque l'expression du comportement de peur. A l'inverse, la stimulation électrique du CPL entraîne l'expression du comportement de peur (Vidal-Gonzalez et al 2006). L'équipe du Dr Herry étudie les mécanismes cellulaires impliqués dans l'expression du comportement de peur chez la souris. Le rôle des interneurones GABAergiques et en particulier ceux exprimant la PV dans le contrôle global l'activité corticale a été clairement établi (Toledo-Rodriguez et al 2004). L'équipe du Dr Herry a souhaité déterminer le rôle de cette population d'interneurones dans l'expression de la peur.
Un comportement de peur chez la souris peut être est induit par un signal sonore associé à un choc électrique. Il se traduit par une période d'immobilité de l'animal appelé « freezing ». En pratique, les souris sont tout d'abord conditionnées par l'association entre le signal sonore (le stimulus conditionnel, SC) et un choc électrique au niveau périphérique (le stimulus inconditionnel, SI). Ainsi, la présentation ultérieure du son conditionné (sans choc électrique) induit un ensemble de modifications comportementales (réponses conditionnées), et en particulier une réaction d'arrêt (réponse émotionnelle conditionnée d'immobilisation) dont la durée est aisément quantifiable. Pendant les expériences comportementales, l'équipe du Dr Herry enregistre l'activité neuronale unitaire en extracellulaire dans le CPL. L'équipe a découvert que les interneurones PV du CPL sont inhibés pendant le comportement

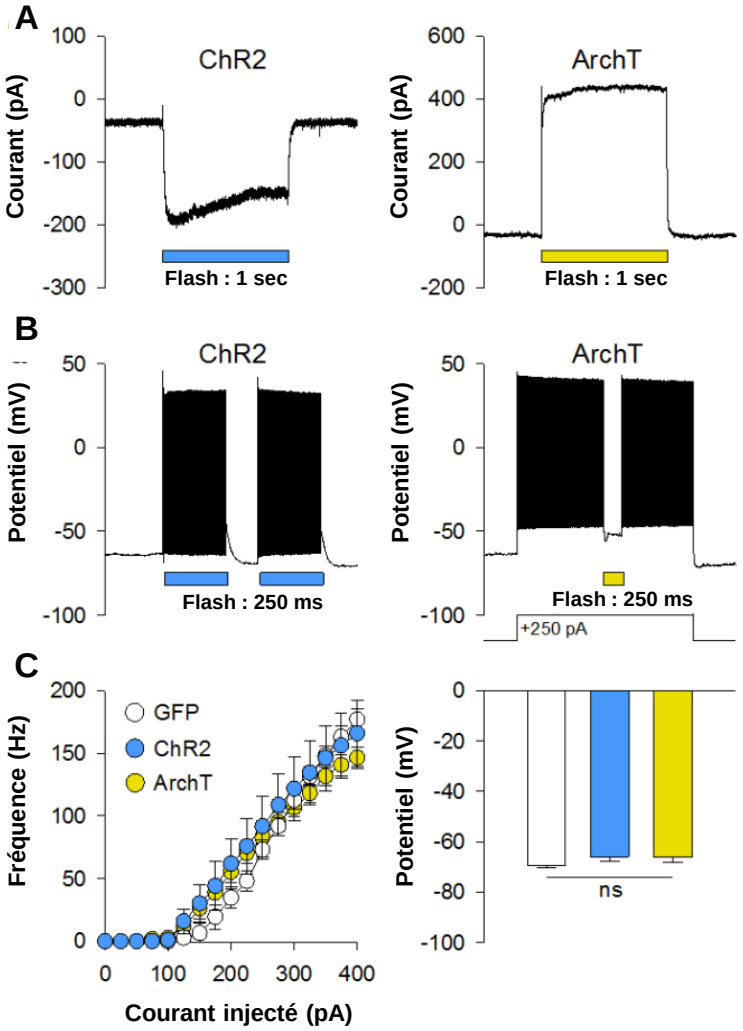


Figure 37 : Photo-activation et photo-inhibition des interneurones PV-positifs exprimant ArchT, ou ChR2 et la GFP de la couche 2/3 du cortex prélimbique de souris transgéniques PV-ChR2 ou PV-ArchT.

A : Tracés des courants évoqués lors de l'activation de ChR2 (gauche) ou d'ArchT (droite) par une stimulation lumineuse d'1 seconde. B : Exemples du contrôle exercé par ChR2 et ArchT sur l'activité de décharge des interneurones PV. Les deux protocoles utilisés *in vitro* ont été ajustés afin de reproduire les protocoles réalisés lors des expériences de comportement *in vivo*. C, à gauche : courbe entrée-sortie des interneurones PV-positifs exprimant la GFP (points blancs, n=7), ChR2 (points bleu, n=5) ou ArchT (points jaunes, n=8) lors de l'injection de créneaux de courant dépolarisant (gamme de courant de 0 à 400 pA). A droite : potentiel de repos des interneurones PV-positifs exprimant la GFP (colonne blanche, n=7), ChR2 (colonne bleu, n=5) ou ArchT (colonne jaune, n=8). Aucune différence significative n'a été observée entre ces trois groupes indiquant que l'expression de ChR2 ou d'ArchT n'influence pas l'excitabilité des interneurones PV-positifs du cortex prélimbique.

de peur. Grâce à des manipulations optogénétiques *in vivo* des interneurones PV elle a montré que cette population d'interneurones jouait un rôle central dans l'expression de la peur conditionnée (Courtin et al., 2013, accepté pour publication). Ma contribution à ce travail a été 1) de déterminer les propriétés électrophysiologiques des interneurones PV du CPL dans des tranches fraîches de cerveau de souris et 2) de vérifier que l'expression de ChR2 ou ArchT dans les interneurones PV n'impacte pas leur physiologie, 3) mettre en évidence les courants dus à l'activation de ces protéines et 4) vérifier l'effet des stimulations lumineuses bleue ou jaune sur la décharge des neurones du CPL.

Nous avons donc effectué des enregistrements en configuration *«cellule entière»* des interneurones PV du CPL dans les couches infralaminaires 2/3. Nous avons tout d'abord montré que la stimulation lumineuse de ChR2 (λ=473 nm) et ArchT (λ=584 nm) entrainait bien des courants ioniques dans les interneurones PV (**Figure 37 A**) capables de dépolariser ou d'hyperpolariser le potentiel de membrane des interneurones et d'en contrôler l'excitabilité (**Figure 37 B**). Nous avons comparé les propriétés de décharge évoquée par injection de courants dépolarisants et le potentiel de repos entre les interneurones transfectés avec ChR2, ArchT et la GFP (groupe contrôle). Nous n'avons pas observé de différence significative au niveau de ces différents paramètres entre les trois groupes de neurones (**Figure 37 C**) suggérant que l'expression de ChR2 ou d'ArchT n'affecte pas les propriétés des interneurones PV du CPL et donc n'entraîne pas de conséquence sur le fonctionnement de cette région corticale *in vivo*.

Conclusion

Conclusion

Depuis plus de 20 ans, au sein du modèle d'Albin et collaborateurs (1989), le GP est considéré comme un simple noyau relais constitué d'une population homogène de neurones transmettant l'information motrice du striatum au NST. Mais récemment, une étude faite en électrophysiologie *in vivo* chez le rat anesthésié, modèle de la maladie de parkinson, montre qu'il existe deux types neuronaux au sein du GP en fonction de leur activité electrophysiologique avec les différentes phases de l'électrocorticogramme (Mallet et al, 2008). Ces mêmes auteurs proposent 4 ans plus tard une corrélation entre le mode de décharge de ces neurones et l'expression d'un marqueur neuronal, ce qui suggère une dichotomie anatomo-fonctionnelle au sein du GP. De plus, ils montrent que les neurones PV-positifs, nommés « prototypiques », projettent essentiellement sur les noyaux de sorties des GB (NST, SNr), tandis que les neurones PPE-positifs, nommés « arkypallidalaux », projettent uniquement en retour sur le striatum (Mallet et al, 2012). Cette dernière étude de Mallet et collaborateurs montre que le GP ne peut plus être considéré comme un simple noyau relais qui transmet l'information du striatum au NST.

L'objectif de cette thèse a été de voir si ces deux populations décrites au sein du GP pouvaient être retrouvés chez le rat témoin, et si les activités électrophysiologiques observées *in vivo* entre ces deux types neuronaux pouvaient être expliquées par des différences de propriétés membranaires intrinsèques.

Nous avons tout d'abord caractérisé l'existence de plusieurs populations neuronales distinctes au sein du GP en analysant en immunohistochimie des marqueurs neuronaux présents à l'âge adulte ainsi que des facteurs de transcription caractéristiques de la zone embryonnaire d'où proviennent les neurones du GP. Cela nous a permis de mettre en évidence l'existence de deux populations majoritaires au sein du GP. Une première population de neurones exprimant à la fois la PV et le facteur de transcription Nkx2.1, et une seconde population de neurones exprimant à la fois la PPE et le facteur de transcription FoxP2.

Afin de vérifier si cette diversité moléculaire était corrélée avec des propriétés électrophysiologiques spécifiques, nous avons caractérisé les propriétés membranaires *in vitro* de neurones du GP dont l'identité moléculaire par l'immunohistochimie. Cela nous a permis de distinguer des propriétés électrophysiologiques distinctes entre les neurones PV- et FoxP2-positifs. Ces deux

types neuronaux ont des fréquences de décharge, des cinétiques de leur potentiel ainsi que des propriétés électriques lors d'injection de courant qui leurs sont propres.
Parmi la liste de conductances pouvant contribuer à ces différences de propriétés électrophysiologiques, nous nous sommes intéressés à deux types de canaux voltage dépendant: les canaux sodiques responsables du courant INaP et les canaux HCN responsables du courant Ih, puisqu'il a été montré que ces deux canaux ioniques participent à l'activité pacemaker des neurones du GP. Nos résultats suggèrent qu'il existe une plus forte expression des canaux sodiques responsable du courant INaP dans les neurones PV-positifs. Concernant le courant Ih, nous pouvons uniquement conclure que l'amplitude de ce courant est plus importante pour les neurones FoxP2-positifs, mais nous ne pouvons pas conclure si cette différence d'amplitude est due à une expression ou une distribution différentielle des canaux HCN entre les neurones PV- et FoxP2-positifs.
Afin de compléter la caractérisation de ces groupes neuronaux, nous avons étudié la diversité anatomique des neurones du GP au sein du réseau des GB, en utilisant un traceur rétrograde nous permettant de déterminer les structures sur lesquelles projettent les neurones du GP. Cela nous a permis de démontrer que chez le rat normal, comme dans le modèle 6OHDA de la maladie de Parkinson, les neurones FoxP2 qui correspondent aux neurones « arkypallidaux » projettent exclusivement en retour sur le striatum et représentent la population pallido-striatale majoritaire. Nous retrouvons également la population « prototypique » qui exprime à la fois la PV et Nkx2.1 qui projette essentiellement sur les structures de sorties des GB, mais en plus nous trouvons une population neuronale exprimant uniquement le facteur de transcription Nkx2.1 qui innerve à la fois le striatum et le NST.
Pour finir, par une approche optogénétique encore préliminaire, nous montrons pour la première fois que manipuler une sous-population neuronale du GP, la population PV-positive, est suffisante pour affecter le comportement moteur des animaux.

En conclusion générale, nous avons montré pour la première fois l'existence d'une corrélation entre l'identité moléculaire, les caractéristiques électrophysiologiques et les projections axonales des deux principales populations neuronales du GP chez le rat normal. Nos données renforcent ainsi l'existence d'une dichotomie au sein du GP et ouvre de nombreuses perspectives afin de mieux

comprendre le rôle de chaque sous-type neuronal du GP dans le contrôle du mouvement volontaire.

Discussion

Rappel des principaux résultats

Chapitre 1 : Classification neurochimique au sein du Globus Pallidus

Chapitre 2 : Classification électrophysiologique au sein du Globus Pallidus

Chapitre 3 : Innervation différentielle des neurones du Globus Pallidus au sein du réseau des ganglions de la base

Chapitre 4 : Diversité neuronale dans le Globus Pallidus et initiation du mouvement

Discussion

Rappel des principaux résultats

L'objectif global de la thèse présentée ici était de mieux comprendre l'organisation anatomique et fonctionnelle du *Globus Pallidus* à différents niveaux : moléculaire, électrophysiologique et fonctionnel, afin de clarifier son rôle dans le mouvement volontaire.

La première condition nécessaire pour atteindre cet objectif était de parvenir à synthétiser les données montrant chez le rat une diversité moléculaire, neurochimique, au sein de ce noyau. Pour cela, nous avons cherché à combiner l'ancienne et la nouvelle nomenclature, basée respectivement sur l'identification de marqueurs intracytoplasmiques et sur la détection de facteurs de transcription embryonnaire. Cette condition a été remplie grâce à des expériences d'immunohistochimie, qui nous ont permis d'identifier quatre populations au sein du GP. Les deux populations principales consistent en un groupe de neurones qui co-expriment à la fois les marqueurs PV et Nkx2.1 et qui représentent 55,1% des neurones du GP, et un second groupe exprimant à la fois les marqueurs FoxP2 et PPE qui représente 23,85% de ces neurones. Les deux autres populations sont caractérisées soit par l'expression de Nkx2.1 ou de FoxP2 et représentent respectivement 14,15% et 4,5% des neurones du GP.

La caractérisation neurochimique des neurones du GP nous a ensuite conduit à tester si la classification moléculaire permettait de mettre en évidence une diversité fonctionnelle. Pour cela, nous avons combiné l'électrophysiologie *in vitro* avec la révélation immunohistochimique de deux marqueurs, PV et FoxP2 car ces 2 marqueurs sont exprimés dans 78% des neurones du GP. Nos résultats ont mis en évidence des différences électrophysiologiques intrinsèques entre les neurones PV- et FoxP2-positifs : leur fréquence de décharge, leur régularité, l'amplitude de leur AHP, leur capacité à faire des rebonds post-inhibiteurs et leur 'sag', ainsi que, probablement, leur sensibilité aux agonistes des récepteurs de la famille D2.

Nous avons ensuite utilisé un traceur rétrograde, qui nous a permis de montrer que ces 2 populations projetaient de manière différentielle au sein du réseau des GB. Cette expérience nous a permis de montrer que chez le rat contrôle comme chez le

rat 6-OHDA, les neurones FoxP2- et PPE-positifs dits ‘arkypallidaux’ (Mallet et al 2012) projettent uniquement sur le striatum, mais aussi que la population de neurones Nkx2.1 projette à la fois sur le striatum et sur le NST, ce qui n’avait pas été montré par l’étude de Mallet et collègues.

Enfin, nous avons initié des expériences de manipulation de l’activité de la population de neurones PV-positifs afin de déterminer leur rôle dans le contrôle du mouvement volontaire en utilisant l’optogénétique. Nos résultats sont très préliminaires et méritent des expériences complémentaires mais ils suggèrent que les neurones PV-positifs jouent le rôle attendu sur la base du modèle classique des GB.

L’ensemble de ces résultats apporte des réponses sur l’existence d’une diversité anatomo-fonctionnelle et structurale au sein du GP, mais amène également de nouvelles interrogations. Dans cette discussion, nous allons revenir sur chacun des quatre résultats pour mettre en avant l’intérêt qu’ils apportent. Nous allons également mettre en perspectives les expériences qu’il serait intéressant d’effectuer pour aller plus loin dans la compréhension du fonctionnement du GP dans le réseau de GB et de manière plus générale dans le contrôle du mouvement volontaire.

I. Classification neurochimique au sein du Globus Pallidus

Notre premier objectif était de donner un support unique solide à la diversité neurochimique et embryonnaire du GP. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d’immunohistochimies couplant la détection de marqueurs neuronaux décrits dans les années 2000 (Hoover & Marshall 1999) à celle de facteurs de transcription (Nkx2.1 et FoxP2) identifiés plus récemment comme des marqueurs spécifiques de zones embryonnaires distinctes (Ferland et al 2003 , Nobrega-Pereira et al 2010 , Takahashi et al 2009, Takahashi et al 2003). Les marqueurs décrits dans les années 2000 sont des protéines liant le calcium (PV, PPE, calbindine, calrétinine) ; les facteurs de transcription (NKx2.1, NPAS1, FoxP2) sont exprimés au cours du développement du cerveau et caractérisent les origines embryonnaires des populations neuronales.

Nous avons distingué plusieurs populations neuronales, que nous avons classées en quatre sous-groupes. Nous trouvons une population majoritaire, exprimant à la fois PV et Nkx2.1. Elle représente plus de la moitié des neurones du GP, ce qui est en accord avec la littérature (Hoover & Marshall 1999 , Nobrega-Pereira et al 2010). Elle

provient de la MGE (Nobrega-Pereira et al 2010). Nous avons identifié une seconde population (23,85%) exprimant la PPE et nous montrons que cette population peut être caractérisée par l'expression du facteur de transcription FoxP2. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elle correspond à la population des neurones NPAS1-positifs provenant de la LGE décrite précédemment (Nobrega-Pereira et al 2010). Il est connu que les neurones exprimant FoxP2 proviennent de la LGE (Ferland et al 2003 , Takahashi et al 2009, Takahashi et al 2003), et comme nous avons observé que tous les neurones PPE-positifs expriment aussi FoxP2 (> 99%) mais pas Nkx2.1 (marqueur exprimé dans 75 % des neurones du GP), nous suggérons que la population des neurones PPE-positifs provient de la LGE et correspond à la population de neurones NPAS1-positifs décrite par Nobrega-Pereira et collaborateurs. Des expériences supplémentaires de double immunohistochimie contre PPE et NPAS1 ou FoxP2 et NPAS1 nous permettraient de confirmer notre hypothèse.

Le dernier groupe identifié exprime uniquement le facteur de transcription Nkx2.1 (14%). Il pourrait être très hétérogène et regrouper des neurones GABAergiques qui expriment la calbindine (CB) (2%) ou la calrétinine (CR) (1%) (Cooper & Stanford 2002 , Domaradzka-Pytel et al 2007), mais aussi des neurones cholinergiques (5%) du noyau basal de Meynert (Gritti et al 2006). Cette dernière population est localisée dans la partie ventrale du GP. Les neurones de ce groupe proviendraient majoritairement de la MGE mais aussi de la POA (Nobrega-Pereira et al 2010). Ainsi, il est fort probable qu'une étude plus approfondie révèle l'existence de plusieurs sous-populations neuronales à l'intérieur du groupe Nkx2.1.Cette population neuronale mériterait d'être étudiée d'une manière plus approfondie afin de différencier et de classer les différents sous-types neuronaux qui la composent. Une stratégie alternative à l'immunocytochimie pourrait être la PCR multiplexe sur neurone unique, qui pourrait être combinée à l'électrophysiologie, le contenu du cytoplasme étant prélevé à l'aide de la pipette d'enregistrement. L'avantage de la PCR sur cellule unique est que cette technique permet de détecter simultanément plusieurs marqueurs mais son principal inconvénient est l'obligation d'enregistrer le neurone en configuration cellule entière, ce qui peut altérer le patron d'activité du neurone enregistré.

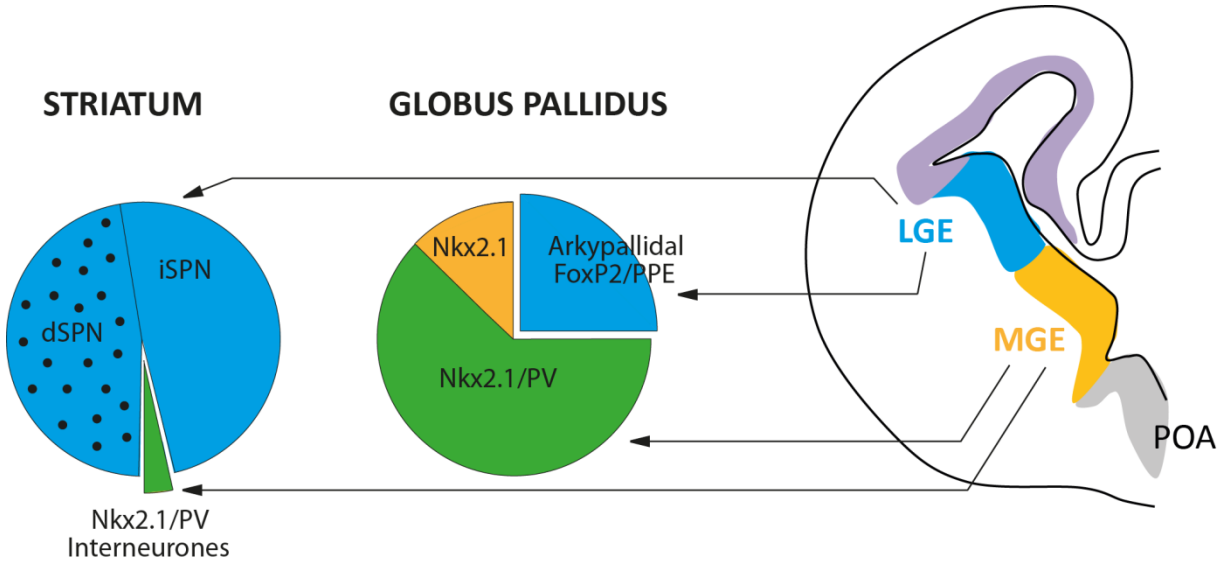


Figure 38 : Analogie entre l'origine embryonnaire des populations neuronales striatales et pallidales.

Il est aussi intéressant de noter que d'un point de vue embryonnaire, la population arkypallidale (FoxP2/PPE-positive) provient de la LGE tout comme les neurones de projections striataux qui sont aussi caractérisés par l'expression de FoxP2 (Deacon et al 1994 , Olsson et al 1998, Takahashi et al 2003) alors que les deux autres populations de neurones pallidaux (PV/Nkx2.1- et Nkx2.1- positfs) proviennent de la MGE qui est aussi la source des interneurones striataux de type « fast-spiking » qui expriment Nkx2.1 et la PV eux aussi (Marin et al 2000) ; **Figure 38**) et partagent certaines caractéristiques électrophysiologiques telles qu'une capacité à décharger à des fréquences élevées.

II. Classification électrophysiologique au sein du Globus Pallidus

De nombreuses études ont essayé de classer les neurones du GP selon leurs propriétés électrophysiologiques (Bugaysen et al 2010, Cooper & Stanford 2000, Nambu & Llinas 1994 , Nambu & Llinas 1997). Chaque étude propose sa propre classification, ce qui rend difficile de faire le lien entre ces différents travaux. Mais toutes concluent en faveur de l'existence de 3 sous-types neuronaux dans le GP. Récemment, l'existence de ces 3 sous-populations a été remise en cause par les travaux de deux équipes (Deister et al 2013, Gunay et al 2008), toutes deux affirmant qu'il est impossible de classer les neurones du GP selon leurs propriétés intrinsèques en raison de la variabilité électrophysiologique qui existe au sein de cette structure. Afin de réconcilier les données de la littérature, nous avons entrepris d'analyser les mêmes paramètres électrophysiologiques que les études antérieures mais plutôt que de nous baser sur ces seuls critères pour classer les neurones, nous avons identifié leurs profils neurochimiques. Comme les neurones PV- et FoxP2-positifs représentent 78% de la totalité des neurones du GP, nous avons utilisé ces deux marqueurs pour identifier les neurones dont nous avons enregistré les propriétés électrophysiologiques en patch-clamp. Il est à noter ici que nous sommes les seuls à avoir utilisé la configuration 'patch-perforé' qui est moins invasive que la configuration 'cellule entière' pour caractériser les propriétés intrinsèques des neurones du GP. Nous avons donc trouvé 3 groupes neurones, les neurones PV-positifs, les neurones FoxP2-positifs et ceux seulement marqués par la biocytine que nous avons appelé double-négatifs (DN).

Toutes nos expériences ont été réalisées avec des inhibiteurs de la transmission synaptique afin que les propriétés intrinsèques des neurones du GP ne soient pas modifiées par l'activité synaptique qui est préservée dans les tranches. Dans ces conditions, nous avons trouvé que les neurones PV-positifs sont des neurones qui déchargent avec la fréquence plus élevée et la plus régulière. A l'inverse, les neurones FoxP2-positifs déchargent avec une fréquence significativement plus faible et de manière irrégulière. Bien que globalement les paramètres du potentiel d'action soient identiques entre les trois groupes neuronaux, nous avons trouvé que les neurones FoxP2 possèdent une AHP plus importante que celle des neurones PV-positifs et DN, ce qui peut expliquer que ces neurones déchargent avec une fréquence plus faible car la dépolarisation inter-spike va mettre plus de temps pour atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action. Ce résultat suggère que les neurones FoxP2-positifs possèdent soit des canaux potassiques que les deux autres groupes n'expriment pas, soit une densité de canaux potassiques plus importante, comme le proposent Gunay et collègues (Gunay et al 2008). Un autre critère distinctif de ces neurones PV- et FoxP2-positifs est leur réponse à des créneaux dépolarisants, les neurones PV-positifs étant capables de décharger à des fréquences beaucoup plus élevées que les neurones FoxP2. Ceci signifie que ces deux types neuronaux vont intégrer l'information synaptique de manière distincte.

Ensuite, nous avons étudié les canaux HCN qui caractérisent le courant I_H ou I_f (f pour funny) décrit pour la première fois dans des cellules du nœud sinusal du cœur (Noma & Irisawa 1976). Ce courant contribue à de nombreuses propriétés et fonctions physiologiques telles que l'activité "pacemaker" de certains neurones, le contrôle du potentiel membranaire et l'intégration dendritique des entrées synaptiques. Il s'agit d'un courant entrant, de conductance mixte Na+ et K+ qui est activé par l'hyperpolarisation. Nous avons trouvé que les neurones FoxP2-positifs présentent un sag qui est de plus grande amplitude que celui des neurones PV-positifs lors de créneaux de courants de -100 pA (**Figure 27G-H**). En revanche, tous les neurones PV-positifs que nous avons enregistrés présentent des propriétés de rebond post-inhibiteur alors que la moitié de nos neurones FoxP2-positifs sont doués de telles propriétés et les 50% restants présentent un retard à la décharge qui pourrait être dû aux canaux de type I_A et I_D. Les courant I_A ont pour conséquence de diminuer la fréquence des potentiels d'action en ralentissant le retour au seuil d'activation des canaux sodiques. Ils possèdent donc un filtre des signaux

excitateurs en retardant l'apparition du potentiel d'action (Debanne et al 1997). Cette hypothèse est en accord avec nos résultats car les neurones FoxP2-positifs présentent une fréquence de décharge plus faible que les neurones PV-positifs qui ne présentent pas de retard à la décharge.

En comparant l'ensemble des propriétés des neurones PV-positifs et FoxP2-positifs, il apparait que ces deux populations correspondent aux deux exemples extrêmes décrits dans l'étude de Gunay et collaborateurs (Gunay et al 2008). Ceci suggère que si on tient compte de leur identité neurochimique, ces deux types neuronaux forment deux clusters distincts. Ainsi nos données de patch-perforé suggèrent bien l'existence d'une diversité électrophysiologique au sein du GP. Afin d'obtenir ces deux types d'activité électrophysiologique extrême, Gunay et collaborateurs ont fait varier la densité des canaux ioniques dans leur modèle. En nous basant sur leur étude, nous avons identifié 2 canaux potentiel-dépendents, INaP, HCN, dont des différences d'expression pourraient expliquer la différence d'excitabilité entre les neurones PV et FoxP2. Nos expériences de potentiel imposé nous ont permis de montrer que les neurones PV-positifs ont des courants INaP deux fois plus grands que les neurones FoxP2-positifs sans que les propriétés d'activation de ces canaux diffèrent entre les deux groupes de neurones. Ce résultat est en accord avec le modèle de Gunay et collègues. Bien que nous n'ayons pas testé les propriétés des autres conductances ioniques il est fort probable que des différences d'expression d'autres canaux soient responsables des différences de propriétés intrinsèques des neurones PV- et FoxP2-positifs.

Pour le groupe des neurones DN, qui correspond probablement aux neurones Nk2.1-positifs, nous montrons que cette population présente des propriétés semblables à celles des neurones PV-positifs, du moins dans nos expériences de patch-perforé.

La publication récente du groupe de C. Wilson (Deister et al 2013) suggérant que l'activité des neurones du GP varie dans le temps nous a obligé à dupliquer leurs expériences, afin de déterminer si cette variabilité était vraie pour les trois groupes de neurones que nous avions caractérisés en patch-perforé. Ainsi, nous avons réalisé des enregistrements de longue durée (> à 20 minutes) en configuration cellule attachée. Nous avons trouvé que certains neurones du GP présentaient une grande variabilité dans leur fréquence de décharge au cours du temps, ce qui est en accord avec cette étude. Une fois classés en fonction de leur profil neurochimique, il nous est apparu que les neurones PV-positifs avaient une activité de décharge

extrêmement régulière au cours du temps alors que les neurones FoxP2-positifs avaient tous une activité irrégulière. Les neurones DN se situent entre ces deux extrêmes.

Pour résumer, nos résultats d'électrophysiologie montrent qu'il existe trois populations neuronales dans le GP, les groupes PV-positifs et DN ayant des propriétés très similaires. Le groupe FoxP2-positif en revanche se distingue des deux autres, de par la faible fréquence et l'irrégularité de leur décharge, une courbe f/I plutôt linéaire et une différence de densité de canaux sodiques responsables du courant INaP. Nos données montrent, de plus, que pour définir l'identité des neurones du GP, il est nécessaire de corréler propriétés électrophysiologiques et profils neurochimiques des neurones. Enfin, nos résultats suggèrent que la différence d'activité des neurones GP-TI (PV-positifs) et GP-TA (PPE/FoxP2-positifs) repose en partie du moins, sur des propriétés intrinsèques distinctes. Nous pouvons également suggérer que les neurones HFP et LFB décrits chez le singe éveillé dans la littérature (DeLong 1971 , Matsumura et al 1995) correspondent respectivement aux neurones PV- et FoxP2-positifs.

Nos résultats montrent pour la première fois une corrélation entre la présence d'un marqueur neuronal et ses propriétés électrophysiologiques au niveau du GP, appuyant l'existence d'une diversité neuronale au sein de ce noyau.

La question de la régulation dopaminergique de l'excitabilité des neurones du GP est aussi une question critique. Nous avons entrepris des expériences préliminaires afin de tester l'effet d'un agoniste D2 sur l'activité des neurones PV et FoxP2. Bien que nos données nécessitent d'être complétées, elles suggèrent que l'activation des récepteurs D2 a un effet uniquement sur l'excitabilité des neurones FoxP2-positifs, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Hoover & Marshall 2002). La stimulation des récepteurs de type D2 a pour effet une augmentation de l'excitabilité des neurones FoxP2-positifs. Une autre étude *in vitro* a montré que les récepteurs D2 modulent de manière négative les courants calciques de type CaV2.2 (Stefani et al 2002). Ces canaux étant couplés aux canaux potassiques de type SK, il est possible que, comme au niveau du NST, leur inhibition par les récepteurs D2 entraine la fermeture des canaux SK (Ramanathan et al 2008)) et augmente la fréquence de décharge des neurones du GP. Cette modulation différentielle par la dopamine au niveau du GP vient compléter la liste des différences

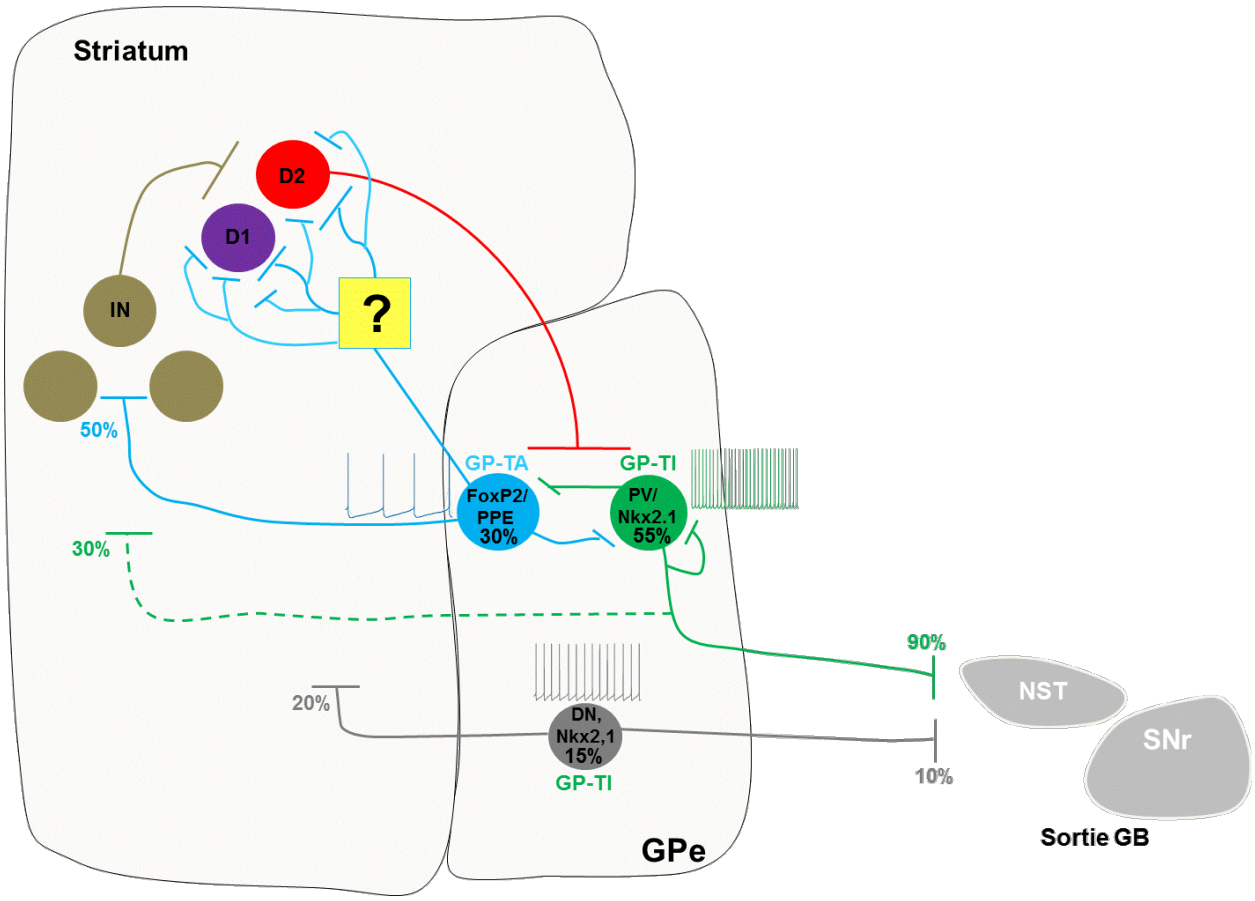


Figure 39 : Schéma des projections des 3 populations neuronales identifiées dans le GP.

Les neurones PV-positifs (représentés en vert) projettent essentiellement (en majorité) sur les structures en aval des GB comme le NST. Une faible proportion de neurones PV-positifs projette sur le striatum. Les neurones FoxP2-positifs (en bleu) projettent uniquement sur le striatum. La population des Doubles Négatifs (en gris) projettent à la fois sur le striatum et sur les noyaux de sorties des GB.

entre les neurones PV et FoxP2.

III. Innervation différentielle des neurones du Globus Pallidus au sein du réseau des ganglions de la base

La mise en évidence des neurones PPE-positifs ou arkypallidaux dont l'une des caractéristiques est de projeter uniquement sur le striatum a été réalisée chez un modèle rongeur de la maladie de Parkinson (Mallet et al 2012). Ainsi, il est nécessaire de montrer que cette caractéristique est constitutive du système en situation physiologique et non pas la conséquence de la déplétion dopaminergique. Nous avons donc réalisé des expériences de traçage rétrograde couplées à de l'immunohistochimie afin d'analyser les structures ciblées par les neurones PV-positifs, FoxP2-positifs et DN (Nkx2.1+/PV-). Nos résultats ont confirmé ceux publiés pour le rat 6-OHDA (Mallet et al 2012) indiquant que la projection des neurones arkypallidaux sur le striatum existe aussi en condition physiologique et que ces neurones expriment aussi FoxP2. Nous avons aussi montré qu'une faible proportion des neurones PV-positifs projettent à la fois sur le NST et sur le striatum, innervant probablement de manière préférentielle les interneurones GABAergiques du striatum (Bevan et al 1997). Les neurones exprimant uniquement Nkx2.1 projettent eux-aussi à la fois sur le striatum et sur le NST. Ainsi, alors que la voie pallido-subthalamique est constituée des neurones Nkx2.1-positifs (Nkx2.1+/PV+ et Nkx2.1+/PV-), la voie pallido-striatale bien qu'impliquant principalement les neurones arkypallidaux, comprend aussi un contingent de collatérales d'axones des neurones Nkx2.1+/PV+ et Nkx2.1+/PV- (**Figure 39**).

Alors que jusqu'à présent la boucle entre le GP et le NST était considérée comme complètement réciproque, il s'avère maintenant que seule la population GP-TI (PV+ et Nkx2.1+/PV-) projette sur le NST. D'après nos expériences de modélisation sur la sélection d'action par le réseau des ganglions de la base, il semble que cette architecture soit en fait optimale (**Figure 36B**) pour que le réseau GP-NST calcule de manière optimale la sélection d'une action motrice.

IV. Diversité neuronale dans le Globus Pallidus et initiation du mouvement

Après avoir trouvé des différences au niveau des propriétés membranaires et des projections entre les neurones PV- et FoxP2-positifs, nous avons entrepris d'étudier leur rôle dans le mouvement volontaire. Nous avons utilisé une approche optogénétique avec une stratégie Cre-lox pour inhiber et activer spécifiquement chez l'animal vigile et libre de ses mouvements les neurones PV-positifs.

Nous avons tout d'abord confirmé que les propriétés électrophysiologiques des neurones PV-positifs des souris PV-Ai9 (souris transgéniques qui expriment un fluorophore rouge, la dtomato (dt), uniquement dans les neurones qui expriment la PV) étaient similaires à celles observées chez le rat et différentes de celles des neurones dt-. Ainsi les neurones dt+ (PV-positifs) de la souris présentent les mêmes caractéristiques que celles du rat, à savoir une fréquence élevée de décharge, une courbe f/I d'aspect sigmoïde, un sag d'amplitude modérée et la capacité à faire des rebonds post-inhibiteurs. En comparant les données chez le rat, et la souris, nous avons trouvé moins de différences entre les groupes dt+ et dt- qu'entre les groupes PV-positifs et FoxP2-positifs. Ceci peut s'expliquer par l'hétérogénéité du groupe des neurones dt- qui comprend à la fois les neurones PPE-/FoxP2- positifs en plus du groupe de neurones DN (Nkx2.1+/PV-).

A. Validation de l'outil optogénétique *in vitro*

Avant de moduler les neurones PV-positifs chez des souris *in vivo*, nous avons réalisé des expériences de validation *in vitro.* Nous avons testé l'effet de la photo-activation et de la photo-inhibition de ces neurones. La photo-activation des neurones PV-positifs entraine une augmentation de leur fréquence de décharge de près de 300%. Leur photo-inhibition entraine, elle, une chute de leur fréquence de décharge de 80%. La modulation lumineuse apparait donc extrêmement efficace. Ces expériences valident donc notre stratégie visant à manipuler l'activité d'une sous-population neuronale du GP et d'en tester l'impact sur le comportement moteur de l'animal.

B. Modulation bilatérale des neurones PV du GP

Nos expériences de stimulation lumineuse bilatérale n'ont pas mis en évidence d'effet significatif sur l'ambulation des animaux. Le modèle classique des ganglions de la base, que nous pourrions appliquer aux neurones PV-positifs du GP en raison de leur projection sur le NST, prédit que leur activation est favorable tandis que leur inactivation est défavorable au mouvement. Cependant, dans la boucle réciproque GP-NST, la projection des neurones PV-positifs sur la SNr n'est pas prise en compte par le modèle. De plus, une activation bi-latérale s'oppose probablement à la sélection de l'action. Ce résultat est néanmoins surprenant comparé aux données de la littérature (Durieux et al 2009 , Kravitz et al 2010), puisque l'activation bi-latérale des neurones striataux de la voie indirecte (qui doit revenir à inhiber le GP comme nous l'avons fait avec ArchT), provoque une inhibition de l'activité locomotrice, résultats que nous n'avons pas réussi à obtenir avec l'inhibition directe des neurones PV-positifs du GP par ArchT.

C. Modulation unilatérale des neurones PV du GP

Nos expériences de stimulations optiques unilatérales ont donné des résultats plus probants, puisque toutes les souris testées avec ChR2 ou NpHR ont vu leur comportement moteur modifié par la stimulation lumineuse. Ainsi lors de stimulations continues de 30s, nous avons quantifié une asymétrie motrice en comptant les rotations initiées par les animaux et en les comparants avec la situation sans stimulation optique. Le premier résultat intéressant repose sur le fait que l'activation et l'inhibition de l'activité des neurones PV du GP entrainent un comportement rotatoire opposé chez les souris testées, ce qui valide l'action spécifique de ChR2 et ArchT.

L'activation des neurones PV-positifs du GP par ChR2 entraine des rotations contra-latérales alors que leur inhibition par ArchT entraine des rotations ipsi-latérales. Ces résultats sont en accord avec le même type d'expériences réalisées au niveau du striatum. En effet, la stimulation unilatérale des neurones striataux de la voie indirecte avec ChR2 entraine des rotations ipsi-latérales au côté stimulé (Kravitz et al 2010), de même que l'inhibition des neurones du GP avec ArchT. Cette expérience est aussi en accord avec une autre étude, où cette fois la population de neurones PV-positifs du GP a été déconnectée du reste du réseau grâce à l'expression dans

ces neurones de la chaine légère de la toxine tétanique (TeLC), ce qui a pour conséquence de bloquer la libération de GABA par ces neurones et donc de les inhiber (Murray et al 2011). Cette manipulation a pour conséquence comportementale d'induire des rotations ipsi-latérales.

Ici, Il est intéressant de noter que l'inhibition des neurones PV-positifs du GP (qui revient à désinhiber le NST et activer la voie indirecte) mime l'effet d'une déplétion unilatérale en dopamine (Da Cunha et al 2008 , Schwarting & Huston 1996), ce qui est donc en accord avec le modèle anatomo-fonctionnel d'Alexander et Crutcher (Alexander & Crutcher 1990).

Il serait aussi extrêmement intéressant de stimuler l'activité des neurones PV-positifs du GP chez une souris hémi-parkinsonienne afin de déterminer si cette manipulation permettrait de restaurer un comportement moteur normal chez l'animal tout comme c'est le cas lors de l'activation des neurones striataux de la voie directe (Kravitz et al 2010).

Dans leur ensemble, ces résultats montrent que les neurones PV-positifs du GP correspondent à la population neuronale pallidale prototypique de la voie indirecte, tel que prédit le modèle anatomo-fonctionnel des ganglions de la base. De plus, nous montrons que la manipulation d'une sous-population neuronale du GP suffit à affecter le comportement moteur chez la souris. Il serait maintenant nécessaire de dupliquer ces expériences en manipulant cette fois la population FoxP2 pallido-striatale afin de mieux cerner son rôle dans le contrôle de l'exécution du mouvement.

D. Perspectives

Nos résultats confirment l'existence d'une dichotomie fonctionnelle au sein du GP et montrent de plus que cette dichotomie est aussi embryonnaire, neurochimique, électrophysiologique et structurale. Cette nouvelle complexité au niveau du GP appelle à une ré-évaluation du rôle de ce noyau dans le contrôle du mouvement. La découverte de la population de neurones arkypallidaux ouvre de nouveaux axes de recherche afin de mieux comprendre comment cette population influence l'activité du reste du réseau des ganglions de la base.

1. Caractérisation de la voie arkypallido-striatale.

Il a été établi que les neurones GP-TA (PPE/FoxP2) innerve massivement le striatum (Mallet et al 2012) et que tous les types neuronaux striataux (interneurones et neurones de projections) sont ciblés par les axones des neurones arkypallidaux. Ainsi déterminer si les neurones arkypallidaux ciblent préférentiellement les neurones striataux de projection de la voie directe (dSPN) ou de la voie indirecte est une question extrêmement importante afin de comprendre comment cette population influence l'activité striatale (**Figure 39**). Les neurones arkypallidaux expriment la PPE, il serait aussi intéressant de tester l'action neuromodulatrice de ce neuropeptide sur les neurones striataux.

Pour étudier cette voie de manière spécifique, il est nécessaire d'utiliser l'optogénétique et des souris transgéniques permettant une expression ciblée de la channelrhodopsine dans les neurones arkypallidaux. Nos données suggérant que ces neurones proviennent de la LGE, nous proposons d'utiliser les lignées de souris transgéniques Pax6-cre ou Mash1-cre, deux des facteurs de transcription spécifiques de la LGE. Ainsi l'injection de vecteurs AAV-ChR2 Cre-dépendent dans le GP nous permettra de transfecter spécifiquement la population arkypallidale. En croisant ces souris avec la lignée D1-eGFP (lignée présente au laboratoire), il nous sera possible de patcher soit les neurones de la voie directe (fluorescents) ou ceux de la voie indirecte et de caractériser les propriétés des synapses arkypallido-striatales grâce à des flashs de lumière.

2. Impact d'une déplétion dopaminergique sur l'excitabilité des neurones PV et FoxP2.

En condition physiopathologique, l'hypoactivité du GP est prédite et expliquée dans le modèle d'Alexander et Crutcher par une hyperactivité des neurones du striatum qui vont inhiber de manière massive les neurones du GP et ainsi réduire leur fréquence de décharge.

De plus, il a été montré *in vitro* et en condition de déplétion dopaminergique, qu'une forte proportion des neurones du GP deviennent silencieux (Miguelez et al 2012) en raison d'une réduction de l'expression des canaux HCN qui sont nécessaires au maintien de leur activité pacemaker (Chan et al 2011). Alors que pour le reste d'entre eux, leur excitabilité semble accrue (Miguelez et al 2012) suggérant une altération bi-directionnelle de l'excitabilité des neurones du GP en situation parkinsonienne. Afin

de mieux comprendre le rôle des neurones GP-TI et GP-TA dans l'émergence d'activités pathologiques dans le réseau des GB, déterminer les changements d'excitabilité induits par une déplétion dopaminergique au niveau de ces deux types neuronaux est nécessaire.

Pour cela, il suffirait de comparer les propriétés intrinsèques des neurones dt+ et dt- des lignées PV-Ai9 et Nkx2.1-Ai9 entre des groupes de souris naïves et des groupes de souris parkinsoniennes.

3. Caractérisation de l'activité des neurones PV et FoxP2 au cours de l'exécution du mouvement.

Une première étape pour comprendre la fonction des deux populations neuronales dans le contrôle du mouvement est tout d'abord d'enregistrer leur activité électrophysiologique chez l'animal vigile lors de l'exécution d'une tâche motrice. Les quelques études au cours desquelles l'activité des neurones des ganglions de la base ont été enregistrés au cours d'une tâche motrice ont nécessité un apprentissage de plusieurs mois chez le rongeur (Gage et al 2010 , Schmidt et al 2013). Le test du « single pellet reaching test » (SRT ; (Metz & Whishaw 2000) est un test simple à mettre en œuvre qui présente l'avantage d'être similaire d'un point de vue phylogénétique chez l'homme et le rongeur (Klein et al 2012). Celui consiste à placer un animal dans une boîte opérante avec une petite ouverture permettant à l'animal d'attraper une pellette de nourriture. En implantant des tétrodes au niveau du GP, il serait alors possible d'enregistrer l'activité des différentes populations de ce noyau au cours d'une séquence de prise de nourriture. Au cours de ma thèse, j'ai pu apprendre à implanter des souris avec des optrodes pour manipuler l'activité des neurones PV du GP grâce à la collaboration que nous avons établi avec le Dr Herry du Neurocentre Magendie à Bordeaux. Enregistré l'activité des neurones du GP semble donc une étape logique afin de comprendre le rôle de ce noyau dans le contrôle du mouvement.

Une fois ce test mis au point, il nous sera possible de manipuler via l'optogénétique l'activité des neurones GP-TI (en utilisant la lignée transgénique PV-Ai9) ou celle des neurones GP-TA (en utilisant la lignée Pax6-Cre ou Mash1-Cre) et ainsi comprendre un peu mieux comment ces deux types cellulaires participent au contrôle du mouvement.

Bibliographie

Bibliographie

Agid Y. 1991. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 337: 1321-4

Agid Y, Javoy F, Glowinski J. 1973. Hyperactivity of remaining dopaminergic neurones after partial destruction of the nigro-striatal dopaminergic system in the rat. *Nature: New biology* 245: 150-1

Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences* 12: 366-75

Aldridge JW, Gilman S, Dauth G. 1990. Spontaneous neuronal unit activity in the primate basal ganglia and the effects of precentral cerebral cortical ablations. *Brain research* 516: 46-56

Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences* 13: 266-71

Araki KY, Sims JR, Bhide PG. 2007. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain research* 1156: 31-45

Arkadir D, Morris G, Vaadia E, Bergman H. 2004. Independent coding of movement direction and reward prediction by single pallidal neurons. *J Neurosci* 24: 10047-56

Arluison M, Dietl M, Thibault J. 1984. Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry: a topographical study. *Brain Res Bull* 13: 269-85

Bar-Gad I, Bergman H. 2001. Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Current opinion in neurobiology* 11: 689-95

Baranauskas G, Tkatch T, Surmeier DJ. 1999. Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 K(+) channels. *J Neurosci* 19: 6394-404

Beckstead RM. 1983. A pallidostriatal projection in the cat and monkey. *Brain Res Bull* 11: 629-32

Benhamou L, Bronfeld M, Bar-Gad I, Cohen D. 2012. Globus Pallidus external segment neuron classification in freely moving rats: a comparison to primates. *PLoS One* 7: e45421

Bennett BD, Bolam JP. 1993a. Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain research* 609: 137-48

Bennett BD, Bolam JP. 1993b. Two populations of calbindin D28k-immunoreactive neurones in the striatum of the rat. *Brain research* 610: 305-10

Bergstrom DA, Walters JR. 1984. Dopamine attenuates the effects of GABA on single unit activity in the globus pallidus. *Brain research* 310: 23-33

Bertran-Gonzalez J, Herve D, Girault JA, Valjent E. 2010. What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Frontiers in neuroanatomy* 4

Beurrier C, Bioulac B, Hammond C. 2000. Slowly inactivating sodium current (I(NaP)) underlies single-spike activity in rat subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 83: 1951-7

Bevan MD, Clarke NP, Bolam JP. 1997. Synaptic integration of functionally diverse pallidal information in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 17: 308-24

Bevan MD, Magill PJ, Hallworth NE, Bolam JP, Wilson CJ. 2002a. Regulation of the timing and pattern of action potential generation in rat subthalamic neurons in vitro by GABA-A IPSPs. *J Neurophysiol* 87: 1348-62

Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ. 2002b. Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends in neurosciences* 25: 525-31

Bevan MD, Wilson CJ. 1999. Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci* 19: 7617-28

Bevan MD, Wilson CJ, Bolam JP, Magill PJ. 2000. Equilibrium potential of GABA(A) current and implications for rebound burst firing in rat subthalamic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 83: 3169-72

Bezard E, Boraud T, Bioulac B, Gross CE. 1997. Compensatory effects of glutamatergic inputs to the substantia nigra pars compacta in experimental parkinsonism. *Neuroscience* 81: 399-404

Bolam JP, Smith Y. 1992. The striatum and the globus pallidus send convergent synaptic inputs onto single cells in the entopeduncular nucleus of the rat: a double anterograde labelling study combined with postembedding immunocytochemistry for GABA. *J Comp Neurol* 321: 456-76

Bolam JP, Smith Y, Ingham CA, von Krosigk M, Smith AD. 1993. Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus. *Progress in brain research* 99: 73-88

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience* 8: 1263-8

Brog JS, Zahm DS. 1996. Morphologically distinct subpopulations of neurotensin-immunoreactive striatal neurons observed in rat following dopamine depletions and D2 receptor blockade project to the globus pallidus. *Neuroscience* 74: 805-12

Bugaysen J, Bronfeld M, Tischler H, Bar-Gad I, Korngreen A. 2010. Electrophysiological characteristics of globus pallidus neurons. *PLoS One* 5: e12001

Calne DB, Kebabian J, Silbergeld E, Evarts E. 1979. Advances in the neuropharmacology of Parkinsonism. *Annals of internal medicine* 90: 219-29

Camps M, Kelly PH, Palacios JM. 1990. Autoradiographic localization of dopamine D 1 and D 2 receptors in the brain of several mammalian species. *Journal of neural transmission. General section* 80: 105-27

Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA. 1990. Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain research* 513: 43-59

Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, et al. 2011. HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 14: 85-92

Chan CS, Shigemoto R, Mercer JN, Surmeier DJ. 2004. HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *J Neurosci* 24: 9921-32

Chang HT, Wilson CJ, Kitai ST. 1981. Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Science* 213: 915-8

Charara A, Parent A. 1994. Brainstem dopaminergic, cholinergic and serotoninergic afferents to the pallidum in the squirrel monkey. *Brain research* 640: 155-70

Chen L, Savio Chan C, Yung WH. 2004. Electrophysiological and behavioral effects of zolpidem in rat globus pallidus. *Experimental neurology* 186: 212-20

Chen L, Yung WH. 2004. GABAergic neurotransmission in globus pallidus and its involvement in neurologic disorders. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 56: 427-35

Chevalier G, Deniau JM. 1990. Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends in neurosciences* 13: 277-80

Christophe E, Doerflinger N, Lavery DJ, Molnar Z, Charpak S, Audinat E. 2005. Two populations of layer v pyramidal cells of the mouse neocortex: development and sensitivity to anesthetics. *J Neurophysiol* 94: 3357-67

Chrobak JJ, Napier TC. 1993. Opioid and GABA modulation of accumbens-evoked ventral pallidal activity. *Journal of neural transmission. General section* 93: 123-43

Chuhma N, Tanaka KF, Hen R, Rayport S. 2011. Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *J Neurosci* 31: 1183-92

Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, Sunahara R, Hartney A, et al. 2000. Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* 37: 125-45

Cooper AJ, Stanford IM. 2000. Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone in vitro. *J Physiol* 527 Pt 2: 291-304

Cooper AJ, Stanford IM. 2001. Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41: 62-71

Cooper AJ, Stanford IM. 2002. Calbindin D-28k positive projection neurones and calretinin positive interneurones of the rat globus pallidus. *Brain research* 929: 243-51

Corcoran KA, Quirk GJ. 2007. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci* 27: 840-4

Cossette M, Levesque M, Parent A. 1999. Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neuroscience research* 34: 51-4

Costall B, Naylor RJ, Olley JE. 1972. Stereotypic and anticataleptic activities of amphetamine after intracerebral injections. *European journal of pharmacology* 18: 83-94

Da Cunha C, Wietzikoski EC, Ferro MM, Martinez GR, Vital MA, et al. 2008. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behavioural brain research* 189: 364-72

Deacon TW, Pakzaban P, Isacson O. 1994. The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain research* 668: 211-9

Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM. 1997. Action-potential propagation gated by an axonal I(A)-like K+ conductance in hippocampus. *Nature* 389: 286-9

Debeir T, Ginestet L, Francois C, Laurens S, Martel JC, et al. 2005. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental neurology* 193: 444-54

Deister CA, Dodla R, Barraza D, Kita H, Wilson CJ. 2013. Firing rate and pattern heterogeneity in the globus pallidus arise from a single neuronal population. *J Neurophysiol* 109: 497-506

DeLong MR. 1971. Activity of pallidal neurons during movement. *J Neurophysiol* 34: 414-27

DeLong MR. 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* 13: 281-5

DeLong MR, Wichmann T. 2007. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of neurology* 64: 20-4

Deng YP, Lei WL, Reiner A. 2006. Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *Journal of chemical neuroanatomy* 32: 101-16

Deniau JM, Hammond C, Chevalier G, Feger J. 1978. Evidence for branched subthalamic nucleus projections to substantia nigra, entopeduncular nucleus and globus pallidus. *Neurosci Lett* 9: 117-21

Deschenes M, Bourassa J, Doan VD, Parent A. 1996. A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *The European journal of neuroscience* 8: 329-43

Difiglia M, Pasik P, Pasik T. 1982. A Golgi and ultrastructural study of the monkey globus pallidus. *J Comp Neurol* 212: 53-75

Difiglia M, Rafols JA. 1988. Synaptic organization of the globus pallidus. *Journal of electron microscopy technique* 10: 247-63

Divac I, Mogensen J, Marinkovic S, Martensson R. 1987. On the projections from the neostriatum to the cerebral cortex: the "displaced" neurons. *Neuroscience* 21: 197-205

Do MT, Bean BP. 2003. Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation. *Neuron* 39: 109-20

Domaradzka-Pytel B, Majak K, Spodnik J, Olkowicz S, Turlejski K, et al. 2007. Distribution of the parvalbumin, calbindin-D28K and calretinin immunoreactivity in globus pallidus of the Brazilian short-tailed opossum (Monodelphis domestica). *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67: 421-38

Durieux PF, Bearzatto B, Guiducci S, Buch T, Waisman A, et al. 2009. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nature neuroscience* 12: 393-5

Elias S, Joshua M, Goldberg JA, Heimer G, Arkadir D, et al. 2007. Statistical properties of pauses of the high-frequency discharge neurons in the external segment of the globus pallidus. *J Neurosci* 27: 2525-38

Fallon JH, Moore RY. 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180: 545-80

Falls WM, Park MR, Kitai ST. 1983. An intracellular HRP study of the rat globus pallidus. II. Fine structural characteristics and synaptic connections of medially located large GP neurons. *J Comp Neurol* 221: 229-45

Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, Morrisey EE, Walsh CA. 2003. Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J Comp Neurol* 460: 266-79

Filion M, Tremblay L. 1991. Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain research* 547: 142-51

Fisher RS, Boylan MK, Hull CD, Buchwald NA, Levine MS. 1985. Branched projections of pallidal and peripallidal neurons to neocortex and neostriatum: a double-labeling study in the cat. *Brain research* 326: 156-9

Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marin O. 2007. Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27: 9682-95

Fletcher GH, Starr MS. 1987. Behavioural evidence for the functionality of D-2 but not D-1 dopamine receptors at multiple brain sites in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *European journal of pharmacology* 138: 407-11

Francois C, Percheron G, Yelnik J, Heyner S. 1984. A Golgi analysis of the primate globus pallidus. I. Inconstant processes of large neurons, other neuronal types, and afferent axons. *J Comp Neurol* 227: 182-99

Fujimoto K, Kita H. 1993. Response characteristics of subthalamic neurons to the stimulation of the sensorimotor cortex in the rat. *Brain research* 609: 185-92

Gage GJ, Stoetzner CR, Wiltschko AB, Berke JD. 2010. Selective activation of striatal fast-spiking interneurons during choice execution. *Neuron* 67: 466-79

Galvan A, Floran B, Erlij D, Aceves J. 2001. Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *Journal of neural transmission* 108: 153-66

Galvan A, Villalba RM, West SM, Maidment NT, Ackerson LC, et al. 2005. GABAergic modulation of the activity of globus pallidus neurons in primates: in vivo analysis of the functions of GABA receptors and GABA transporters. *J Neurophysiol* 94: 990-1000

Gardiner TW, Kitai ST. 1992. Single-unit activity in the globus pallidus and neostriatum of the rat during performance of a trained head movement. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 88: 517-30

Gatev P, Darbin O, Wichmann T. 2006. Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 21: 1566-77

Gauthier J, Parent M, Levesque M, Parent A. 1999. The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain research* 834: 228-32

Gelman DM, Marin O. 2010. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *The European journal of neuroscience* 31: 2136-41

Gerfen CR, Engber TM. 1992. Molecular neuroanatomic mechanisms of Parkinson's disease: a proposed therapeutic approach. *Neurologic clinics* 10: 435-49

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, et al. 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-32

Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB. 1995. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci* 15: 8167-76

Gerfen CR, Staines WA, Arbuthnott GW, Fibiger HC. 1982. Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 207: 283-303

Gritti I, Henny P, Galloni F, Mainville L, Mariotti M, Jones BE. 2006. Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline

acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience* 143: 1051-64

Groenewegen HJ, Berendse HW. 1990. Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *J Comp Neurol* 294: 607-22

Groenewegen HJ, Berendse HW, Haber SN. 1993. Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents. *Neuroscience* 57: 113-42

Grove EA, Domesick VB, Nauta WJ. 1986. Light microscopic evidence of striatal input to intrapallidal neurons of cholinergic cell group Ch4 in the rat: a study employing the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain research* 367: 379-84

Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265: 103-6

Gunay C, Edgerton JR, Jaeger D. 2008. Channel density distributions explain spiking variability in the globus pallidus: a combined physiology and computer simulation database approach. *J Neurosci* 28: 7476-91

Haber SN, Groenewegen HJ, Grove EA, Nauta WJ. 1985. Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato pallidofugal pathway. *J Comp Neurol* 235: 322-35

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 391: 85-100

Hammond C, Rouzaire-Dubois B, Feger J, Jackson A, Crossman AR. 1983. Anatomical and electrophysiological studies on the reciprocal projections between the subthalamic nucleus and nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat. *Neuroscience* 9: 41-52

Hammond C, Yelnik J. 1983. Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization. *Neuroscience* 8: 781-90

Hassani OK, Mouroux M, Feger J. 1996. Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72: 105-15

Hauber W, Fuchs H. 2000. Dopamine release in the rat globus pallidus characterised by in vivo microdialysis. *Behavioural brain research* 111: 39-44

Hauber W, Lutz S. 1999. Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behavioural brain research* 106: 143-50

Hauber W, Lutz S, Munkle M. 1998. The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. *Neuroscience* 86: 147-57

Hazrati LN, Parent A, Mitchell S, Haber SN. 1990. Evidence for interconnections between the two segments of the globus pallidus in primates: a PHA-L anterograde tracing study. *Brain research* 533: 171-5

Hedreen JC, DeLong MR. 1991. Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque. *J Comp Neurol* 304: 569-95

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, et al. 2005. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS biology* 3: e159

Hoover BR, Marshall JF. 1999. Population characteristics of preproenkephalin mRNA-containing neurons in the globus pallidus of the rat. *Neurosci Lett* 265: 199-202

Hoover BR, Marshall JF. 2002. Further characterization of preproenkephalin mRNA-containing cells in the rodent globus pallidus. *Neuroscience* 111: 111-25

Hoover BR, Marshall JF. 2004. Molecular, chemical, and anatomical characterization of globus pallidus dopamine D2 receptor mRNA-containing neurons. *Synapse* 52: 100-13

Horn R, Marty A. 1988. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *The Journal of general physiology* 92: 145-59

Huffman RD, Felpel LP. 1981. A microiontophoretic study of morphine on single neurons in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* 22: 195-9

Jan C, Francois C, Tande D, Yelnik J, Tremblay L, et al. 2000. Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, in MPTP-treated monkeys and in parkinsonian patients. *The European journal of neuroscience* 12: 4525-35

Jayaraman A. 1983. Topographic organization and morphology of peripallidal and pallidal cells projecting to the striatum in cats. *Brain research* 275: 279-86

Jiao Y, Sun Z, Lee T, Fusco FR, Kimble TD, et al. 1999. A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections. *Journal of neuroscience methods* 93: 149-62

Kaoru T, Liu FC, Ishida M, Oishi T, Hayashi M, et al. 2010. Molecular characterization of the intercalated cell masses of the amygdala: implications for the relationship with the striatum. *Neuroscience* 166: 220-30

Kato S, Inoue K, Kobayashi K, Yasoshima Y, Miyachi S, et al. 2007. Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains using a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein. *Human gene therapy* 18: 1141-51

Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, et al. 2011. A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. *Human gene therapy* 22: 197-206

Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, De La Calle A. 1998. Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 402: 353-71

Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A. 2000. Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100: 689-99

Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends in genetics : TIG* 9: 413-21

Kita H. 1994. Parvalbumin-immunopositive neurons in rat globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Brain research* 657: 31-41

Kita H, Chang HT, Kitai ST. 1983a. The morphology of intracellularly labeled rat subthalamic neurons: a light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 215: 245-57

Kita H, Chang HT, Kitai ST. 1983b. Pallidal inputs to subthalamus: intracellular analysis. *Brain research* 264: 255-65

Kita H, Kitai ST. 1987. Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260: 435-52

Kita H, Kitai ST. 1991. Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and responses to neostriatal, subthalamic and nigral stimulation. *Brain research* 564: 296-305

Kita H, Kitai ST. 1994. The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain research* 636: 308-19

Klein A, Sacrey LA, Whishaw IQ, Dunnett SB. 2012. The use of rodent skilled reaching as a translational model for investigating brain damage and disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36: 1030-42

Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, et al. 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466: 622-6

Kuo H, Chang HT. 1992. Ventral pallido-striatal pathway in the rat brain: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 321: 626-36

Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG. 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19: 7881-8

Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, et al. 1993. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8861-5

Lindvall O, Bjorklund A. 1979. Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain research* 172: 169-73

Lozano AM, Lang AE. 1998. Pallidotomy for Parkinson's disease. *Neurosurgery clinics of North America* 9: 325-36

Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, et al. 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* 13: 133-40

Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD. 2000. Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *J Neurosci* 20: 820-33

Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD. 2001. Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106: 313-30

Mallet N, Micklem BR, Henny P, Brown MT, Williams C, et al. 2012. Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron* 74: 1075-86

Mallet N, Pogosyan A, Marton LF, Bolam JP, Brown P, Magill PJ. 2008. Parkinsonian beta oscillations in the external globus pallidus and their relationship with subthalamic nucleus activity. *J Neurosci* 28: 14245-58

Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ. 1990. Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci* 10: 2587-600

Marin O, Anderson SA, Rubenstein JL. 2000. Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20: 6063-76

Marin O, Baker J, Puelles L, Rubenstein JL. 2002. Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 129: 761-73

Marin O, Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annual review of neuroscience* 26: 441-83

Maslowski RJ, Napier TC. 1991. Dopamine D1 and D2 receptor agonists induce opposite changes in the firing rate of ventral pallidal neurons. *European journal of pharmacology* 200: 103-12

Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, et al. 2009. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci* 29: 444-53

Matsumura M, Tremblay L, Richard H, Filion M. 1995. Activity of pallidal neurons in the monkey during dyskinesia induced by injection of bicuculline in the external pallidum. *Neuroscience* 65: 59-70

Maurice N, Deniau JM, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM. 1998. Prefrontal cortex-basal ganglia circuits in the rat: involvement of ventral pallidum and subthalamic nucleus. *Synapse* 29: 363-70

Mercer JN, Chan CS, Tkatch T, Held J, Surmeier DJ. 2007. Nav1.6 sodium channels are critical to pacemaking and fast spiking in globus pallidus neurons. *J Neurosci* 27: 13552-66

Metz GA, Whishaw IQ. 2000. Skilled reaching an action pattern: stability in rat (Rattus norvegicus) grasping movements as a function of changing food pellet size. *Behavioural brain research* 116: 111-22

Miguelez C, Morin S, Martinez A, Goillandeau M, Bezard E, et al. 2012. Altered pallido-pallidal synaptic transmission leads to aberrant firing of globus pallidus neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Physiol* 590: 5861-75

Millen KJ, Gleeson JG. 2008. Cerebellar development and disease. *Current opinion in neurobiology* 18: 12-9

Miller WCD, M.R. 1987. Altered tonic activity of neurons in the globus pallidus and subthalamic nucleus in the primate MPTP model of parkinsonism In *The basal ganglia II*, ed. JA Carpenter MB, pp. 415–27

Millhouse OE. 1986. Pallidal neurons in the rat. *J Comp Neurol* 254: 209-27

Mittmann T, Alzheimer C. 1998. Muscarinic inhibition of persistent Na+ current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 79: 1579-82

Moreno N, Gonzalez A, Retaux S. 2009. Development and evolution of the subpallium. *Seminars in cell & developmental biology* 20: 735-43

Morgan MA, LeDoux JE. 1995. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behavioral neuroscience* 109: 681-8

Moriizumi T, Nakamura Y, Kitao Y, Kudo M. 1987. Ultrastructural analyses of afferent terminals in the subthalamic nucleus of the cat with a combined degeneration and horseradish peroxidase tracing method. *J Comp Neurol* 265: 159-74

Mouroux M, Feger J. 1993. Evidence that the parafascicular projection to the subthalamic nucleus is glutamatergic. *Neuroreport* 4: 613-5

Murray AJ, Sauer JF, Riedel G, McClure C, Ansel L, et al. 2011. Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. *Nature neuroscience* 14: 297-9

Nadjar A, Brotchie JM, Guigoni C, Li Q, Zhou SB, et al. 2006. Phenotype of striatofugal medium spiny neurons in parkinsonian and dyskinetic nonhuman primates: a call for a reappraisal of the functional organization of the basal ganglia. *J Neurosci* 26: 8653-61

Nambu A, Llinas R. 1994. Electrophysiology of globus pallidus neurons in vitro. *J Neurophysiol* 72: 1127-39

Nambu A, Llinas R. 1997. Morphology of globus pallidus neurons: its correlation with electrophysiology in guinea pig brain slices. *J Comp Neurol* 377: 85-94

Nauta HJ, Cole M. 1978. Efferent projections of the subthalamic nucleus: an autoradiographic study in monkey and cat. *J Comp Neurol* 180: 1-16

Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A. 2000. Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *The European journal of neuroscience* 12: 4338-44

Ni Z, Gao D, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL, Benazzouz A. 2001. Effect of microiontophoretic application of dopamine on subthalamic nucleus neuronal activity in normal rats and in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. *The European journal of neuroscience* 14: 373-81

Nini A, Feingold A, Slovin H, Bergman H. 1995. Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 74: 1800-5

Nobrega-Pereira S, Gelman D, Bartolini G, Pla R, Pierani A, Marin O. 2010. Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *J Neurosci* 30: 2824-34

Noma A, Irisawa H. 1976. A time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 366: 251-8

Obeso JA, Rodriguez-Oroz M, Marin C, Alonso F, Zamarbide I, et al. 2004. The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology* 62: S17-30

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Arbizu J, Gimenez-Amaya JM. 2002. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 17: 51-5

Oertel WH, Nitsch C, Mugnaini E. 1984. Immunocytochemical demonstration of the GABA-ergic neurons in rat globus pallidus and nucleus entopeduncularis and their GABA-ergic innervation. *Advances in neurology* 40: 91-8

Olanow CW, Obeso JA. 2000. Preventing levodopa-induced dyskinesias. *Annals of neurology* 47: S167-76; discussion S76-8

Olsson M, Bjorklund A, Campbell K. 1998. Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence. *Neuroscience* 84: 867-76

Oorschot DE. 1996. Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol* 366: 580-99

Ossowska K, Smialowska M, Wolfarth S. 1983. A biphasic influence of globus pallidus lesions: spontaneous catalepsy followed by anticataleptic effect. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 19: 169-76

Parent A, Cicchetti F. 1998. The current model of basal ganglia organization under scrutiny. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 13: 199-202

Parent A, De Bellefeuille L. 1983. The pallidointralaminar and pallidonigral projections in primate as studied by retrograde double-labeling method. *Brain research* 278: 11-27

Parent A, Fortin M, Cote PY, Cicchetti F. 1996. Calcium-binding proteins in primate basal ganglia. *Neuroscience research* 25: 309-34

Parent A, Hazrati LN. 1995a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research. Brain research reviews* 20: 91-127

Parent A, Hazrati LN. 1995b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain research. Brain research reviews* 20: 128-54

Parent A, Smith Y. 1987a. Differential dopaminergic innervation of the two pallidal segments in the squirrel monkey (Saimiri sciureus). *Brain research* 426: 397-400

Parent A, Smith Y. 1987b. Organization of efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as revealed by retrograde labeling methods. *Brain research* 436: 296-310

Parent A, Smith Y, Filion M, Dumas J. 1989. Distinct afferents to internal and external pallidal segments in the squirrel monkey. *Neurosci Lett* 96: 140-4

Park MR, Falls WM, Kitai ST. 1982. An intracellular HRP study of the rat globus pallidus. I. Responses and light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 211: 284-94

Pasik P, Pasik T, Holstein GR, Hamori J. 1988. GABAergic elements in the neuronal circuits of the monkey neostriatum: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 270: 157-70

Paz JT, Deniau JM, Charpier S. 2005. Rhythmic bursting in the cortico-subthalamo-pallidal network during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci* 25: 2092-101

Percheron G, Yelnik J, Francois C, Fenelon G, Talbi B. 1994. [Informational analysis of the basal ganglia related system]. *Revue neurologique* 150: 614-26

Plenz D, Kital ST. 1999. A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400: 677-82

Rajakumar N, Elisevich K, Flumerfelt BA. 1994. The pallidostriatal projection in the rat: a recurrent inhibitory loop? *Brain research* 651: 332-6

Ramanathan S, Tkatch T, Atherton JF, Wilson CJ, Bevan MD. 2008. D2-like dopamine receptors modulate SKCa channel function in subthalamic nucleus neurons through inhibition of Cav2.2 channels. *J Neurophysiol* 99: 442-59

Richfield EK, Young AB, Penney JB. 1987. Comparative distribution of dopamine D-1 and D-2 receptors in the basal ganglia of turtles, pigeons, rats, cats, and monkeys. *J Comp Neurol* 262: 446-63

Rivera A, Trias S, Penafiel A, Angel Narvaez J, Diaz-Cabiale Z, et al. 2003. Expression of D4 dopamine receptors in striatonigral and striatopallidal neurons in the rat striatum. *Brain research* 989: 35-41

Robledo P, Feger J. 1990. Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain research* 518: 47-54

Rubin J, Terman D. 2000. Analysis of clustered firing patterns in synaptically coupled networks of oscillators. *Journal of mathematical biology* 41: 513-45

Ryan LJ, Clark KB. 1992. Alteration of neuronal responses in the subthalamic nucleus following globus pallidus and neostriatal lesions in rats. *Brain Res Bull* 29: 319-27

Sadek AR, Magill PJ, Bolam JP. 2007. A single-cell analysis of intrinsic connectivity in the rat globus pallidus. *J Neurosci* 27: 6352-62

Sakmann B, Neher E. 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology* 46: 455-72

Sato F, Lavallee P, Levesque M, Parent A. 2000. Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol* 417: 17-31

Schmidt R, Leventhal DK, Mallet N, Chen F, Berke JD. 2013. Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nature neuroscience* 16: 1118-24

Schwarting RK, Huston JP. 1996. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Progress in neurobiology* 49: 215-66

Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L. 1996. Efferent connections of the caudal part of the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 376: 489-507

Sharott A, Magill PJ, Harnack D, Kupsch A, Meissner W, Brown P. 2005. Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *The European journal of neuroscience* 21: 1413-22

Shepherd GM. 2013. Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature reviews. Neuroscience* 14: 278-91

Shin RM, Masuda M, Miura M, Sano H, Shirasawa T, et al. 2003. Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons. *J Neurosci* 23: 11662-72

Shink E, Bevan MD, Bolam JP, Smith Y. 1996. The subthalamic nucleus and the external pallidum: two tightly interconnected structures that control the output of the basal ganglia in the monkey. *Neuroscience* 73: 335-57

Shink E, Smith Y. 1995. Differential synaptic innervation of neurons in the internal and external segments of the globus pallidus by the GABA- and glutamate-containing terminals in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 358: 119-41

Shu SY, Peterson GM. 1988. Anterograde and retrograde axonal transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) from the globus pallidus to the striatum of the rat. *Journal of neuroscience methods* 25: 175-80

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86: 353-87

Smith Y, Bolam JP. 1989. Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain research* 493: 160-7

Smith Y, Bolam JP. 1990. The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296: 47-64

Smith Y, Bolam JP, Von Krosigk M. 1990. Topographical and Synaptic Organization of the GABA-Containing Pallidosubthalamic Projection in the Rat. *The European journal of neuroscience* 2: 500-11

Smith Y, Parent A. 1986. Differential connections of caudate nucleus and putamen in the squirrel monkey (Saimiri sciureus). *Neuroscience* 18: 347-71

Smith Y, Parent A, Seguela P, Descarries L. 1987. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (Saimiri sciureus). *J Comp Neurol* 259: 50-64

Smith Y, Wichmann T, DeLong MR. 1994. Synaptic innervation of neurones in the internal pallidal segment by the subthalamic nucleus and the external pallidum in monkeys. *J Comp Neurol* 343: 297-318

Sotres-Bayon F, Quirk GJ. 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current opinion in neurobiology* 20: 231-5

Spooren WP, Lynd-Balta E, Mitchell S, Haber SN. 1996. Ventral pallidostriatal pathway in the monkey: evidence for modulation of basal ganglia circuits. *J Comp Neurol* 370: 295-312

Staines WA, Atmadja S, Fibiger HC. 1981. Demonstration of a pallidostriatal pathway by retrograde transport of HRP-labeled lectin. *Brain research* 206: 446-50

Starr PA, Subramanian T, Bakay RA, Wichmann T. 2000. Electrophysiological localization of the substantia nigra in the parkinsonian nonhuman primate. *Journal of neurosurgery* 93: 704-10

Stefani A, Spadoni F, Martorana A, Lavaroni F, Martella G, et al. 2002. D2-mediated modulation of N-type calcium currents in rat globus pallidus neurons following dopamine denervation. *The European journal of neuroscience* 15: 815-25

Stoof JC, Kebabian JW. 1984. Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life sciences* 35: 2281-96

Surmeier DJ, Seno N, Kitai ST. 1994. Acutely isolated neurons of the rat globus pallidus exhibit four types of high-voltage-activated Ca2+ current. *J Neurophysiol* 71: 1272-80

Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL. 1999. Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126: 3359-70

Takahashi H, Takahashi K, Liu FC. 2009. FOXP genes, neural development, speech and language disorders. *Advances in experimental medicine and biology* 665: 117-29

Takahashi K, Liu FC, Hirokawa K, Takahashi H. 2003. Expression of Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. *Journal of neuroscience research* 73: 61-72

Toledo-Rodriguez M, Blumenfeld B, Wu C, Luo J, Attali B, et al. 2004. Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. *Cereb Cortex* 14: 1310-27

Urbain N, Gervasoni D, Souliere F, Lobo L, Rentero N, et al. 2000. Unrelated course of subthalamic nucleus and globus pallidus neuronal activities across vigilance states in the rat. *The European journal of neuroscience* 12: 3361-74

Van Der Kooy D, Hattori T. 1980. Single subthalamic nucleus neurons project to both the globus pallidus and substantia nigra in rat. *J Comp Neurol* 192: 751-68

Vargo JM, Estrick MS, Marshall JF. 1996. Amphetamine-induced Fos expression in globus pallidus is altered by frontal cortex injury. *Brain research* 716: 207-12

Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. 2006. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem* 13: 728-33

Vitek JL, Hashimoto T, Peoples J, DeLong MR, Bakay RA. 2004. Acute stimulation in the external segment of the globus pallidus improves parkinsonian motor signs. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19: 907-15

Voorn P, van de Witte S, Tjon G, Jonker AJ. 1999. Expression of enkephalin in pallido-striatal neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877: 671-5

Walker RH, Arbuthnott GW, Wright AK. 1989. Electrophysiological and anatomical observations concerning the pallidostriatal pathway in the rat. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 74: 303-10

Walters JR, Bergstrom DA, Carlson JH, Chase TN, Braun AR. 1987. D1 dopamine receptor activation required for postsynaptic expression of D2 agonist effects. *Science* 236: 719-22

Watanabe K, Kita T, Kita H. 2009. Presynaptic actions of D2-like receptors in the rat cortico-striato-globus pallidus disynaptic connection in vitro. *J Neurophysiol* 101: 665-71

Wilson CJ, Phelan KD. 1982. Dual topographic representation of neostriatum in the globus pallidus of rats. *Brain research* 243: 354-9

Yasukawa T, Kita T, Xue Y, Kita H. 2004. Rat intralaminar thalamic nuclei projections to the globus pallidus: a biotinylated dextran amine anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 471: 153-67

Yelnik J. 2002. Functional anatomy of the basal ganglia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 17 Suppl 3: S15-21

Yung KK, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI. 1995. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65: 709-30

Zaborszky L, Cullinan WE. 1996. Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. I. Dopamine-beta-hydroxylase- and tyrosine hydroxylase input to cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 374: 535-54

Zhang J, Russo GS, Mewes K, Rye DB, Vitek JL. 2006. Lesions in monkey globus pallidus externus exacerbate parkinsonian symptoms. *Experimental neurology* 199: 446-53

Zigmond MJ, Stricker EM. 1973. Recovery of feeding and drinking by rats after intraventricular 6-hydroxydopamine or lateral hypothalamic lesions. *Science* 182: 717-20

Résumé

Le réseau des ganglions de la base (GB) est un ensemble de structures sous corticales, dont la principale fonction est le contrôle du mouvement volontaire. Le G*lobus Pallidus* (GP), équivalent du GPe chez le primate, est un noyau constitué exclusivement de neurones GABAergiques, qui joue un rôle clé dans le fonctionnement des GB de par ses projections inhibitrices diffuses sur l'ensemble des structures de ce macrocircuit.

Bien qu'une diversité neuronale au sein du GP ait été suggérée sur les bases de l'origine embryonnaire, de l'expression de protéines spécifiques ou encore de l'activité électrique des neurones, ces différents paramètres n'ont pas été corrélés de manière claire. Notre premier objectif a donc été de corréler les propriétés membranaires de neurones du GP enregistrés en patch-clamp sur des tranches de cerveau de rat avec l'expression spécifique de deux marqueurs neuronaux : une protéine liant le calcium, la parvalbumine (PV) ou un facteur de transcription, Forkhead Box 2 (FoxP2). Nous avons observé des différences électrophysiologiques significatives entre les neurones PV-positifs et FoxP2-positifs. Ce résultat nous a amené à formuler l'hypothèse qu'ayant des propriétés distinctes, les neurones PV-positifs et FoxP2-positifs pouvaient être connectés de manière différente au sein du réseau des ganglions de la base. Nous avons donc réalisé des expériences de traçage neuronal *in vivo* afin d'identifier les structures cibles de chaque sous-population. Nous montrons que les neurones PV-positifs projettent sur les structures de sorties des ganglions de la base tandis que les neurones FoxP2-positifs projettent uniquement sur le striatum. Enfin, le GP étant majoritairement composé de neurones PV-positifs, nous avons décidé de manipuler spécifiquement l'activité électrique de cette population *in vitro* et *in vivo* grâce à l'optogénétique. Nous présentons des résultats montrant que la modulation de l'activité électrique des neurones PV-positifs modifie le comportement moteur chez l'animal vigile.

Nos résultats d'immunohistochimie et d'électrophysiologie *in vitro* démontrent pour la première fois l'existence d'une diversité neuronale au sein du GP. Nos expériences constituent la première étude du rôle des neurones PV-positifs dans le contrôle du mouvement volontaire.