



HAL
open science

Étude des propriétés fonctionnelles d'une population d'interneurones GABAergiques inhibiteurs du néocortex

Isabelle Ferezou

► **To cite this version:**

Isabelle Ferezou. Étude des propriétés fonctionnelles d'une population d'interneurones GABAergiques inhibiteurs du néocortex. Neurobiologie. Université Paris VI, 2003. Français. NNT : . tel-03322180

HAL Id: tel-03322180

<https://hal.science/tel-03322180v1>

Submitted on 18 Aug 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

Spécialité :

NEUROSCIENCES

Présentée par :

Isabelle FÉRÉZOU

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

**ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES D'UNE POPULATION
D'INTERNEURONES GABAÉRGIQUES INHIBITEURS DU NÉOCORTEX**

Thèse dirigée par :

Pr. Jean ROSSIER ET Dr. Bertrand LAMBOLEZ

Thèse soutenue le 19 décembre 2003 devant le Jury composé de :

Pr. Danielle TRITSCH	<i>Présidente</i>
Dr. Patricia GASPAR	<i>Rapporteur</i>
Dr. Richard MILES	<i>Rapporteur</i>
Pr. Jean-Pierre CHANGEUX	<i>Examineur</i>
Pr. Brigitte KIEFFER	<i>Examinatrice</i>
Dr. Bertrand LAMBOLEZ	<i>Examineur</i>

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ici toute ma gratitude à Bertrand Lambolez qui a dirigé et supervisé mon travail au cours de ces trois années de thèse. Je lui suis particulièrement reconnaissante, non seulement pour son aide, sa disponibilité, et la confiance qu'il m'a accordée depuis mon arrivée au laboratoire, mais aussi pour avoir su cultiver une atmosphère de travail particulièrement stimulante et chaleureuse au sein de l'équipe « Interneurones ».

Je remercie vivement Jean Rossier pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions. Les conseils scientifiques, le dynamisme et la bienveillance de Jean m'ont été particulièrement précieux au cours de ces années.

Je remercie respectueusement et chaleureusement Danièle Tritsch, Patricia Gaspar, Richard Miles, Jean-Pierre Changeux et Brigitte Kieffer qui me font l'honneur d'être membre du Jury de cette thèse.

Un très grand merci à Bruno Cauli qui a pris le temps de me former à la technique de patch-clamp sur tranches et avec qui ce fut un réel plaisir de travailler. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour toute l'aide qu'il m'a apportée au cours de ces années.

A special thankyou to Elisa Hill, for her great support and friendship, her precious contribution to this work, and the improvement of my English.

Je remercie Nathalie Gibelin pour m'avoir formée à la RT-PCR sur cellule unique et pour les bons moments que nous avons partagés. Je tiens à remercier également Ludovic Tricoire, Thierry Gallopin et tous les membres du laboratoire de Neurobiologie pour leur soutien et leur bonne humeur quotidienne. Je remercie tout spécialement Marcel Léopoldie qui a apporté soins, attention et nourriture à ceux sans qui rien n'aurait été possible...

Merci également à Edith Hamel, qui m'a soutenue avec enthousiasme au cours de ses séjours passés au laboratoire, ainsi qu'à Paul Schweitzer pour ces conseils et ses encouragements.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Herbert Axelrad, avec qui j'ai fait mes premiers pas dans le monde de la recherche scientifique et qui a su me convaincre de me lancer dans cette aventure. Je remercie également Jeanne Lainé et Marie Elizabeth Marc qui m'ont enseigné les techniques d'histologie et d'immunocytochimie au cours de mon année de DEA.

Je remercie très sincèrement Armelle Rancillac & Christelle Rochefort avec qui j'ai partagé ces années d'études doctorales, l'amitié qui nous unit m'a apporté force et courage dans les moments difficiles...

Je voudrais également adresser un grand merci à ma sœur Sylvie, à mes grands parents et à tous mes proches pour leur soutien et leur compréhension.

Je remercie tout particulièrement ma mère Jacqueline qui m'a permis de poursuivre mes études dans les meilleures conditions et qui m'a soutenue et encouragée tout au long de ces années. C'est pourquoi je souhaite lui dédier ce travail, ainsi qu'à Johannes pour tout ce qu'il m'a apporté...

RÉSUMÉ

Le néocortex contrôle les activités conscientes ainsi que les relations avec les événements extérieurs de l'environnement. Il est de ce fait impliqué dans des processus sensori-moteurs, cognitifs et émotionnels complexes. Les neurones néocorticaux sont divisés en deux grandes classes : les neurones pyramidaux excitateurs qui constituent les efférences du néocortex, et les interneurones, pour la plupart inhibiteurs, qui modulent l'activité corticale au niveau des circuits locaux. Les interneurones sont minoritaires dans le néocortex, néanmoins ils sont très hétérogènes du point de vue de leurs propriétés électrophysiologiques, moléculaires et morphologiques. Cette grande diversité a mené à la caractérisation de populations d'interneurones distinctes sur la base de leurs propriétés intrinsèques. Cependant, les fonctions spécifiques et les modes d'action de ces populations cellulaires dans la physiologie du néocortex ne sont que partiellement élucidés. Ce travail avait pour objectif l'étude des propriétés fonctionnelles d'une population d'interneurones GABAergiques du néocortex. La combinaison des techniques d'électrophysiologie, de biologie moléculaire et d'histochimie nous a permis de montrer que les interneurones sensibles aux agonistes nicotiques, qui expriment le peptide vasoactif intestinal et la cholecystokinine, peuvent être activés de manière synaptique par les fibres sérotoninergiques afférentes originaires des noyaux du raphé, via le récepteur à la sérotonine de type 3. La mise en évidence de l'expression sélective du récepteur opioïde de type μ et de la préproenképhaline dans cette population neuronale nous a conduit à démontrer par la suite l'existence d'une boucle d'autorégulation enképhalinergique, spécifique de ces interneurones. Ainsi, l'identification de mécanismes contrôlant sélectivement la mise en jeu d'une population neuronale restreinte dans l'activité du réseau néocortical nous a permis de mieux cerner la place qu'elle occupe dans la physiologie du néocortex.

TABLE DES MATIÈRES

I. PRÉSENTATION DU SUJET	8
II. INTRODUCTION	10
1. ANATOMIE DU NÉOCORTEX	10
2. LES CONSTITUANTS CELLULAIRES DU NÉOCORTEX	16
2.1. LES CELLULES GLIALES	16
2.2. LES NEURONES	17
2.2.1. LES CELLULES PYRAMIDALES	17
2.2.2. LES INTERNEURONES	20
2.2.2.1. Les Cellules Étoilées	21
2.2.2.2. Les Interneurones GABAergiques	22
3. LE PROBLÈME DE LA DIVERSITÉ DES INTERNEURONES GABAERGIQUES	23
3.1. CLASSIFICATIONS MORPHOLOGIQUES	23
3.2. CLASSIFICATIONS NEUROCHIMIQUES	26
3.2.1. LES PROTÉINES DE LIAISON DU CALCIUM	26
3.2.2. LES NEUROPEPTIDES	27
3.2.3. COMBINAISONS DE MARQUEURS BIOCHIMIQUES	27
3.3. CLASSIFICATIONS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES	29
3.4. L'APPORT DE LA RT-PCR SUR CELLULE UNIQUE A L'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ DES INTERNEURONES GABAERGIQUES	33
4. MODULATION DE L'ACTIVITÉ DU RÉSEAU NÉOCORTICAL	39
4.1. LE RÉSEAU NÉOCORTICAL	39
4.2. MODULATION CHOLINERGIQUE	43
4.2.1. LES AFFÉRENCES CHOLINERGIQUES	43
4.2.3. LES RÉCEPTEURS CHOLINERGIQUES	45
4.2.3.1. Les Récepteurs Muscariniques	45
4.2.3.2. Les Récepteurs Nicotiniques	46
4.3. MODULATION SÉROTONINERGIQUE	48
4.3.1. LES AFFÉRENCES SÉROTONINERGIQUES	48
4.3.2. LES RÉCEPTEURS SÉROTONINERGIQUES	50
4.3.2.1. Les Récepteurs Métabotropiques à la Sérotonine	50
4.3.2.1. Le Récepteur 5-HT ₃	51
4.4. MODULATION OPIOÏDERGIQUE	53

III. RÉSULTATS	56
1. LES RÉCEPTEURS 5-HT3 ET L'EXCITATION SYNAPTIQUE RAPIDE DES INTERNEURONES VIP/CCK	57
1.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1	57
1.1.1. INTRODUCTION	57
1.1.2. RÉSULTATS & DISCUSSION	57
1.1.2.1. Expression Sélective de Récepteurs 5-HT3 Post-Synaptiques Fonctionnels par une Sous-Population d'Interneurones VIP/CCK	57
1.1.2.2. Excitation Synaptique Rapide des Interneurones VIP/CCK par les Fibres Sérotoninergiques Afférentes	59
1.1.2.3. Co-expression des Récepteurs 5-HT3 et Nicotiniques par les Interneurones VIP/CCK	60
1.2. ARTICLE 1 : 5-HT3 RECEPTORS MEDIATE SEROTONERGIC FAST SYNAPTIC EXCITATION OF NEOCORTICAL VIP/CCK INTERNEURONS	61
2. LES INTERNEURONES VIP/CCK ET LA MODULATION DE L'ACTIVITÉ NÉOCORTICALE PAR LE SYSTÈME OPIOÏDE ENDOGÈNE	70
2.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2	70
2.1.1. INTRODUCTION	70
2.1.2. RÉSULTATS	71
2.1.2.1. Expression Sélective de Récepteurs Opiïdes de Type μ Fonctionnels par les Interneurones VIP/CCK	71
2.1.2.2. Convergence des Systèmes Nicotiniques et Opiïdes de Type μ au Niveau des Interneurones VIP/CCK	72
2.1.2.3. Mise en Évidence d'une Boucle de Régulation Enképhalinergique Autocrine Activée par la Stimulation Nicotinique des Interneurones VIP/CCK	73
2.1.3. DISCUSSION	73
2.2. ARTICLE 2 : THE CELLULAR CROSSTALK BETWEEN NICOTINE AND MORPHINE IN THE NEOCORTEX	76
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE	89
V. RÉFÉRENCES	99

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	▶ Le néocortex, une structure propre aux mammifères	11
Figure 2	▶ Les aires de Brodmann	12
Figure 3	▶ Aires sensorielles et motrices chez l'homme et le rat	13
Figure 4	▶ Les différentes couches du néocortex	14
Figure 5	▶ Les cellules pyramidales du néocortex	18
Figure 6	▶ Cellule pyramidale géante (cellule de Betz) dans le gyrus postcentral d'un enfant de 30 mois	19
Figure 7	▶ Profils de décharge de cellules pyramidales	20
Figure 8	▶ Morphologie et Profil de décharge d'une cellule étoilée	21
Figure 9	▶ Les principaux types d'interneurons GABAergiques du néocortex	24
Figure 10	▶ Représentation schématique de la distribution de marqueurs neurochimiques parmi les interneurons GABAergiques du néocortex	28
Figure 11	▶ Profil de décharge d'une cellule de type FS	30
Figure 12	▶ Profil de décharge d'une cellule de type LS	31
Figure 13	▶ Profil de décharge d'une cellule de type RSNP	32
Figure 14	▶ Profil de décharge d'une cellule de type LTS (BSNP)	33
Figure 15	▶ Caractérisation électrophysiologique, morphologique et moléculaire d'un neurone IS de la couche V	35
Figure 16	▶ Classification hiérarchique ascendante appliquée aux interneurons fusiformes, les interneurons FS et les neurones pyramidaux étant utilisés comme contrôles	36
Figure 17	▶ Caractéristiques électrophysiologiques et moléculaires des types neuronaux révélés par la classification hiérarchique ascendante	37
Figure 18	▶ Profil d'expression de marqueurs moléculaires des 5 types neuronaux révélés par la classification hiérarchique ascendante	38
Figure 19	▶ Connexions principales entre les éléments neuronaux du réseau néocortical	40
Figure 20	▶ Afférences cholinergiques, sérotoninergiques, dopaminergiques et noradrenergiques du néocortex	42
Figure 21	▶ Fibres cholinergiques innervant la couche I du néocortex Humain	44
Figure 22	▶ Distribution des axones sérotoninergiques dans le néocortex de singe	49
Figure 23	▶ Détection simultanée des transcrits du récepteur 5-HT ₃ et de l'immunoréactivité du GABA dans la couche II du néocortex de rat	52
Figure 24	▶ Interneurons VIP/CCK et modulation du réseau néocortical	97

I. PRÉSENTATION DU SUJET

Le néocortex est le centre principal d'intégration des processus sensorimoteurs, émotionnels et cognitifs. Les aires corticales et les systèmes de neurotransmission mis en jeu dans ces processus sont de mieux en mieux connus grâce aux progrès de l'imagerie fonctionnelle et aux études neurochimiques comportementales. Cependant les populations neuronales spécifiquement impliquées dans les fonctions corticales, ainsi que leur mode d'activation, restent largement inconnus du fait de la grande hétérogénéité du tissu cérébral. Mon travail de thèse avait pour objectif de contribuer à l'exploration fonctionnelle du néocortex par la compréhension des mécanismes de mise en jeu de populations neuronales spécifiques au sein du réseau cortical.

Le néocortex comprend deux grandes populations de neurones : les cellules pyramidales, glutamatergiques excitatrices, qui constituent les principales efférences du néocortex, et les interneurones, pour la plupart GABAergiques inhibiteurs, impliqués dans la modulation des signaux au niveau des circuits locaux. Bien que minoritaires dans le néocortex, les interneurones jouent un rôle central en intégrant des signaux multiples et en synchronisant les populations neuronales. Ces cellules présentent une très grande hétérogénéité du point de vue de leurs propriétés morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques. Cette diversité a donné lieu à plusieurs classifications visant à identifier des populations d'interneurones pertinentes du point de vue fonctionnel. Cependant, la restriction des critères de classification, généralement due à des limitations techniques, rend difficile la comparaison des classes neuronales ainsi définies, et constitue un obstacle à la caractérisation précise des différentes populations d'interneurones du néocortex. La combinaison des techniques de patch-clamp, de RT-PCR sur cellule unique et de marquages histochimiques, mise au point au laboratoire, a permis d'établir une classification basée sur des paramètres multiples, définissant ainsi des populations d'interneurones caractérisés à la fois par leurs propriétés électrophysiologiques, moléculaires et morphologiques. Cependant, le rôle fonctionnel de ces classes d'interneurones dans la physiologie du néocortex reste à établir. Les travaux que j'ai effectués dans le cadre de mon doctorat, ont contribué à montrer que parmi les interneurones, ceux qui expriment le peptide vasoactif intestinal (*vasoactive intestinal peptide* ou VIP) et la cholecystokinine (CCK) constituent une unité fonctionnelle distincte au sein du réseau cortical, en vertu de connections et de voies de neurotransmission spécifiques. Des études préalablement menées au laboratoire ont montré que ces interneurones VIP/CCK constituent une population homogène du point de vue

de leurs caractéristiques morphologiques, neurochimiques et électrophysiologiques intrinsèques. Ces interneurons ont la propriété d'être sélectivement activés par les agonistes nicotiques, via des récepteurs somato-dendritiques.

Au cours de mon doctorat, j'ai tout d'abord montré que les interneurons VIP/CCK peuvent être sélectivement activés par les fibres sérotoninergiques afférentes originaires des noyaux du raphé. En effet, la stimulation électrique de ces fibres entraîne une réponse excitatrice rapide, de type synaptique, dans les interneurons VIP/CCK, via le récepteur de la sérotonine de type 3. Ces résultats, qui ont fait l'objet d'une publication, ont permis de mettre en évidence le rôle des interneurons VIP/CCK dans la modulation de l'activité néocorticale par le système sérotoninergique afférent. J'ai démontré par la suite l'existence d'une boucle d'autorégulation enképhalinergique spécifique des interneurons VIP/CCK, preuve d'un lien cellulaire direct entre le système nicotinique et le système opioïdérique endogène au sein du néocortex. En effet, l'excitation sélective des interneurons VIP/CCK par des agonistes nicotiques entraîne l'activation de récepteurs opioïdes de type μ , via la libération d'enképhalines endogènes. Ces résultats, qui font l'objet d'une seconde publication, montrent comment les effets centraux de la nicotine peuvent être relayés par le système opioïde endogène au niveau cellulaire, ce qui apporte des données essentielles à la compréhension des mécanismes responsables de la dépendance à la nicotine. Les données obtenues au cours de ce travail de thèse indiquent que les interneurons VIP/CCK constituent une population neuronale homogène du point de vue fonctionnel. L'identification de mécanismes responsables de la mise en jeu de ces interneurons dans le réseau néocortical nous a permis de mieux cerner la place qu'ils occupent dans la physiologie du néocortex.

II. INTRODUCTION

Cette thèse a pour sujet la caractérisation des propriétés fonctionnelles d'une population restreinte d'interneurones GABAergiques inhibiteurs dans le néocortex de rat. Elle apporte en effet des données démontrant que des interneurones qui partagent des caractéristiques morphologiques, moléculaires et électrophysiologiques, occupent une fonction particulière dans la modulation de l'activité du néocortex par les systèmes cholinergiques, sérotoninergiques et opioïdiques.

Afin de situer le sujet de cette thèse, j'ai choisi d'effectuer tout d'abord une description rapide des propriétés anatomiques du néocortex (*chapitre 1*), et de donner un aperçu des principaux types cellulaires qui constituent cette structure (*chapitre 2*). Parce que la grande diversité des interneurones GABAergiques est un problème central dans l'étude de leurs rôles fonctionnels, le *chapitre 3* y est consacré. Enfin, le *chapitre 4* présente un aperçu des connaissances actuelles concernant la modulation de l'activité du réseau néocortical par les systèmes cholinergiques, sérotoninergiques et opioïdiques.

1. ANATOMIE DU NÉOCORTEX.

Le néocortex est considéré comme le sommet hiérarchique du système nerveux. Il est impliqué dans des processus cognitifs aussi complexes que la reconnaissance des formes, le langage, ou le contrôle volontaire du mouvement.

Originaire du télencéphale, il constitue la partie la plus superficielle des hémisphères cérébraux. C'est la structure cérébrale la plus récemment acquise au cours de l'évolution (*pour revue, voir Bear et al., 1997*). Le néocortex apparaît en effet avec les mammifères : d'aspect lisse chez les mammifères primitifs (ou lissencéphales), il présente de nombreuses circonvolutions chez les mammifères supérieurs (ou gyrencéphales, *Figure 1*).

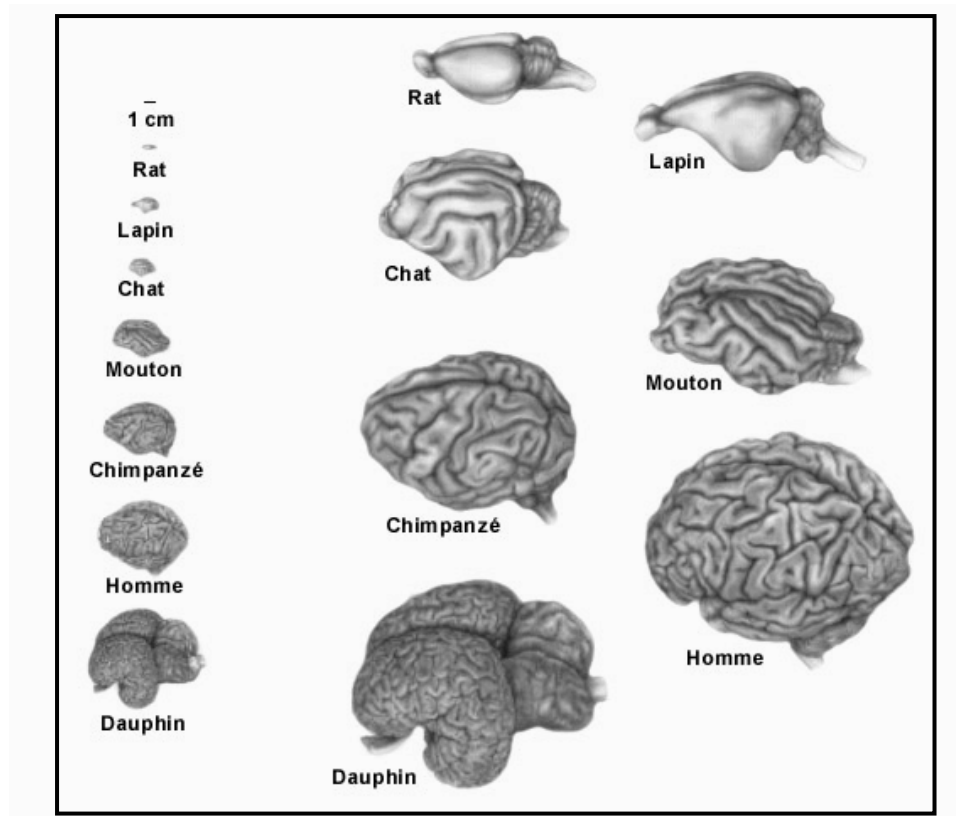


Figure 1 : Le néocortex, une structure propre aux mammifères.

Les cerveaux de différentes espèces de mammifères, à la même échelle à gauche, et agrandis sans être à l'échelle à droite. Le néocortex, situé à la surface des hémisphères cérébraux est lisse chez les mammifères primitifs tels que le rat. Au cours de l'évolution, le néocortex a pris une ampleur considérable, adoptant ainsi un aspect plissé.

Au début du vingtième siècle, sur la base de différences cytoarchitecturales, le neuroanatomiste allemand Korbinian Brodmann (1909) a subdivisé le néocortex humain en 52 aires corticales, regroupées en aires motrices, sensorielles et associatives (**Figure 2**). Il émit l'hypothèse selon laquelle chaque aire corticale est impliquée dans une fonction particulière. Cette hypothèse fut vérifiée à de nombreuses reprises, notamment grâce aux techniques d'imagerie fonctionnelle telles que la tomographie par émission de positrons (TEP) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permettent d'observer les variations de flux sanguin cérébral (*pour revue, voir Kandel, 1991a*).

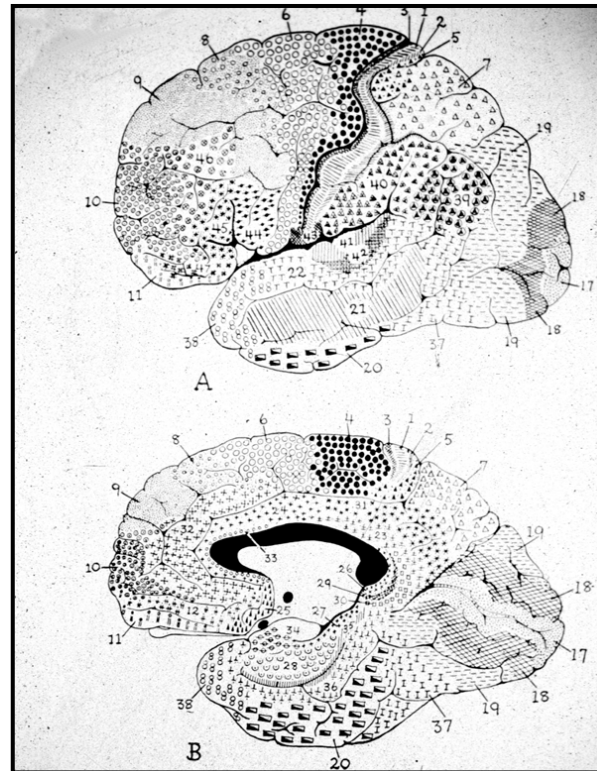


Figure 2 : Les aires de Brodmann.

Korbinian Brodmann a divisé le néocortex humain en 52 aires différenciées par leurs propriétés cytoarchitecturales et fonctionnellement distinctes. Chaque aire est représentée par un symbole. A : Vue latérale, B : vue médiane. D'après Brodmann, 1909.

D'une manière générale, chez les mammifères gyrencéphales, le néocortex est divisé en quatre lobes anatomiquement délimités par des scissures et des sillons. Le lobe frontal, formant la partie la plus antérieure du cerveau comprend notamment l'aire motrice principale, responsable de la genèse des mouvements volontaires. Le lobe temporal inclut l'aire auditive principale. Le lobe pariétal contient l'aire somesthésique principale. Enfin, le lobe occipital, qui forme la partie la plus postérieure du cerveau, est impliqué dans la vision.

Certaines de ces aires ont leur équivalent chez les mammifères plus primitifs : à titre d'exemple, aux aires motrices et somesthésiques de l'homme, correspond l'aire sensorimotrice du rat (*Figure 3*).

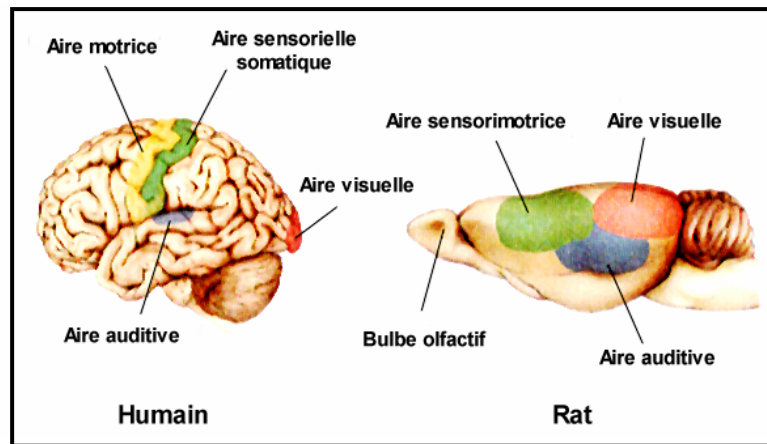


Figure 3 : Aires sensorielles et motrices chez l'homme et le rat.

Les régions entre les aires sensorielles et motrices occupent une surface plus importante chez l'homme que chez le rat, et constituent des aires sensorielles secondaires et associatives.

Le néocortex est constitué de deux formations superposées : la substance grise située à la surface du cerveau, et la substance blanche délimitée par la substance grise, les ventricules et le striatum. La substance grise comporte un grand nombre de corps cellulaires. La substance blanche est, quant à elle, essentiellement formée de fibres nerveuses myélinisées. Par la suite, nous nous intéresserons principalement à la substance grise du néocortex.

Du point de vue histologique, la structure de la substance grise est laminaire, elle composée de six couches distinctes disposées parallèlement à la surface du néocortex (*pour revue, voir Jones, 1984a*). Ces couches ont été mises en évidence grâce à des techniques de marquage telles que la coloration de la myéline (méthode de Weigert), l'imprégnation à l'argent de Golgi ou la coloration de Nissl. Elles se distinguent par la taille et la densité des corps cellulaires qui s'y trouvent (**Figure 4**). L'épaisseur de chaque couche peut varier entre les différentes aires corticales. On notera pour exemple que la couche IV va jusqu'à disparaître au niveau du cortex moteur, alors que la couche V y est particulièrement développée.

La couche I, la plus superficielle, également appelée couche moléculaire ou couche plexiforme, est principalement constituée de fibres nerveuses. On y trouve toutefois les corps cellulaires de quelques neurones. Les couches II et III contiennent de nombreux corps cellulaires, plus petits dans la couche II que dans la couche III. Ces deux couches sont également appelées, respectivement, couche granulaire externe et couche pyramidale externe. La couche granulaire interne, ou couche IV, contient une forte densité de cellules à l'aspect étoilé et épineux

(cellules en grain). La couche V (couche ganglionnaire ou couche pyramidale interne) contient les grandes cellules pyramidales du néocortex. Enfin, la couche VI ou polymorphe, contient des cellules de formes irrégulières.

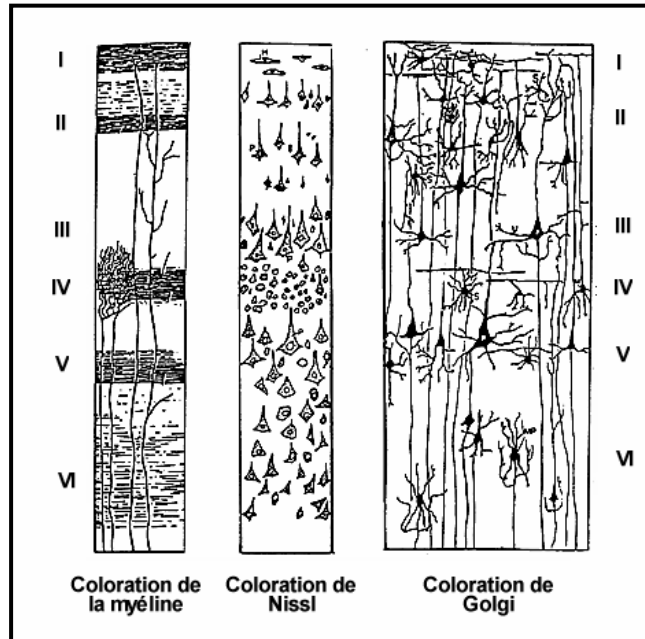


Figure 4 : Les différentes couches du néocortex.

La même aire corticale a été colorée par trois méthodes différentes. La coloration de la myéline qui permet de visualiser les axones. La coloration de Nissl marque les corps cellulaires. La coloration de Golgi marque les neurones dans leur intégralité. Les différentes couches corticales sont déterminées par des densités cellulaires et des tailles cellulaires différentes.

D'un point de vue plus fonctionnel, on divise le néocortex en trois couches, la couche supragranulaire qui contient les couches I, II, et III, la couche granulaire (couche IV), et la couche infragranulaire contenant les couches V et VI.

Outre cette structure laminaire, le néocortex est également organisé en colonnes matérialisées par l'organisation verticale des éléments corticaux (*pour revue, voir Mountcastle, 1997*). Ces colonnes s'étendent sur toute l'épaisseur du cortex et présentent un diamètre de 300 à 500 μm . Ces unités morphologiques correspondent en outre à des unités fonctionnelles. Vernon B. Mountcastle (1957) a montré, par des enregistrements effectués dans le néocortex de chat *in vivo*, que les cellules répondant à la stimulation d'une même classe de récepteurs sensoriels, ainsi que celles répondant à la stimulation d'une même région de la

peau, sont organisées en modules élémentaires sous forme de colonnes. Cette organisation en colonne se retrouve notamment dans le cortex visuel et auditif de nombreuses espèces. Suivant les espèces et les zones corticales considérées, la forme des colonnes corticales peut varier, mais cette organisation reste un principe général au niveau du néocortex.

2. LES CONSTITUANTS CELLULAIRES DU NÉOCORTEX.

Dans le néocortex, on rencontre deux grands types de cellules : les cellules gliales (ou glies) et les cellules nerveuses (ou neurones).

2.1. LES CELLULES GLIALES.

Les cellules gliales constituent le type cellulaire le plus abondant du système nerveux puisqu'on estime qu'il y a entre 10 et 50 fois plus de glies que de neurones (*Kandel, 1991b*). Ces cellules tiennent leur nom du grec *Glia* signifiant "colle". Bien que les cellules gliales n'apparaissent pas comme primordiales au traitement de l'information, elles occupent des fonctions essentielles dans la physiologie du système nerveux. Parmi ces fonctions on peut citer :

- un rôle de soutien mécanique des cellules nerveuses,
- un rôle d'isolation électrique des axones,
- un rôle d'homéostasie du potassium,
- un rôle dans la transmission synaptique en facilitant l'élimination des neurotransmetteurs de la fente synaptique,
- un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique,
- un rôle métabolique.

La liste des rôles énoncés ci-dessus n'est pas exhaustive et la fonction des cellules gliales est encore mal connue.

Les glies se subdivisent en deux grands types : les microglies et les macroglies. Les microglies sont des phagocytes recrutés lors de lésions ou de maladies, elles ont donc une fonction très spécifique dans la physiologie du système nerveux. Il existe deux grands types de macroglies dans le néocortex : les oligodendrocytes et les astrocytes (*pour revue, voir Vaughan, 1984*).

Les oligodendrocytes sont de petites cellules qui présentent de nombreux prolongements. Elles entourent les axones d'une gaine de myéline et assurent ainsi une isolation électrique permettant une conduction très rapide de l'influx nerveux. On trouve les oligodendrocytes dans la substance blanche et dans la substance grise du néocortex.

Les astrocytes tiennent leur nom de leur morphologie généralement étoilée. Ces cellules présentent des pieds astrocytaires au niveau des vaisseaux sanguins et des neurones, elles jouent un rôle dans la régulation du métabolisme neuronal. Ces cellules sont également impliquées dans le contrôle de la barrière hémato-encéphalique. Les astrocytes qui entourent les zones synaptiques sont impliqués

dans la recapture de certains neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique par les neurones. On peut citer également le rôle que jouent les astrocytes dans la recapture du potassium s'accumulant lors d'une activité neuronale soutenue.

2.2. LES NEURONES.

L'étude des neurones néocorticaux a débuté au XIX^{ème} siècle avec les premières techniques de marquages histochimiques. Dès lors, l'extraordinaire diversité des cellules nerveuses qui peuplent cette structure a donné lieu à des études systématiques, visant à classifier ces neurones sur la base de leurs propriétés morphologiques. Ainsi Santiago Ramón y Cajal (1911) a dressé un véritable catalogue des neurones néocorticaux grâce à la méthode de coloration argentique mise au point par Camillo de Golgi (1873). A la fin du XX^{ème} siècle, le développement des techniques d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ*, a mené les anatomistes à classifier les neurones du néocortex sur la base de l'expression de marqueurs biochimiques spécifiques (*pour revue voir DeFelipe, 1993*). Enfin, il est apparu, dès les premières études d'enregistrements intracellulaires *in vivo*, que les neurones néocorticaux ne possèdent pas tous les mêmes propriétés électrophysiologiques (*Takahashi, 1965; Calvin & Sypert, 1976*). La mise au point de la technique de patch-clamp sur des tranches de cerveau maintenues en survie (*Edwards et al., 1989; Stuart et al., 1993*), à partir des travaux d'Erwin Neher et Bert Sakmann (1976), a permis l'étude systématique des comportements de décharge de potentiels d'action de ces neurones, et a donné lieu à de nouvelles classifications.

Les neurones néocorticaux sont classiquement divisés en deux grandes populations : les cellules pyramidales et les cellules non pyramidales, à axone court, encore regroupées sous le terme d'interneurones.

2.2.1. LES CELLULES PYRAMIDALES.

Les cellules pyramidales représentent 70 à 85 % des neurones néocorticaux. Ce sont des neurones excitateurs qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (*Baughman & Gilbert, 1981*). Les cellules pyramidales (*Figure 5*) se distinguent facilement des autres types cellulaires par la forme triangulaire de leur soma, leur dendrite apicale proéminente qui s'étend verticalement vers la surface du néocortex, et leurs dendrites basales qui émergent latéralement de la base du corps cellulaire.

Toutes les dendrites des cellules pyramidales sont couvertes d'épines. La dendrite apicale s'étend généralement jusque dans la couche moléculaire où elle se ramifie abondamment pour former un bouquet terminal. Plusieurs dendrites basales émergent du soma et se ramifient rapidement. Leur arborisation est plus ou moins importante suivant les couches corticales (*pour revue, voir Feldman, 1984; DeFelipe & Fariñas, 1992*).

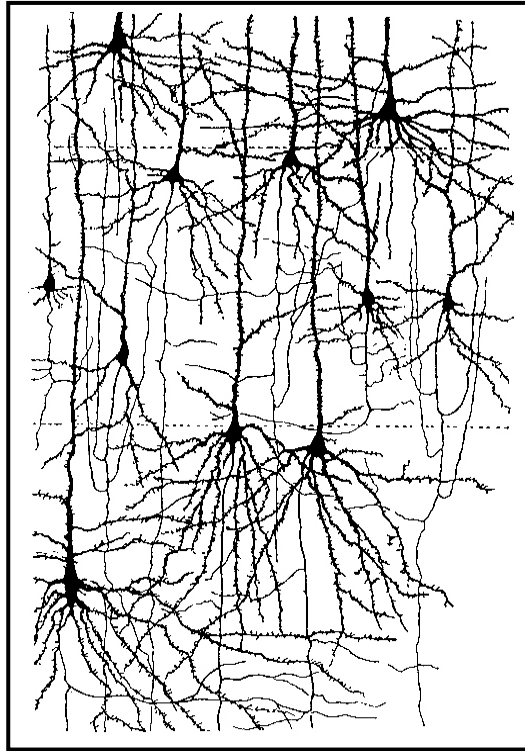


Figure 5 : Les cellules pyramidales du néocortex.

Cellules pyramidales des couches IV, V et VI de la circonvolution temporale d'un enfant de 25 jours. Coloration de Golgi, d'après Ramón y Cajal, 1911.

L'axone des cellules pyramidales émerge généralement de la base du corps cellulaire ou d'une dendrite basale. Il plonge vers les couches profondes du néocortex et pénètre dans la substance blanche, avant de rejoindre d'autres aires néocorticales ou sous-corticales. Tout au long de sa trajectoire, il donne naissance à des collatérales horizontales qui vont contacter d'autres cellules de la même région corticale ou revenir contacter le corps cellulaire de la cellule à laquelle il appartient. Ainsi, les cellules pyramidales sont les neurones efférent du néocortex, elles sont de ce fait parfois nommées cellules principales.

La morphologie des cellules pyramidales, et plus particulièrement leur taille, varie sensiblement selon les couches corticales considérées. Elles sont relativement petites dans les couches superficielles alors qu'elles peuvent atteindre des tailles considérables au sein des couches plus profondes. Dans la couche V du cortex moteur on rencontre ainsi des cellules pyramidales géantes, également appelés cellules de Betz (*Figure 6*). Ces cellules, dont l'axone peut atteindre la moelle sacrée, sont les plus grands neurones de tout le système nerveux.

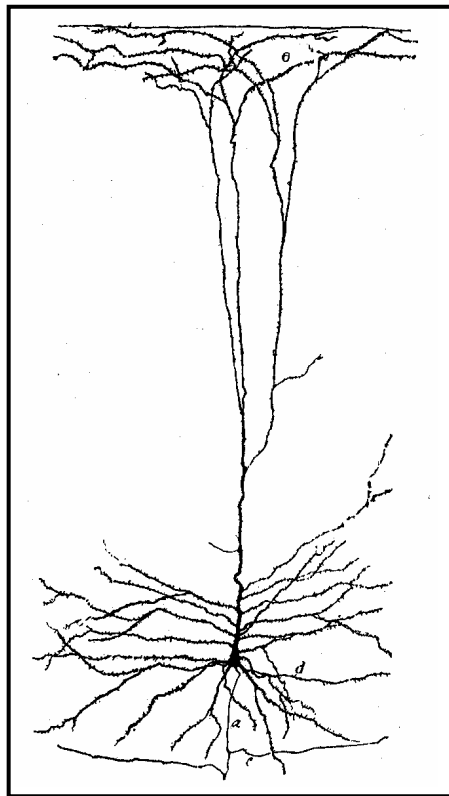


Figure 6 : Cellule pyramidale géante (cellule de Betz) dans le gyrus postcentral d'un enfant de 30 mois.

a : axone, c : collatérales, d : dendrites basales, e : bouquet dendritique terminal. Coloration de Golgi, d'après Ramón y Cajal, 1911.

Outre leurs caractéristiques morphologiques, les cellules pyramidales peuvent être identifiées par leurs propriétés électrophysiologiques (*pour revue, voir Connors & Gutnick, 1990*). Ces cellules émettent généralement des potentiels d'action de longue durée (supérieure à la milliseconde à mi-hauteur) et leur résistance se situe autour de 400 M Ω (*Kawaguchi, 1993*).

Les cellules pyramidales présentent plusieurs comportements électrophysiologiques. On distingue, parmi ces neurones (*Figure 7*) :

- des cellules à décharge habituelle (*Regular Spiking*, ou RS),
- des cellules à décharge en bouffées (*Intrinsically Bursting* ou IB, McCormick *et al.*, 1985; Connors & Gutnick, 1990; Kawaguchi, 1993).

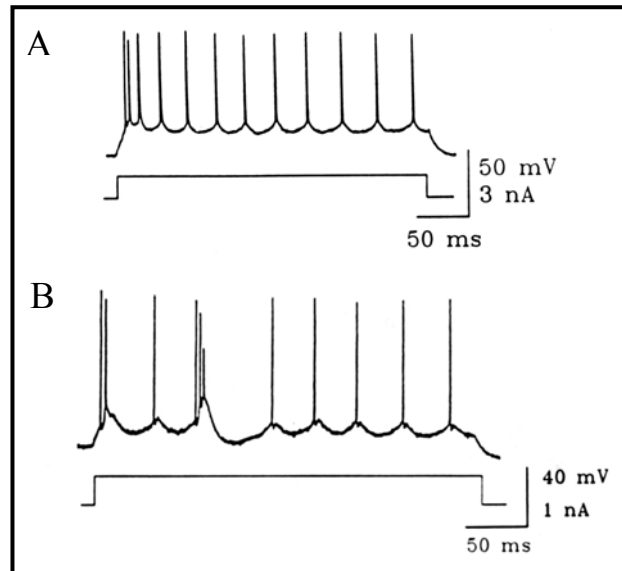


Figure 7 : Profils de décharge de cellules pyramidales.

A : Cellule à décharge habituelle (RS), B : Cellule à décharge en bouffées (IB). Enregistrements intracellulaires effectués lors de l'injection d'un courant dépolarisant (traces du bas). D'après Connors & Gutnick, 1990.

Le profil de décharge le plus courant pour les cellules pyramidales est celui des cellules à décharge habituelle, caractérisé par une réduction rapide et marquée de la fréquence instantanée de décharge de potentiels d'action (ou adaptation de fréquence). Les cellules pyramidales à décharge en bouffées sont plus rares, elles se situent au sein des couches IV et V.

2.2.2. LES INTERNEURONES.

Les cellules non pyramidales possèdent, par opposition aux cellules pyramidales, un axone court dont la trajectoire est limitée au circuit cortical local, et sont à ce titre des interneurones. Bien que minoritaires, les interneurones jouent un rôle central dans le néocortex en intégrant des signaux multiples et en synchronisant les populations neuronales. On distinguera tout d'abord deux types

d'interneurones : les cellules étoilées qui, à l'instar des cellules pyramidales, sont des neurones glutamatergiques excitateurs, et les interneurones inhibiteurs qui libèrent l'acide γ -aminobutyrique (GABA) lors de la neurotransmission (Houser *et al.*, 1983).

2.2.2.1. Les Cellules Étoilées.

Les cellules étoilées sont glutamatergiques et donc excitatrices. Ce sont de petites cellules multipolaires dont les dendrites sont couvertes d'épines (*Figure 8 A*). On rencontre ces cellules essentiellement dans la couche IV du néocortex, au niveau des aires sensorielles. Elles reçoivent des afférences provenant directement du thalamus, et contactent les cellules pyramidales et les interneurones inhibiteurs (White & Rock, 1980; Lund, 1984; Benshalom & White, 1986).

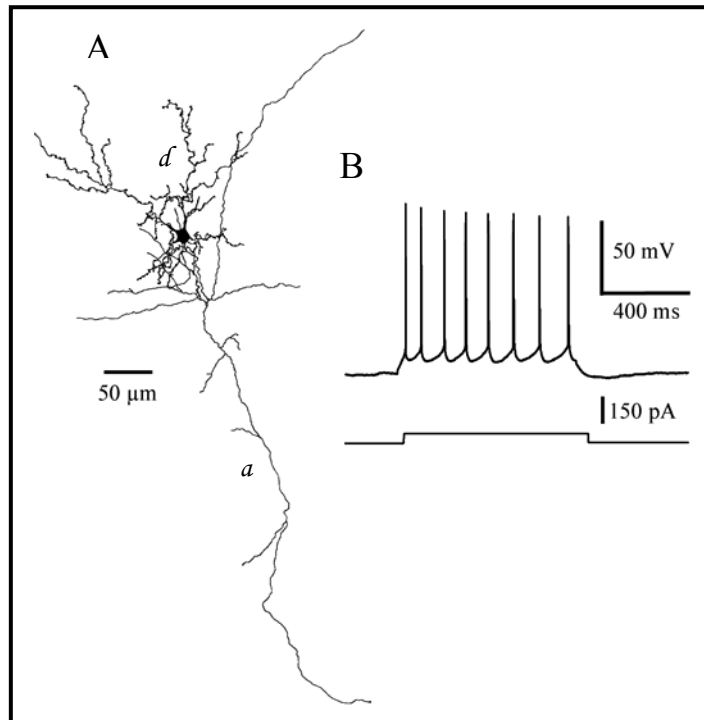


Figure 8 : Morphologie et profil de décharge d'une cellule étoilée.

A : Marquage intracellulaire d'une cellule étoilée de la couche IV du néocortex de rat, a : axone, d : arbre dendritique. B : Enregistrement par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière, de la même cellule montrant une décharge de potentiels d'action de type habituelle (RS) lors de l'injection de courant dépolarisant. D'après Hill, 2002.

Du point de vue électrophysiologique, les cellules étoilées sont caractérisées par une décharge de potentiels d'action de type habituelle (*Figure 8 B, Agmon & Connors, 1992*).

2.2.2.2. Les Interneurones GABAergiques.

Les interneurones GABAergiques inhibiteurs sont présents dans toutes les couches corticales, y compris dans la couche moléculaire. Contrairement aux cellules pyramidales et étoilées, ces neurones sont quasiment dépourvus d'épines dendritiques. Ils présentent des caractéristiques morphologiques, neurochimiques et électrophysiologiques extrêmement hétérogènes (*pour revue, voir DeFelipe, 2002*). Cette large diversité suggère l'existence de types d'interneurones distincts occupant des fonctions spécifiques dans la physiologie du néocortex. Cependant, nous verrons, dans le chapitre suivant, que la définition et la caractérisation de tels types neuronaux est un problème complexe.

3. LE PROBLÈME DE LA DIVERSITÉ DES INTERNEURONES GABAERGIQUES.

La grande diversité des interneurones GABAergiques inhibiteurs du néocortex a donné lieu à de nombreuses études systématiques de classification basées sur des critères anatomiques, biochimiques ou physiologiques, selon les méthodes d'investigation utilisées. Ces études ont pour objectif commun la définition de populations pertinentes d'interneurones, impliquées dans des fonctions spécifiques de la physiologie du néocortex. Cependant, parce qu'elles ne tiennent compte que d'un nombre restreint de critères, les classifications ainsi établies sont difficilement comparables et tendent à multiplier le nombre de classes d'interneurones du néocortex. En effet, la confrontation de ces diverses classifications révèle des recouvrements partiels, ce qui conduit à un nombre considérable de classes possibles. Le développement récent d'une méthode globale, permettant d'accéder conjointement aux propriétés moléculaires, électrophysiologiques et morphologiques des interneurones, a permis d'aborder différemment le problème de la classification des interneurones. Cette approche a abouti à la définition de classes d'interneurones sur la base de critères descriptifs multiples.

3.1. CLASSIFICATIONS MORPHOLOGIQUES.

L'étude histologique des interneurones inhibiteurs du néocortex a donné lieu à une classification basée sur les caractéristiques morphologiques de leur arborisation dendritique ou axonale (*Figure 9*). Six grands types d'interneurones ont ainsi été définis.

Les cellules en panier (*Figure 9 D, H*).

L'axone des cellules en panier forme des terminaisons péricellulaires autour du soma des cellules Pyramidales. Ces cellules sont principalement localisées dans les couches III et V du néocortex (*pour revue, voir Jones & Hendry, 1984; Naegele & Barnstable, 1989*).

Les cellules en chandelier (*Figure 9 I*).

L'arborisation axonale des neurones en chandelier forme des structures ressemblant à des chandeliers autour du segment initial des cellules pyramidales. Les cellules en chandelier sont plus abondantes dans les couches supragranulaires bien qu'elles aient également été décrites dans les couches infragranulaires (*pour revue, voir Peters, 1984a; Naegele & Barnstable, 1989*).

Les cellules de Martinotti (Figure 9 G).

La caractéristique commune des cellules de Martinotti est d'avoir une arborisation axonale ascendante (Ramón y Cajal, 1911; Wahle, 1993). Ces cellules présentent des morphologies très variées, leur soma peut en effet être multipolaire, ovoïde ou fusiforme. On trouve plus fréquemment ces neurones dans les couches V et VI du néocortex, mais ils sont également présents dans les couches plus superficielles.

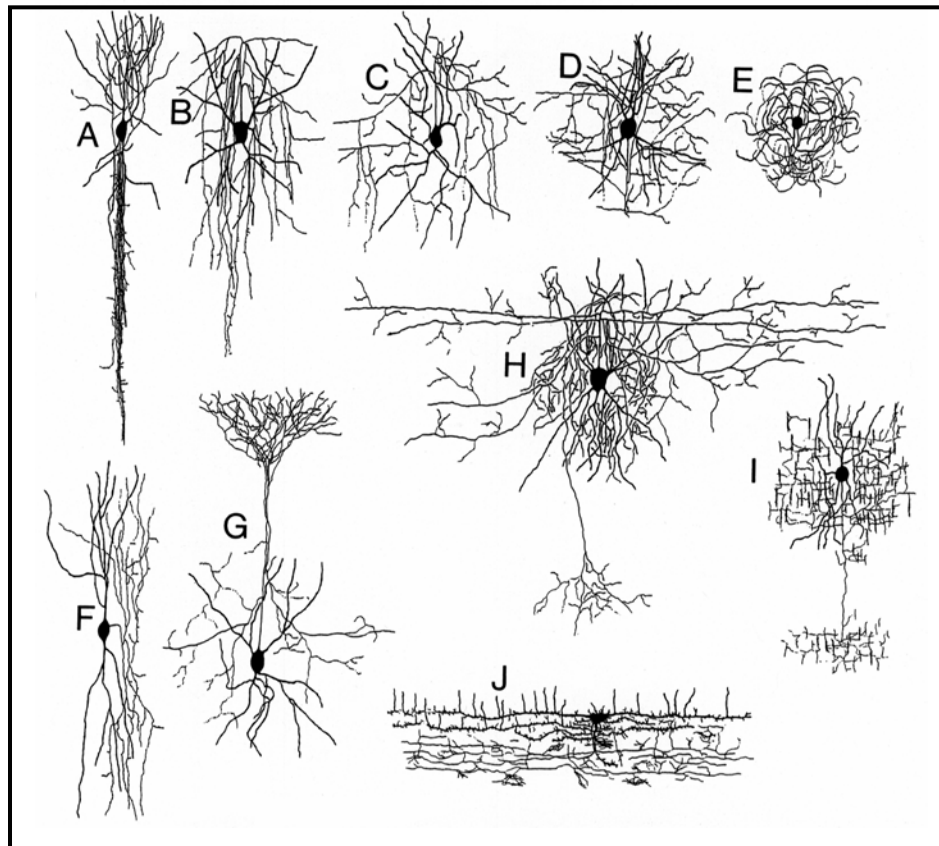


Figure 9 : Les principaux types d'interneurones GABAergiques du néocortex.

A,F : cellules à double bouquet dendritique. B,C : cellules avec une arborisation axonale extensive. D,H : petite et grande cellules en paniers. E : Cellule neurogliaforme. G : Cellule de Martinotti. I : Cellule en chandelier. J : Cellule de Cajal-Retzius. D'après DeFelipe, 1993.

Les cellules neurogliaformes (Figure 9 E).

Les cellules neurogliaformes, également appelées cellules naines ou arachniformes, se caractérisent par un corps cellulaire de petite taille, mais

surtout par une arborisation dendritique fine et abondante (*Ramón y Cajal, 1911*). L'arborisation axonale de ces neurones est très similaire à leur arborisation dendritique. Originellement décrites dans la couche II du néocortex, les cellules neurogliaformes sont présentes dans toutes les couches du néocortex (*pour revue voir Jones, 1984b*).

Les cellules bipolaires.

Les cellules bipolaires présentent un soma verticalement orienté. Des dendrites primaires émergent du pôle inférieur et supérieur du soma. Ces dendrites s'étendent sur de longues distances et ne se ramifient que très rarement sauf à leurs extrémités où elles forment des bouquets terminaux. L'axone de ces neurones émerge généralement de l'une des dendrites primaires. On trouve les corps cellulaires des cellules bipolaires de la couche II à la couche V du néocortex, mais ils sont principalement situés dans les couches supragranulaires (*Peters, 1984b; Peters & Harriman, 1988*).

Les cellules à double bouquet (Figure 9 A, F).

Les cellules à double bouquet dendritique sont très similaires aux cellules bipolaires précédemment décrites. Elles présentent en effet une double arborisation dendritique : l'une ascendante et l'autre descendante. A la différence des cellules bipolaires, les cellules à double bouquet dendritique présentent une arborisation dendritique qui se ramifie à proximité du soma (*Ramón y Cajal, 1911*), formant ainsi un faisceau vertical de dendrites (*pour revue, voir Somogyi & Cowey, 1984*). Les corps cellulaires de ces neurones sont situés dans les couches II et III.

Les cellules de Cajal-Retzius (Figure 9 J).

Ces cellules sont uniquement présentes dans la couche I du néocortex, leur large corps cellulaire donne naissance à des arborisations dendritique et axonale orientées horizontalement. Les cellules de Cajal-Retzius apparaissent de manière très précoce au cours du développement, mais semblent disparaître presque totalement à l'âge adulte (*Marin-Padilla, 1984*). On ignore aujourd'hui si la disparition de ces neurones résulte de leur mort cellulaire ou d'une modification de leur morphologie. On leur attribue un rôle important dans le développement du néocortex (*Marin-Padilla, 1998; Sarnat & Flores-Sarnat, 2002*).

Cette classification morphologique générale des interneurones néocorticaux n'est cependant pas exhaustive, certains de ces types morphologiques pouvant être subdivisés en plusieurs catégories lorsque des critères anatomiques supplémentaires sont pris en compte (*pour revue, voir Fairén et al., 1984*).

3.2. CLASSIFICATIONS NEUROCHIMIQUES.

Le développement des techniques d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ* a permis, par la suite, de définir des sous-populations d'interneurones néocorticaux, sur la base de l'expression de marqueurs biochimiques spécifiques.

Ces classifications reposent essentiellement sur l'expression de deux types de marqueurs (Naegele & Barnstable, 1989) :

- Des protéines de liaison du calcium : la calbindine-D28K, la parvalbumine et la calrétinine.
- Des neuropeptides : le neuropeptide Y, le peptide vasoactif intestinal, la somatostatine et la cholecystokinine.

Les fonctions de ces protéines de liaison du calcium et de ces neuropeptides au sein de la physiologie du néocortex restent très obscures à l'heure actuelle. Cependant, ces molécules sont d'excellents marqueurs neuroanatomiques. Elles sont en effet très cytosolubles et donc distribuées dans tous les compartiments cellulaires, ce qui permet d'apprécier la morphologie des neurones marqués. De plus, dans le système nerveux central et dans le néocortex en particulier, elles présentent une expression limitée à certaines populations neuronales.

3.2.1. LES PROTÉINES DE LIAISON DU CALCIUM.

L'expression de la calbindine-D28K (CB) ne concerne que 40 % des interneurones du néocortex et une petite sous-population de cellules pyramidales. La majorité des interneurones qui l'expriment sont situés dans les couches II-III et V-VI. Ce sont des neurones bipolaires ou multipolaires dans les couches superficielles et principalement des cellules multipolaires dans les couches profondes (*van Brederode et al., 1991; Kubota et al., 1994*). Ces neurones constituent donc une population morphologiquement hétérogène.

La parvalbumine (PV) est exprimée par la moitié des interneurones inhibiteurs, dans toutes les couches corticales, à l'exception de la couche I (*Kubota et al., 1994*). Cette population apparaît plus homogène que celle des neurones à CB. En effet, la PV est absente des cellules pyramidales, son expression est restreinte aux neurones GABAergiques. On la retrouve principalement dans les cellules en chandelier ou en panier (*van Brederode et al., 1991*).

Approximativement 20 % des interneurones inhibiteurs du néocortex expriment la calrétinine (CR). Ces neurones sont majoritairement localisés dans les couches II et III, ils ont une morphologie bipolaire ou à double bouquet, avec un soma fusiforme (*Jacobowitz & Winsky, 1991*). Dans les couches plus profondes les neurones exprimant la CR peuvent être de type bipolaire ou multipolaire.

3.2.2. LES NEUROPEPTIDES.

Dans le néocortex, le neuropeptide Y (NPY) est exprimé dans toutes les couches corticales par 5 à 10 % des interneurones (Demeulemeester et al., 1988; Kubota et al., 1994). La densité la plus élevée de neurones exprimant le NPY s'observe dans les couches II-III et VI (Hendry et al., 1984a). Bien que les neurones à NPY présentent, pour la plupart, un long neurite orienté verticalement, leur morphologie hétérogène laisse supposer l'existence de plusieurs sous-populations de neurones exprimant ce neuropeptide (Hendry et al., 1984a et 1984b; Demeulemeester et al., 1988).

Trente à 40 % des neurones GABAergiques expriment la somatostatine (SS) dans les couches II-III et V-VI du néocortex (Hendry et al., 1984b; Demeulemeester et al., 1988; Kubota et al., 1994). La morphologie de ces neurones peut être bipolaire, multipolaire, ou même orientée horizontalement dans les couches profondes (Hendry et al., 1984b). Dans les couches V et VI, on trouve également, parmi les cellules exprimant la somatostatine, les cellules de Martinotti (Wahle, 1993), ainsi que certaines cellules pyramidales (Ong et al., 1994).

Le peptide vasoactif intestinal (*vasoactive intestinal peptide* ou VIP) est exprimé par environ 20 % des interneurones néocorticaux, préférentiellement dans les couches II-III (Morrison et al., 1984; Kubota et al., 1994). Ces cellules VIPergiques présentent en majorité une morphologie bipolaire avec une organisation radiale de leurs arborisations dendritique et axonale (Peters & Harriman, 1988).

Les neurones qui expriment la cholecystokinine (CCK) sont principalement localisés dans les couches superficielles et ils présentent des morphologies assez variées (Demeulemeester et al., 1988). Dans la couche I, ce sont principalement des neurones orientés horizontalement. Dans les couches II-III, ce sont des neurones bipolaires et des cellules multipolaires en paniers (Papadopoulos et al., 1987a; Kubota & Kawaguchi, 1997). On trouve également quelques cellules pyramidales qui expriment la CCK (Schiffmann & Vanderhaeghen, 1991).

3.2.3. COMBINAISONS DE MARQUEURS BIOCHIMIQUES.

Ainsi, les protéines de liaison du calcium et les neuropeptides sont des marqueurs biochimiques qui permettent de définir des populations d'interneurones. L'étendue des recouvrements entre ces sous-ensembles n'a été que partiellement explorée car les techniques d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ* ne permettent d'étudier que l'expression de deux, voir trois marqueurs simultanément. Ainsi, il a été montré que la grande majorité (91%) des neurones exprimant la PV dans les couches II-III expriment également la CB,

alors que dans les couches V-VI, la proportion des neurones PV-positifs qui expriment la CB est très faible (6 %, *Figure 10*, Kubota et al., 1994). Par ailleurs, l'expression de la SS est fréquemment associée à celle du NPY (*Hendry et al., 1984a; Kubota et al., 1994*). De la même manière, il existe une fréquente co-expression du VIP et de la CCK au sein de la population des interneurones bipolaires (*Figure 10*, Papadopoulos et al., 1987a; Kubota & Kawaguchi, 1997). Par contre, Les neurones exprimant la SS et le VIP forment deux populations totalement distinctes (*Figure 10*, Kubota et al., 1994).

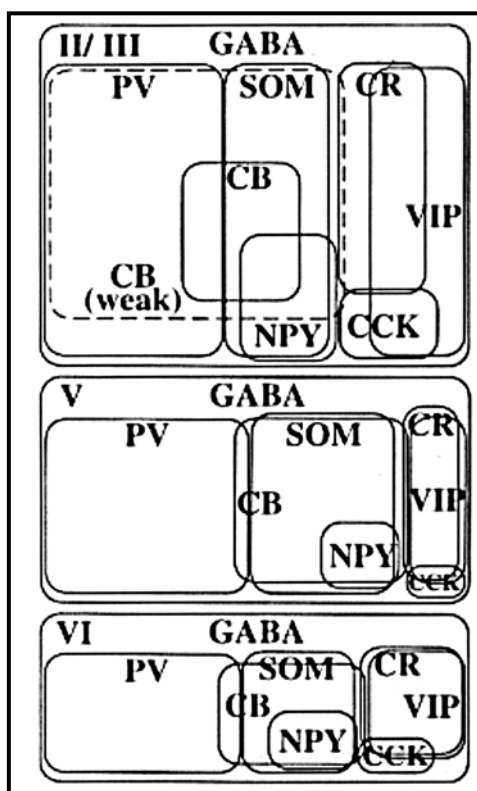


Figure 10 : Représentation schématique de la distribution de marqueurs neurochimiques parmi les interneurones GABAergiques du néocortex.

La surface des différentes aires est proportionnelle au nombre relatif de neurones immunoréactifs pour un marqueur biochimique. CB, calbindine; PV, parvalbumine; CR, calrétinine; NPY, neuropeptide Y; SOM, somatostatine; VIP, peptide vasoactif intestinal; CCK, cholecystokinine. D'après Kawaguchi & Kubota, 1997.

En utilisant ces différentes combinaisons, plusieurs auteurs ont décrit trois grandes classes d'interneurones, elles mêmes constituées de plusieurs sous-

populations (**Figure 10**, Kubota et al., 1994; Gonchar & Burkhalter, 1997; Kawaguchi & Kubota, 1997) :

- Les cellules à PV (co-exprimant fréquemment la CB, morphologiquement hétérogènes),
- Les cellules NPY/SS (co-exprimant fréquemment la CB, morphologiquement très hétérogènes),
- Les cellules VIP/CCK (co-exprimant fréquemment la CR, en majorité bipolaires).

3.3. CLASSIFICATIONS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES.

Elles ont été rendues possibles par le développement de la technique de patch-clamp sur tranches assisté par la vidéomicroscopie infrarouge (Stuart et al., 1993). En effet, avec cette technique, le neurone à enregistrer est visuellement identifié, ce qui permet de s'affranchir partiellement du problème de la faible proportion des interneurones dans le néocortex. La caractérisation électrophysiologique de ces neurones par la technique de patch-clamp a révélé une très grande diversité de profils de décharge de potentiels d'action. La possibilité d'introduire un marqueur intracellulaire (tel que l'alexafleur, la peroxydase de Raifort ou la biocytine) dans la pipette d'enregistrement, a permis d'établir des corrélations entre les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des neurones enregistrés. Enfin, quelques travaux consistant à effectuer des marquages immunocytochimiques sur des tranches de néocortex, contenant des neurones préalablement enregistrés à l'aide de la méthode de patch-clamp, ont permis d'étudier les corrélations entre les propriétés de décharge de potentiels d'actions des interneurones et l'expression de certains marqueurs biochimiques (Kawaguchi & Kubota, 1993; 1996).

Les profils de décharge des cellules à décharge rapide (*Fast Spiking* ou FS) ont été les premiers comportements électrophysiologiques décrits pour les interneurones (**Figure 11**, Connors & Gutnick, 1990, pour revue).

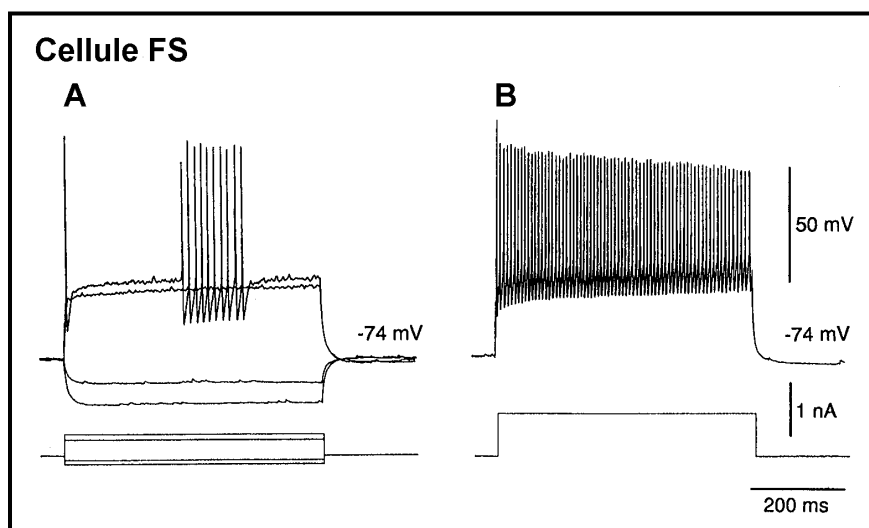


Figure 11 : Profil de décharge d'une cellule de type FS.

A : décharges de potentiels d'action induites par un courant dépolarisant proche du seuil d'émission des potentiels d'action. On note une AHP rapide et prononcée après chaque potentiel d'action. B : décharge de potentiels d'action à haute fréquence induite par un fort courant dépolarisant. D'après Kawaguchi, 1995.

Ces neurones FS sont caractérisés par l'émission de potentiels d'action à des fréquences élevées et soutenues. Leurs potentiels d'action sont très rapides et présentent une phase d'hyperpolarisation (AHP) très marquée. Ils constituent plus du tiers des interneurones du néocortex et présentent des morphologies du type cellule en panier ou en chandelier (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi, 1995). Ils expriment majoritairement la parvalbumine (Kawaguchi & Kubota, 1993; 1997; Cauli et al., 1997; 2000; Kawaguchi & Kondo, 2002). Les cellules FS constituent donc une population neuronale relativement homogène, exprimant la PV et présentant une morphologie du type cellule en panier ou en chandelier.

Les neurones à décharge tardive (*Late Spiking* ou LS, Kawaguchi, 1995) se caractérisent par le développement lent d'une rampe dépolarisante lorsqu'ils sont dépolarisés à un potentiel proche du seuil d'émission des potentiels d'action (Figure 12). Lorsque les neurones LS sont dépolarisés au delà du seuil d'émission des potentiels d'action, ils déchargent de manière répétitive en présentant une légère adaptation de fréquence. Ces neurones GABAergiques sont de type neurogliaforme et semblent n'exprimer aucun des marqueurs biochimiques précédents (Kawaguchi, 1995; Kawaguchi & Kundo, 2002). Le nombre restreint de travaux portant sur ces neurones n'a pas encore permis de mettre en évidence une éventuelle homogénéité moléculaire.

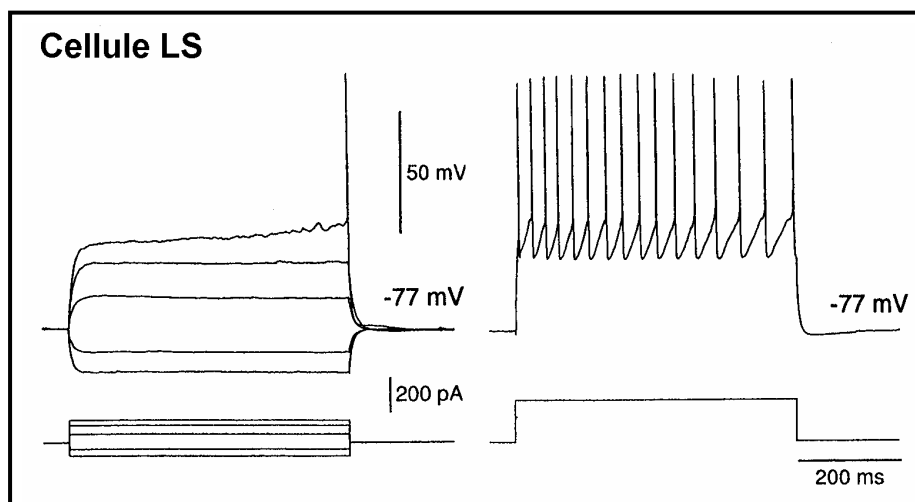


Figure 12 : Profil de décharge d'une cellule de type LS.

L'application d'un courant dépolarisant supraliminaire entraîne le développement d'une lente rampe dépolarisante avant la décharge d'un potentiel d'action (trace de gauche). Décharge répétitive de potentiels d'action induite par un fort courant dépolarisant (trace de droite). D'après Kawaguchi, 1995.

Les cellules non pyramidales à décharge habituelle (*Regular Spiking Nonpyramidal* ou RSNP, Kawaguchi, 1995; Kawaguchi & Kubota, 1996, 1997) ont des propriétés électrophysiologiques similaires à celles des neurones pyramidaux (**Figure 13**). Leurs profils de décharge présentent des propriétés d'adaptation (diminution de la fréquence des potentiels d'action au cours de la décharge) et d'accommodation (diminution de l'amplitude) très variables.

Les cellules RSNP constituent une population hautement hétérogène tant du point de vue électrophysiologique, que morphologique. On trouve en effet, au sein de cette population, des cellules bipolaires, multipolaires et des cellules de Martinotti (Kawaguchi, 1995; Kawaguchi & Kubota, 1996). De même, l'analyse de l'expression de marqueurs biochimiques a révélé une grande diversité au sein des neurones RSNP : expression de SS, CB, NPY, VIP, CR ou CCK (Kawaguchi & Kubota, 1996; Kawaguchi & Kubota, 1997; Cauli et al., 1997; 2002).

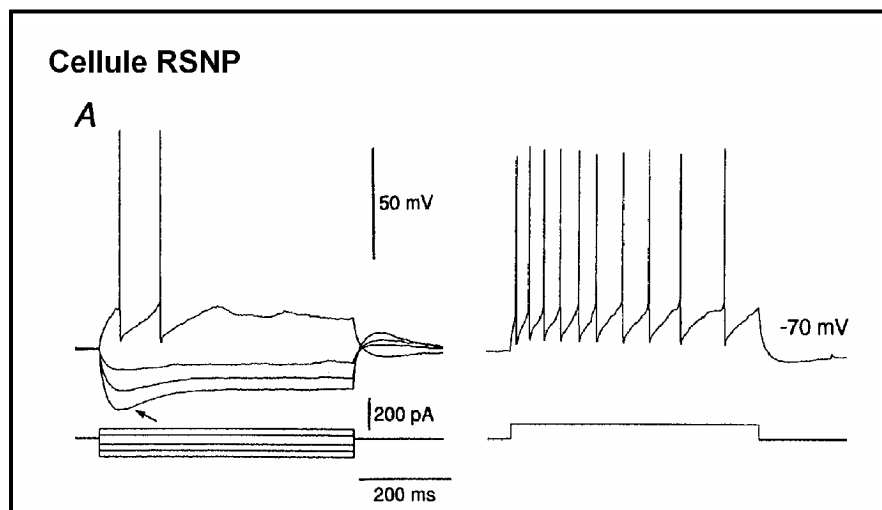


Figure 13 : Profil de décharge d'une cellule de type RSNP.

L'application d'un fort courant hyperpolarisant induit une rectification entrante (trace de gauche, flèche). L'application d'un courant dépolarisant entraîne une décharge répétitive de potentiels d'action avec une adaptation très marquée (trace de droite). D'après Kawaguchi, 1995.

Kawaguchi et ses collaborateurs (Kawaguchi, 1993, 1995; Kawaguchi & Kubota, 1993) ont pu mettre en évidence, principalement dans la couche V, un sous-type de neurones RSNP qu'ils ont d'abord appelés cellules à potentiel d'action à bas seuil (*Low Threshold Spike* ou LTS) pour les rebaptiser ensuite cellules BSNP (pour *Burst Spiking Nonpyramidal*, Kawaguchi & Kubota, 1996, 1997; Kawaguchi & Kundo, 2002, **Figure 14**).

Lorsque le potentiel de ces cellules est très hyperpolarisé, l'application d'une légère dépolarisation entraîne l'émission d'un potentiel d'action à bas seuil. Ce potentiel d'action est généré par des conductances calciques inactivées au potentiel de repos. Lors d'une dépolarisation, les cellules LTS (BSNP) déchargent de façon répétitive avec une adaptation de fréquence marquée.

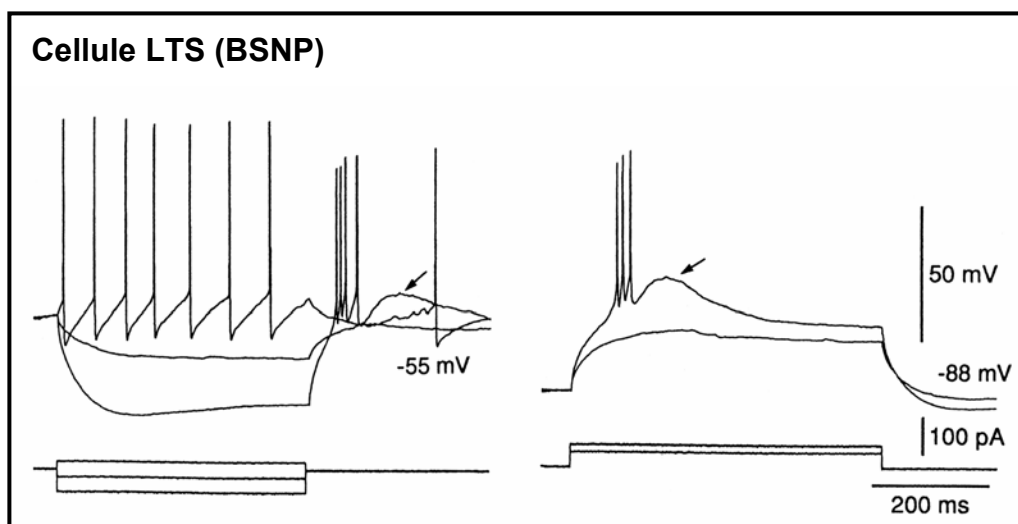


Figure 14 : Profil de décharge d'une cellule de type LTS (BSNP).

Réponses évoquées par des impulsions de courant. On note la présence d'un potentiel d'action à bas seuil (flèches) après l'arrêt d'une impulsion de courant hyperpolarisant (trace de gauche), ou lors d'une dépolarisation à partir un potentiel hyperpolarisé (trace de droite). L'application d'un courant dépolarisant induit une décharge répétitive de potentiels d'action avec une adaptation de fréquence (trace de gauche). D'après Kawaguchi, 1995.

Les neurones LTS (BSNP) peuvent être multipolaires ou bipolaires et présentent souvent une arborisation axonale verticalement orientée. Ces neurones présentent une grande diversité de marqueurs biochimiques : expression de VIP, SS, CCK, CB et CR (Kawaguchi, 1995; Kawaguchi & Kubota, 1996). À l'instar des cellules RSNP, les neurones LTS (BSNP) présentent donc, une large hétérogénéité morphologique et biochimique.

3.4. L'APPORT DE LA RT-PCR SUR CELLULE UNIQUE A L'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ DES INTERNEURONES GABAERGIQUES.

Les diverses classifications que nous venons d'évoquer soulignent l'étendue de la diversité des interneurones du néocortex. Cependant, en grande partie à cause de limitations techniques, elles ne sont basées que sur un nombre restreint de critères. Les approches les plus complètes, combinant le patch-clamp aux marquages intracellulaires et immunocytochimiques, représentent un travail considérable et restent limitées à l'étude de l'expression d'un ou deux marqueurs biochimiques (Kawaguchi & Kubota 1993; 1996). De ce fait, il est difficile d'établir des corrélations claires entre les divers types neuronaux ainsi décrits.

La technique de RT-PCR* sur cellule unique (Lambolez *et al.*, 1992) a permis d'étendre le nombre de descripteurs analysés par cellule. Cette technique s'est avérée un outil d'analyse très précieux, non seulement parce qu'elle permet l'étude de l'expression de nombreux ARN messagers à partir d'une seule cellule, mais surtout parce qu'elle peut être couplée à des enregistrements électrophysiologiques et à des marquages intracellulaires. Ainsi, la combinaison du patch-clamp, de la RT-PCR sur cellule unique et de marquages histochimiques, au niveau d'un neurone, permet d'accéder à une quantité de données considérables.

Les propriétés de décharge de potentiels d'actions et les profils d'expression de sept marqueurs biochimiques (CB, CR, PV, NPY, SS, VIP et CCK) des interneurones inhibiteurs du néocortex de rat ont été étudiés de manière systématique, grâce au couplage du patch-clamp à la RT-PCR sur cellule unique (Cauli *et al.*, 1997).

Cette étude a permis de confirmer le caractère homogène des interneurones à profil de décharge de type FS qui expriment majoritairement la PV et, au contraire, le caractère hétérogène des neurones à profil de décharge de type RSNP. En effet, les sept marqueurs biochimiques ont été détectés dans ces neurones, de manière plus fréquente toutefois pour la CB (65 %) et la SS (58 %). Des potentiels d'action à bas seuil (LTS) ont été détectés dans 20 % des neurones à décharge de type RSNP.

Néanmoins, ce travail a permis d'identifier une population d'interneurones homogène sur les plans morphologique, biochimique et électrophysiologique : les neurones IS (*Irregular Spiking*, *Figure 15*).

En effet, 15% des neurones analysés dans cette étude furent caractérisés par une décharge de potentiels d'action irrégulière, consistant en l'émission d'une bouffée initiale de potentiels d'action suivie de potentiels d'action émis à une fréquence irrégulière (*Figure 15 A*). Tous ces neurones présentaient un corps cellulaire fusiforme et une arborisation dendritique verticale bipolaire ou bitouffue, très peu étendue latéralement (*Figure 15 B, C*). De plus, la totalité des neurones IS exprimait le VIP et la CR (*Figure 15 D*).

* La RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) est une transcription inverse des ARN messagers par la reverse transcriptase suivie de l'amplification des ADN complémentaires par réaction en chaîne de l'ADN polymérase.

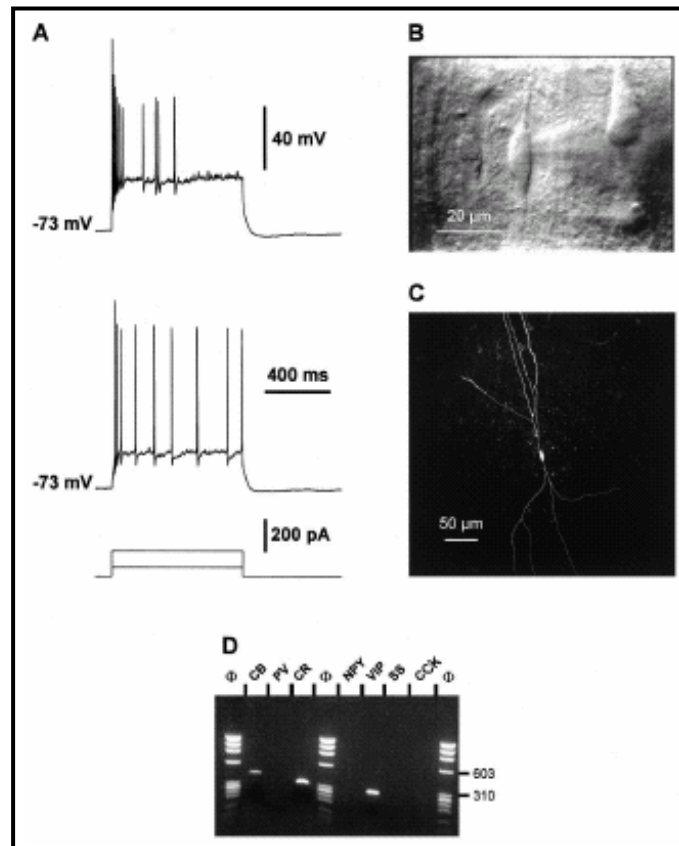


Figure 15 : Caractérisation électrophysiologique, morphologique et moléculaire d'un neurone IS de la couche V.

A : Décharges de potentiels d'action obtenues par injection de courants dépolarisants (traces du bas). B : Image en vidéomicroscopie infrarouge du neurone qui présente un soma fusiforme verticalement orienté. C : Le marquage intracellulaire à la biocytine de ce neurone a révélé une morphologie à double bouquet dendritique s'étendant de la couche II (haut de l'image) à la couche VI. D : Analyse par RT-PCR du même neurone montrant l'expression de CB, CR et VIP. D'après Cauli et al., 1997.

Afin de préciser les limites de cette population neuronale par rapport aux autres types cellulaires du néocortex, une étude de classification a été effectuée par la suite sur les interneurones à soma fusiforme verticalement orienté, c'est à dire présentant une morphologie à double bouquet ou bipolaire (Cauli et al. 2000). Parmi les nombreux types morphologiques des interneurones, les cellules à soma fusiforme présentent en effet une très grande diversité de propriétés de décharge et d'expression de marqueurs biochimiques, ce qui suggère l'existence de types neuronaux distincts au sein de cette population (Kawaguchi & Kubota, 1993; Kawaguchi, 1995; Cauli et al., 1997).

Une méthode de classification multifactorielle a été utilisée dans cette étude pour analyser le grand nombre de données électrophysiologiques et moléculaires obtenues par le couplage du patch-clamp à la RT-PCR sur cellule unique. Cette méthode appelée classification hiérarchique ascendante (*Ward, 1963*) permet de grouper les individus les plus semblables et de séparer les individus les plus différents (*Figure 16*). Les cellules FS et les cellules pyramidales formant des populations cellulaires homogènes du point de vue électrophysiologique et moléculaire, elles ont été utilisées comme contrôles pour valider l'approche utilisée dans cette étude.

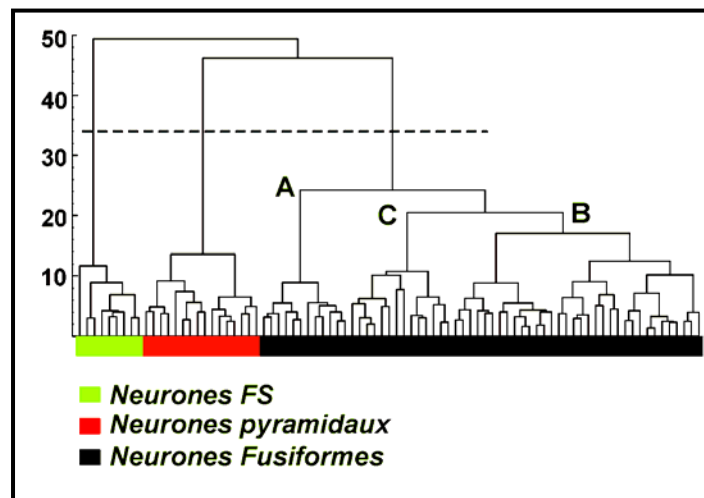


Figure 16 : Classification hiérarchique ascendante appliquée aux interneurones fusiformes, les interneurones FS et les neurones pyramidaux étant utilisés comme contrôles.

Les individus sont représentés en abscisse, la distance moyenne entre les groupes (ou individus) est représentée en ordonnée. Cette analyse a révélé trois groupes parmi les interneurones fusiformes : Les interneurones RSNP exprimant majoritairement la SS (branche A), les interneurones RSNP exprimant majoritairement le VIP (branche B) et les interneurones IS (branche C). D'après Cauli et al., 2000.

Ce travail de classification a révélé l'existence de trois classes d'interneurones fusiformes présentant des propriétés distinctes : les interneurones RSNP-SS, les interneurones RSNP-VIP et les interneurones IS (*Figure 16, 17, Cauli et al. 2000*).

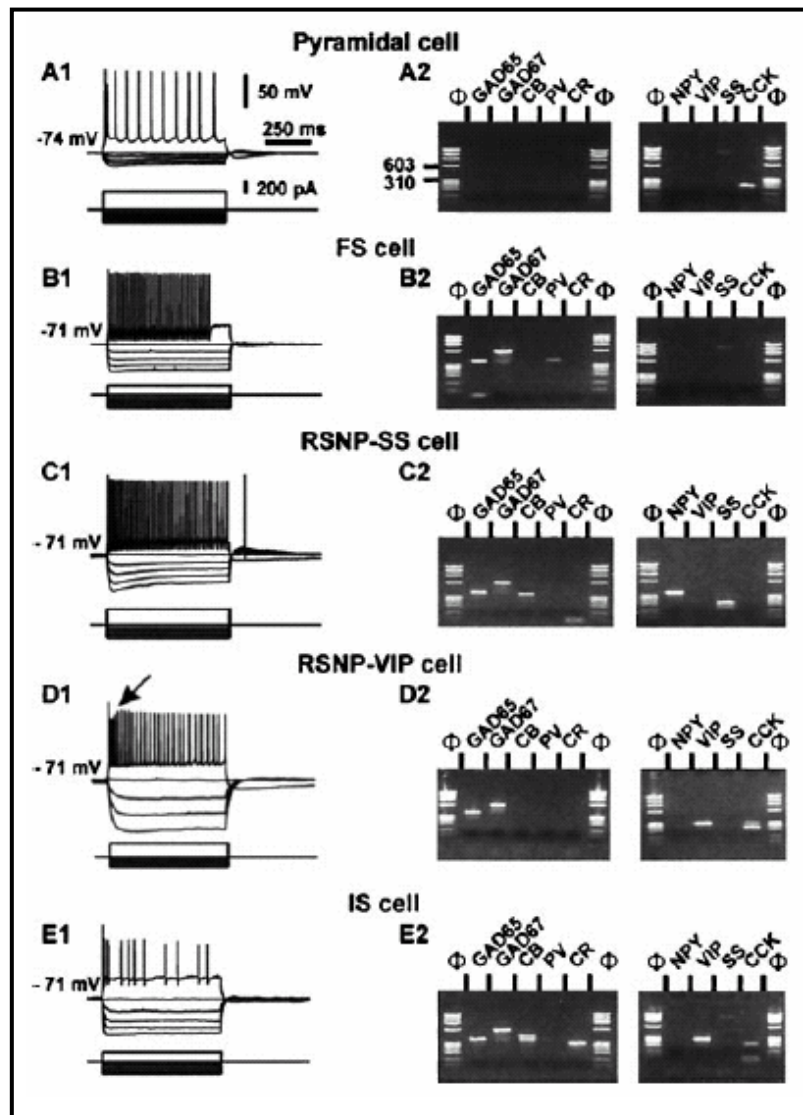


Figure 17 : Caractéristiques électrophysiologiques et moléculaires des 5 types neuronaux révélés par la classification hiérarchique ascendante.

Les traces de gauche illustrent les décharges de potentiels d'action de ces 5 types neuronaux (la flèche indique le rebond d'amplitude des potentiels d'action caractéristique des neurones RSNP-VIP). L'analyse moléculaire de ces neurones typiques est présentée à droite. L'expression des enzymes de synthèse du GABA (GAD 65 et GAD 67) atteste du caractère GABAergique inhibiteur des interneurones. D'après Cauli et al., 2000.

Les interneurones RSNP-SS sont caractérisés par un profil de décharge du type RSNP et l'expression fréquente de la SS (Figure 17 C, 18). Les interneurones RSNP-VIP sont caractérisés par l'expression majoritaire du VIP et un profil de

décharge du type RSNP, avec toutefois un profil d'accommodation d'amplitude des potentiels d'action différent de celui des cellules RSNP-SS (*Figure 17 D, 18*). Enfin, les interneurones IS sont caractérisés par une décharge de potentiels d'action de type irrégulière, l'expression systématique du VIP et l'expression très fréquente de la calrétinine (*Figure 17 E, 18*).

	Pyr (n=9)	FS (n=16)	RSNP-SS (n=12)	RSNP-VIP (n=32)	IS (n=16)
GAD 65			92	88	94
GAD 67		94			94
CB	44	56	75	25	50
PV		69			6
CR	22	13	25	53	81
NPY		50	33	19	19
VIP	22	13	17	91	
SS	11	38	92	25	25
CCK	67	31		81	63
	0%	0-33%	34-66%	67-99%	100%

Figure 18 : Profil d'expression de marqueurs moléculaires des 5 types neuronaux révélés par la classification hiérarchique ascendante.

Les cellules pyramidales (Pyr) n'expriment pas les enzymes de synthèse du GABA (GAD 65 et GAD 67). Les cellules FS expriment principalement la parvalbumine (PV) et le neuropeptide Y (NPY). Les neurones RSNP-SS expriment majoritairement la calbindine (CB) et la somatostatine (SS). Les cellules RSNP-VIP et IS expriment fortement le peptide vasoactif intestinal (VIP), la cholecystokinine (CCK) et la calrétinine (CR). D'après Cauli et al., 2000.

Il apparaît, à l'issue de la classification hiérarchique ascendante, que les classes neuronales les plus proches sont celles des interneurones RSNP-VIP et des interneurones IS (*Figure 16*). Ces neurones ont en effet un profil similaire du point de vue des marqueurs biochimiques qu'ils expriment (*Figure 18*). Ils expriment très fréquemment le VIP (91 et 100 %, respectivement), mais aussi la CCK (81 et 63 %, respectivement). Parmi les protéines de liaison du calcium, ils expriment majoritairement la calrétinine (53 et 81 %, respectivement).

Nous verrons par la suite que les interneurones RSNP-VIP et IS partagent, outre ces caractéristiques neurochimiques, un ensemble de propriétés fonctionnelles communes. Ainsi, ces deux populations neuronales seront groupées sous le terme d'interneurones VIP/CCK.

4. MODULATION DE L'ACTIVITÉ DU RÉSEAU NÉOCORTICAL.

L'analyse conjointe des propriétés morphologiques, neurochimiques et électrophysiologiques des interneurons inhibiteurs du néocortex, combinée à une méthode de classification multifactorielle des individus, permet donc de définir des classes d'interneurones distinctes. Se pose alors le problème de la fonction de ces populations neuronales dans la physiologie du néocortex. En effet, pour valider la pertinence de cette approche de classification, il est nécessaire de montrer que ces populations neuronales partagent, outre des caractéristiques intrinsèques, des propriétés fonctionnelles spécifiques. Pour aborder cet aspect, il est nécessaire de replacer les interneurons GABAergiques dans leur contexte : le réseau néocortical.

4.1. LE RÉSEAU NÉOCORTICAL.

Les neurones du néocortex sont connectés les uns aux autres par des contacts synaptiques, formant ainsi ce que l'on appellera le réseau néocortical. Un neurone pyramidal du cortex humain reçoit et projette approximativement 40 000 synapses dont au moins 70 % sont d'origine intracortical (Connors & Amitai, 1995). Du fait de son extrême complexité, l'organisation des connections au sein du réseau néocortical n'est que très partiellement élucidée à l'heure actuelle, et nous n'en ferons pas ici de description détaillée (*pour revue, voir Kawaguchi & Kubota, 1997; Somogyi et al., 1998; Thomson & Bannister, 2003*). La **Figure 19** résume, de manière très simplifiée, les connections majeures existant entre les grands types neuronaux du néocortex. Les synapses chimiques de type glutamatergique et GABAergique constituent les composantes excitatrices et inhibitrices de base du réseau néocortical. Ces connections permettent un transfert rapide de l'information (de l'ordre de la milliseconde), le réseau néocortical est donc une structure très dynamique au sein de laquelle les neurones sont activés selon des motifs spatio-temporels précis. De plus, le néocortex comprend des synapses électriques. Celles-ci ont d'abord été mises en évidence au sein des populations d'interneurones GABAergiques de type FS et LTS (Galarreta & Hestrin, 1999; Gibson et al. 1999; Tamas et al., 2000). Néanmoins, d'autres études suggèrent qu'il existe de tels couplages électriques au sein d'autres population d'interneurones (Blatow et al., 2003), voire même entre des neurones appartenant à types neuronaux distincts (Venance et al., 2000). Ces couplages électriques contribueraient à la synchronisation fine des interneurons

(Beierlein et al., 2000; Galarreta & Hestrin, 2001), qui participe à la génération de rythmes variant selon les états de vigilance (Steriade, 1997; Fricker & Miles, 2001).

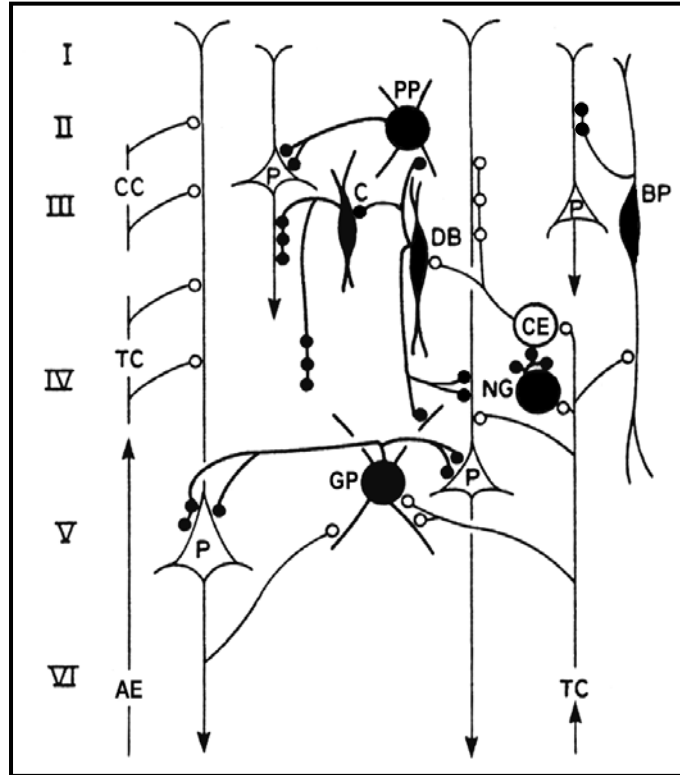


Figure 19 : Connexions principales entre les éléments neuronaux du réseau néocortical.

Les interneurones GABAergiques inhibiteurs sont représentés en noir. Les neurones glutamatergiques excitateurs sont représentés en blanc. Les terminaisons GABAergiques et glutamatergiques sont représentées par des ronds noirs et blancs, respectivement. C : cellule en chandelier, GP : grande cellule en panier, PP : petite cellule en panier, DB : cellule à double bouquet dendritique, NG : cellule neurogliaforme, BP : cellule bipolaire, P : cellule pyramidale, CE : cellule étoilée, AE : afférences extrinsèques, CC : fibres cortico-corticales, TC, fibres thalamo-corticales. Adapté, d'après Houser et al., 1984.

Enfin, l'expression de nombreux neuropeptides et de leurs récepteurs au sein du néocortex suggère l'existence d'une régulation peptidergique paracrine intrinsèque de l'activité néocortical. Cependant, comme nous l'avons mentionné plus tôt, le mode d'action de ces neuropeptides est encore très obscur à l'heure

actuelle. Parmi les neuropeptides exprimés dans le néocortex, on compte, outre les peptides classiquement utilisés comme marqueurs biochimiques de populations neuronales restreintes (NPY, SS, VIP, CCK), des tachikines, la corticolibérine (ou *corticotropin releasing factor*, CRF) ou encore des peptides opioïdes tels que la dynorphine ou l'enképhaline. Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à la modulation de l'activité du réseau néocortical par les peptides opioïdes. Nous verrons que les interneurons GABAergiques jouent un rôle spécifique dans ces mécanismes de neuromodulation.

Le réseau néocortical est avant tout une unité d'intégration. Il reçoit des afférences glutamatergiques excitatrices provenant du thalamus (*pour revue, voir Sherman & Guillery, 1996*). Les fibres thalamo-corticales terminent leur course au niveau de la couche IV où elles contactent les cellules étoilées et les cellules pyramidales. Ces afférences thalamiques contactent également les dendrites apicales des cellules pyramidales des couches V et VI, et les dendrites basales des cellules pyramidales de la couche III. Enfin, différentes études ont rapporté l'innervation d'interneurons GABAergiques, de type multipolaires ou à double bouquet dendritique, par les fibres thalamo-corticales (*pour revue, voir White, 1986*). Après traitement et intégration des signaux au sein du réseau néocortical, les cellules pyramidales vont envoyer des efférences glutamatergiques vers d'autres structures corticales et des structures sous-corticales telles que la moelle épinière, le noyau rouge, le striatum ou le thalamus (*pour revue, voir Jones, 1984c*).

Les interneurons GABAergiques inhibiteurs, en modulant l'activité de ces cellules pyramidales efférentes, peuvent contrôler les sorties corticales. L'influence de l'activité des interneurons sur ces efférences varie en fonction de la quantité et de la distribution des contacts synaptiques GABAergiques qu'ils forment sur les cellules pyramidales (*Thomson & Deuchars, 1997; Somogyi et al., 1998*). Pour exemple, les cellules en chandelier, qui forment des contacts synaptiques au niveau du segment initial de l'axone des cellules pyramidales, vont directement moduler le signal de sortie des neurones principaux. Par opposition, les cellules qui forment des contacts synaptiques sur les dendrites distales des cellules pyramidales, telles que les cellules de Martinotti, vont moduler leurs propriétés d'intégration.

En plus des afférences thalamiques glutamatergiques, le néocortex reçoit des afférences neuromodulatrices telles que les afférences cholinergiques, sérotoninergiques, noradrenergiques ou dopaminergiques qui proviennent, respectivement, des noyaux de la base, des noyaux du raphé, du locus coeruleus et de l'aire tegmentale ventrale (*Figure 20*).

Ces substances neuromodulatrices sont impliquées dans de nombreuses fonctions cognitives telles que l'attention, la motivation, l'apprentissage et la mémoire. La manière dont elles influent sur l'activité du réseau néocortical est complexe. En effet, elles peuvent avoir des effets très différents selon les types de récepteurs qu'elles activent et la nature de leurs cibles post-synaptiques (*pour revue, voir Gu, 2002*). Dans cette étude, nous nous intéresserons à la modulation de l'activité néocorticale par les voies cholinergiques et sérotoninergiques afférentes. La participation des interneurons GABAergiques dans ces phénomènes sera plus particulièrement étudiée.

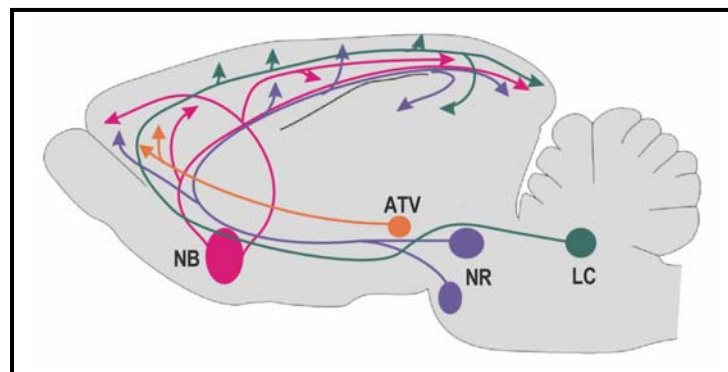


Figure 20 : Afférences cholinergiques, sérotoninergiques, dopaminergiques et noradrenergiques du néocortex de rat.

Les afférences cholinergiques originaires des noyaux de la base (NB) sont représentées en rose. Les afférences sérotoninergiques originaires des noyaux du raphé (NR) sont représentées en bleu. Les afférences dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale (ATV) sont représentées en orange. Les voies noradrenergiques originaires du locus coeruleus (LC) sont représentées en vert.

L'acétylcholine et la sérotonine sont considérées comme des substances neuromodulatrices dans le néocortex, car il existe peu de résultats montrant l'existence d'une transmission cholinergique ou sérotoninergique de type synaptique dans cette structure (*Roerig et al., 1997; Chu et al., 2000*). De plus, de nombreux récepteurs métabotropiques à ces substances sont exprimés dans le néocortex. Ces récepteurs sont couplés à des voies de signalisation intracellulaires dont l'activation peut induire l'ouverture ou la fermeture de diverses conductances membranaires. Ils sont donc impliqués dans les mécanismes de neuromodulation, leurs effets interviennent à des échelles de temps bien supérieures à celle de la transmission synaptique (*pour revue, voir Deterre & Tritsch, 1998*). Néanmoins, des récepteurs de type ionotropique, ou

récepteurs canaux, à l'acétylcholine et à la sérotonine sont également présents dans le néocortex. Ces récepteurs, contrairement aux récepteurs métabotropiques, peuvent induire une excitation rapide des neurones par un couplage direct entre leur activation et l'ouverture d'un canal cationique (*pour revue, voir Feltz, 1998*). Ils sont donc susceptibles d'intervenir dans des mécanismes de neurotransmission de type synaptique. En outre, l'observation des terminaisons axonales des fibres cholinergiques et sérotoninergiques révèle l'existence de contacts synaptiques différenciés sur les neurones néocorticaux. Ces données suggèrent que l'acétylcholine et la sérotonine peuvent avoir des effets ciblés à court terme dans le néocortex. Parce qu'ils expriment sélectivement des récepteurs ionotropiques à l'acétylcholine et à la sérotonine, nous verrons que les interneurons VIP/CCK constituent une cible préférentielle de ces effets précoces.

4.2. MODULATION CHOLINERGIQUE.

4.2.1. LES AFFÉRENCES CHOLINERGIQUES.

L'acétylcholine est impliquée dans un grand nombre de fonctions cognitives telles que l'apprentissage, la mémoire et l'attention (*Everitt & Robbins, 1997; Sarter & Bruno, 1994; 1999; McGaughy et al., 2000*). Les démences associées à la maladie d'Alzheimer et à la maladie de Parkinson sont dues, au moins en partie, à la perte de l'innervation cholinergique du néocortex (*Coyle et al., 1983; Davies & Maloney, 1976; Ruberg et al., 1982*).

Les fibres cholinergiques qui innervent le néocortex sont originaires pour la plupart du noyau basal magnocellulaire (aussi nommé noyau basal de Meynert chez l'homme, *Johnston et al., 1981; Mesulam et al., 1983*). Ces fibres projettent sur le néocortex de manière topographique, selon un gradient rostro-caudal, ventro-dorsal et medio-latéral (*Luiten et al., 1985; 1987*). Elles pénètrent dans la substance grise et débutent leur trajectoire au niveau de la couche VI puis terminent leur course principalement au niveau des couches V et I (*Figure 21, Kristt et al., 1985; Mechawar et al., 2000*). Ainsi, les fibres cholinergiques sont présentes dans toutes les couches et toutes les aires corticales (*Lysakowski et al., 1989*).

De plus, le marquage immunocytochimique d'une enzyme de biosynthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransferase, a révélé la présence de neurones cholinergiques au sein du néocortex de rat (*Eckenstein & Thoenen, 1983; Levey et al., 1984*). Ces neurones bipolaires, localisés préférentiellement dans les couches supragranulaires, sont de nature GABAergique et contiennent le neuropeptide VIP (*Parnavelas et al., 1986; Chédotal et al., 1994; Bayraktar et al., 1997; Cauli et al.,*

1997; Porter et al., 1998). Le rôle fonctionnel de ces interneurons cholinergiques, au sein du réseau néocortical n'est pas clairement établi. En outre, ces neurones cholinergiques intracorticaux ne semblent pas présent chez les primates (Hedreen et al., 1983; Mesulam et al., 1992).

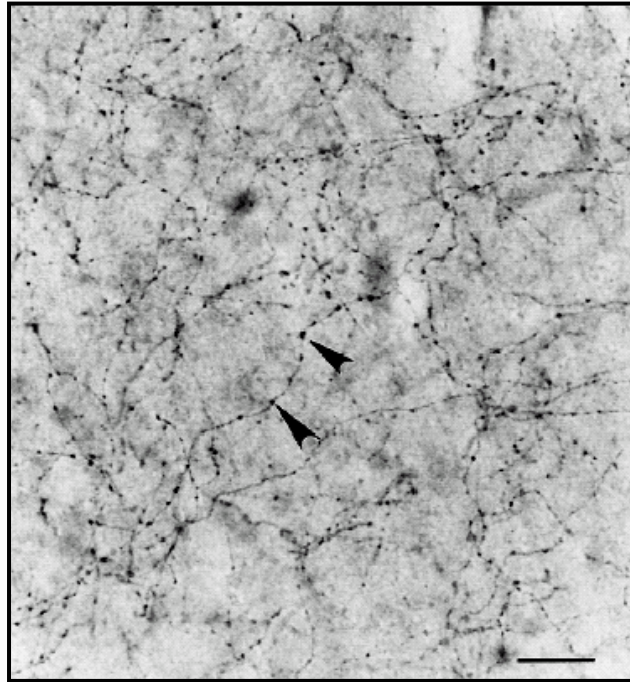


Figure 21 : Fibres cholinergiques innervant la couche I du néocortex humain.

Le marquage immunocytochimique de l'enzyme de biosynthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransferase révèle une forte densité d'axones cholinergiques dans la couche I du néocortex. Ces axones sont de petit diamètre et présentent de nombreuses varicosités (têtes de flèches). Barre d'échelle : 25 μ m. D'après Smiley et al., 1997.

L'observation des terminaisons cholinergiques en microscopie électronique a révélé la présence de boutons axonaux au contact des cellules pyramidales et des interneurons GABAergiques du néocortex (Wainer et al., 1984; De Lima & Singer, 1986; Beaulieu & Somogyi, 1991). Diverses études indiquent que ces boutons ne forment pas systématiquement de jonctions synaptiques. La proportion de varicosités axonales formant des synapses effectives variant selon les espèces [\approx 67 % chez l'homme (Smiley et al., 1997), \approx 44 % chez le macaque (Mrzljak et al., 1995), et seulement \approx 15 % chez le rat (Umbriaco et al. 1994)]. Cependant, ces résultats sont sujets à controverse, une prévalence de terminaisons synaptiques ayant été décrite récemment chez le rat (Turrini et al., 2001).

4.2.2. LES RÉCEPTEURS CHOLINERGIQUES.

L'acétylcholine peut agir sur les neurones néocorticaux via l'activation de deux grands types de récepteurs : les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques.

4.2.2.1 Les Récepteurs Muscariniques.

Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs métabotropiques. Ce sont des glycoprotéines à sept segments transmembranaires capables d'interagir avec des protéines G. A l'heure actuelle, on dénombre 5 récepteurs muscariniques (M1-5) dont les gènes ont été clonés (m1-5, *Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987*). Ces récepteurs sont séparés en deux groupes :

- Les récepteurs M1, M3, M5 couplés positivement à la phospholipase C via une protéine G insensible à la pertussis toxine (G_q),
- Les récepteurs M2, M4 couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine G sensible à la pertussis toxine (G_i , pour revue voir *Caulfield, 1993*).

L'activation de ces récepteurs peut induire la modulation de nombreuses conductances, principalement de type potassique et calcique.

Des études immunocytochimiques ont révélé la présence de tous ces récepteurs au sein du néocortex, avec toutefois des niveaux d'expression très variables. Le récepteur M1 est sans conteste le plus abondant, avec une densité particulièrement élevée au niveau des couches II et III. Les récepteurs M2 et M4 sont exprimés en moindre quantité (*Levey et al., 1991*), suivis par le récepteur M3 (*Levey et al., 1994*) et le récepteur M5 dont l'expression est la plus faible (*Yasuda et al., 1993*).

Les récepteurs muscariniques ont été localisés dans des cellules pyramidales et des interneurons GABAergiques du néocortex. Cependant, il existe peu de données concernant la distribution précise de ces récepteurs parmi les différents types neuronaux qui constituent le réseau néocortical.

L'implication des récepteurs muscariniques dans la modulation de l'activité du réseau néocortical par l'acétylcholine a été étudiée par des approches électrophysiologiques. Ainsi, l'activation de ces récepteurs a un effet biphasique sur les cellules pyramidales, consistant en une hyperpolarisation rapide suivie par une réponse excitatrice plus lente. Le blocage de la transmission GABAergique entraîne la disparition de la première composante inhibitrice, indiquant qu'elle est indirecte et résulte de l'activation d'interneurons inhibiteurs. Par contre, la réponse excitatrice lente est résistante au blocage de la transmission synaptique. Cette dépolarisation résulte du blocage de conductances potassiques de type I_M et I_{AHP} (*McCormick & Prince, 1985; 1986*). Au

niveau des interneurons GABAergiques, différents types de réponses à l'activation des récepteurs muscariniques ont été observées. Les interneurons à somatostatine répondent à l'application de muscarine (agoniste sélectif des récepteurs muscariniques) par une dépolarisation rapide résultant de l'activation de conductances cationiques (Kawaguchi, 1997). Des réponses similaires ont été obtenues dans les interneurons qui expriment le peptide vasoactif intestinal ou la cholecystokinine (Kawaguchi, 1997). Par contre, pour les interneurons multipolaires exprimant la cholecystokinine, l'activation des récepteurs muscariniques entraîne une hyperpolarisation suivie d'une dépolarisation, cette réponse biphasique étant résistante au blocage de la transmission synaptique (Kawaguchi, 1997). Enfin, les résultats concernant les interneurons de type FS, sont contradictoires, rapportant une absence de réponse à la muscarine (Kawaguchi, 1997), ou une réponse inhibitrice hyperpolarisante, induite par l'activation de conductances potassiques (Xiang et al., 1998).

La régulation de la transmission synaptique par les récepteurs muscariniques a également été étudiée par l'enregistrement de potentiels post-synaptiques au niveau des cellules pyramidales. Ces études ont révélés que l'activation des récepteurs muscariniques pré-synaptiques peut induire une diminution de la transmission synaptique de type glutamatergique et cholinergique (Vidal & Changeux, 1993; Gil et al., 1997; Douglas et al., 2001). Enfin, il a été démontré récemment que l'activation des récepteurs muscariniques peut générer des activités rythmiques synchrones dans le néocortex *in vitro* (Kondo & Kawaguchi, 2001; Beierlein et al., 2000).

4.2.2.2. Les Récepteurs Nicotiniques.

Contrairement aux récepteurs muscariniques, les récepteurs nicotiniques appartiennent à la famille des récepteurs ionotropiques, ou récepteurs-canaux. Ils sont donc susceptibles d'intervenir dans une transmission rapide du signal. Leur structure est pentamérique, chaque sous-unité comportant 4 domaines transmembranaires (M1-M4). Les domaines M2 de chaque sous-unité contribuent à la formation du pore du canal, ils sont donc responsables de la perméabilité aux ions cationiques (Ca^{2+} , Na^{+} et K^{+} , Galzi & Changeux, 1995).

Les récepteurs nicotiniques neuronaux comprennent deux types de sous-unités, les sous-unités α et les sous-unités β . Douze gènes codant pour ces sous-unités ont été clonés à l'heure actuelle ($\alpha 2$ - $\alpha 10$; $\beta 2$ - $\beta 4$). Dans le système nerveux des mammifères, on distingue deux grands types de récepteurs nicotiniques :

- Les récepteurs homomériques formés de l'assemblage de cinq sous-unités $\alpha 7$, caractérisés par leur sensibilité à l' α -bungarotoxine.

- Les récepteurs formés par l'assemblage de deux sous-unités α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ ou $\alpha 6$) et de 3 sous-unités β ($\beta 2$ ou $\beta 4$), insensibles à l' α -bungarotoxine.

Ces récepteurs diffèrent en général par leurs cinétiques de désensibilisation, leurs états de conductance et leurs temps d'ouverture. Des expériences d'hybridation *in situ* ont révélé que les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 2$ sont exprimées dans le néocortex (Wada *et al.*, 1989; 1990; Lena & Changeux, 1997).

Dans cette structure comme dans d'autres régions du cerveau, les récepteurs $\alpha 7$, présents au niveau de certaines terminaisons axonales excitatrices, modulent la libération de glutamate (Vidal & Changeux, 1993; McGehee *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1996; Role & Berg, 1996; MacDermott *et al.*, 1999). L'activation de ces récepteurs induit notamment une augmentation de la libération de glutamate par les fibres thalamo-corticales (Gil *et al.*, 1997). L'étude de la distribution des récepteurs $\alpha 7$ en microscopie électronique a révélé que ces récepteurs sont également présents au niveau des densités post-synaptiques des cellules excitatrices du néocortex (Lubin *et al.*, 1999; Levy & Aoki, 2002). Une étude menée par Chu et ses collaborateurs (2000) rapporte l'existence de courants post-synaptiques nicotiniques au niveau de cellules pyramidales, qui pourraient résulter de l'activation de ces récepteurs $\alpha 7$ post-synaptiques. Cependant, les cellules pyramidales ne sont pas directement dépolarisées lors de l'application d'agonistes nicotiniques (Vidal & Changeux, 1993; Porter *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 1997). La présence de ces récepteurs $\alpha 7$ post-synaptiques dans les cellules excitatrices du néocortex reste donc à confirmer.

Par contre, plusieurs études ont démontré l'expression de récepteurs nicotiniques post-synaptiques au niveau de certaines populations d'interneurones GABAergiques (Xiang *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 1999; Christophe *et al.*, 2002). Au niveau des couches II, III et V du néocortex, l'application d'un agoniste nicotinique induit des réponses dépolarisantes excitatrices rapides dans les interneurones GABAergiques de type IS et certains interneurones de type RSNP (Porter *et al.*, 1999). Les réponses dépolarisantes, induites par les agonistes nicotiniques sur ces neurones, résistent au blocage de la transmission synaptique, elles résultent donc de l'activation de récepteurs post-synaptiques. L'analyse moléculaire des interneurones sensibles aux agonistes nicotiniques, par RT-PCR sur cellule unique, a confirmé leur nature GABAergique et a révélé un fort taux d'expression du VIP (88 %) et de la CCK (78 %). Ces résultats indiquent que les interneurones RSNP sensibles aux agonistes nicotiniques sont des interneurones du type RSNP-VIP. Nous avons souligné plus haut que les interneurones RSNP-VIP et IS sont similaires en ce qui concerne leur profil d'expression de marqueurs biochimiques. Il apparaît ici que ces deux populations d'interneurones constituent une cible spécifique des agonistes nicotiniques dans le néocortex. Ils

partagent donc certainement une fonction commune dans la régulation de l'activité corticale par les fibres cholinergiques afférentes. En outre, cette étude a montré une expression majoritaire des sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 4$ et $\beta 2$ dans ces interneurons (100, 94 et 65 %, respectivement). Bien que la sous-unité $\alpha 7$ ait été détectée dans 41 % des interneurons sensibles à la nicotine, les expériences pharmacologiques, confirment l'implication majoritaire de récepteurs de type non $\alpha 7$ dans ces réponses nicotiques post-synaptiques (Porter *et al.*, 1999). Une étude combinant de manière similaire l'électrophysiologie à la RT-PCR sur cellule unique a montré qu'une majorité des neurones de la couche I du néocortex sont sensibles aux agonistes nicotiques (Christophe *et al.*, 2002). Les réponses excitatrices enregistrées dans ces interneurons sont résistantes au blocage de la transmission synaptique. L'analyse moléculaire des interneurons de la couche I a révélé l'expression majoritaire des sous-unités $\alpha 4$, $\beta 2$ et $\alpha 7$ (92, 65 et 53 %, respectivement). Ces résultats sont en adéquation avec les analyses pharmacologiques qui ont montré une composante $\alpha 7$ et une composante $\alpha 4\beta 2$ dans les réponses nicotiques.

Les afférences cholinergiques régulent donc l'activité du réseau néocortical de manière complexe, via l'activation de récepteurs qui présentent des propriétés fonctionnelles et des patrons d'expression très divers. Les travaux visant à étudier les effets de l'acétylcholine sur les neurones néocorticaux ont mis en évidence un nouvel aspect de la diversité des interneurons GABAergiques. Il apparaît notamment que les récepteurs nicotiques post-synaptiques sont sélectivement exprimés par les interneurons de la couche I et les interneurons VIP/CCK des couches II à V dans le néocortex. Ces résultats indiquent que ces interneurons occupent une place prépondérante dans la modulation à court terme de l'activité néocorticale par l'acétylcholine.

4.3. MODULATION SÉROTONINERGIQUE.

4.3.1. LES AFFÉRENCES SÉROTONINERGIQUES.

De nombreux troubles psychiatriques tels que la schizophrénie et la dépression sont associés à une perturbation de la modulation de l'activité corticale par les afférences sérotoninergiques (Ohuoha *et al.*, 1993; Breier, 1995; Gurevich & Joyce, 1997; Abi-Dargham *et al.*, 1997; Arango, 2002).

Le néocortex reçoit une forte innervation sérotoninergique en provenance des noyaux dorsal et médian du raphé (Azmitia & Segal, 1978; Kosofsky & Molliver, 1987; Törk, 1990; Jacobs & Azmitia, 1992). La distribution néocorticale des fibres sérotoninergiques varie notablement selon l'espèce considérée, mais on retrouve

en général une innervation plus dense au niveau des couches superficielles (I-III, *Figure 22*, Descarries et al., 1975; Hornung et al., 1990; DeFelipe et al., 1991; Smiley & Goldman-Rakic, 1996).

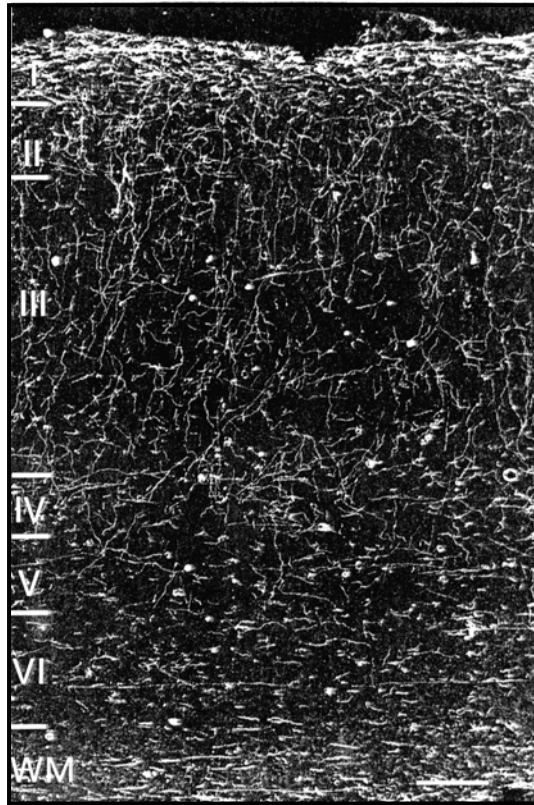


Figure 22 : Distribution des axones sérotoninergiques dans le néocortex de singe.

Le marquage immunocytochimique de la sérotonine révèle que les axones sérotoninergiques sont distribués sur toute l'épaisseur du néocortex, avec une densité plus forte au niveau de la couche I. Barre d'échelle : 100 μ m. D'après Smiley & Goldman-Rakic, 1996.

Les axones sérotoninergiques, qui présentent de nombreuses varicosités, contactent préférentiellement les interneurons GABAergiques inhibiteurs du néocortex (Mulligan & Törk, 1987; Smiley & Goldman-Rakic, 1996; Hornung & Celio, 1992; Paspalas et al., 2001). Les investigations effectuées en microscopie électronique ont démontré que les varicosités sérotoninergiques forment des contacts synaptiques sur les dendrites de leurs cibles corticales. Cependant, dans le cas des fibres sérotoninergiques comme pour celui des fibres cholinergiques, les données concernant la proportion de varicosités formant de telles synapses

divergent selon les auteurs. Pour exemple, au niveau du cortex fronto-parietal de rat, ce nombre varie de 5 % (Descarries *et al.*, 1975) à 38 % (Séguéla *et al.*, 1989), allant même jusqu'à ≈90 % (Papadopoulos *et al.*, 1987b).

Enfin, certains axones sérotoninergiques donnent naissance à de multiples collatérales qui entourent le corps cellulaire et les dendrites proximales de neurones néocorticaux. Ces terminaisons dites « en paniers » ne comportent pas de contacts synaptiques mais de nombreuses appositions des varicosités sur le compartiment somato-dendritique des cellules cibles. Ces spécialisations n'ont cependant été décrites que chez le chat (Mulligan & Törk, 1987; 1988; DeFelipe *et al.*, 1991) et le marmouset (Hornung *et al.*, 1990).

4.3.2. LES RÉCEPTEURS SÉROTONINERGIQUES.

Les effets de la sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) résultent de l'activation de nombreux types de récepteurs. A ce jour, les gènes codant pour quatorze récepteurs à la sérotonine ont été clonés. Parmi ces récepteurs, on dénombre treize récepteurs métabotropiques à sept segments transmembranaires et un récepteur canal, le récepteur 5-HT₃ (*pour revue, voir Hoyer et al.*, 2002).

4.3.2.1. Les Récepteurs Métabotropiques à la Sérotonine.

Les récepteurs métabotropiques à la sérotonine sont regroupés en six familles :

- les récepteurs 5-HT₁ (A, B, D, E, F) couplés négativement à l'adénylate cyclase,
- les récepteurs 5-HT₂ (A, B) couplés positivement à l'adénylate cyclase,
- les récepteurs 5-HT_{2C} couplés positivement à la phospholipase C,
- les récepteurs 5-HT₄, 5HT₆ et 5HT₇ couplés positivement à l'adénylate cyclase,
- les récepteurs 5-HT_{5A} sont couplés négativement à l'adénylate cyclase, la voie de signalisation activée par les récepteurs 5-HT_{5B} n'a pas encore été identifiée.

La majorité de ces récepteurs sont présents dans le néocortex, leur distribution est variable selon les espèces, et leurs rôles fonctionnels ne sont que partiellement élucidés (*pour revue, voir Gu, 2002*).

Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} sont exprimés par les cellules pyramidales (Burnet *et al.*, 1995). Des investigations électrophysiologiques, menées chez le rat et l'homme, ont montré que l'activation de ces récepteurs induit deux types de réponses à la sérotonine (Davies *et al.*, 1987; Araneda & Andrade, 1991; Newberry *et al.*, 1999). L'activation du récepteur 5-HT_{1A} résulte en une réponse inhibitrice due à l'activation de conductances potassiques. Au contraire, l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} conduit à une dépolarisation excitatrice résultant de la

fermeture de conductances potassiques. L'expression de récepteurs 5-HT_{2A} a également été observée au niveau de certains interneurons GABAergiques, caractérisés par l'expression de parvalbumine et de calbindine (Jakab & Goldman-Rakic, 1998; 2000). Néanmoins, aucun effet direct résultant de l'activation de ces récepteurs dans les interneurons n'a encore été rapporté.

De plus, l'activation du récepteur 5-HT_{2A} induit une modification de la transmission synaptique. Ainsi, des résultats, plutôt contradictoires, ont décrit une augmentation de fréquence des événements post-synaptiques excitateurs, dans les cellules pyramidales, à la suite de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} (Aghajanian & Marek, 1997), ou au contraire, une augmentation de fréquence des événements post-synaptiques inhibiteurs (Zhou & Hablitz, 1999). Dans tous les cas, les mécanismes responsables de ces effets sur la transmission synaptique sont complexes et encore mal compris (Marek & Aghajanian, 1998; Zhou & Hablitz, 1999).

4.3.2.2. Le Récepteur 5-HT₃.

Le récepteur 5-HT₃ est le seul récepteur ionotrope à la sérotonine identifié à l'heure actuelle (Derkach et al., 1989). Ce récepteur comporte de nombreuses homologies de séquence, et donc de structure, avec le récepteur nicotinique à l'acétylcholine. Il est également formé de l'assemblage de cinq sous-unités qui comportent 4 segments transmembranaires (Boess et al., 1995). Deux sous-unités du récepteur 5-HT₃ ont été clonées, la sous-unité 5-HT_{3A}, qui peut former des récepteurs homomériques fonctionnels (Maricq et al., 1991), et la sous-unité 5HT_{3B} qui peut s'associer avec la sous-unité 5-HT_{3A} pour former des récepteurs hétéromériques fonctionnels (Davies et al., 1999). Ces récepteurs, qui forment des canaux cationiques non sélectifs, diffèrent par leurs cinétiques d'ouverture et de désensibilisation (Dubin et al., 1999; Brady, 2001; Stewart et al., 2003).

Au sein du néocortex, des investigations effectuées chez le rat et le primate, en hybridation *in situ* et immunocytochimie, ont révélé une co-localisation quasi systématique du récepteur 5-HT₃ avec le GABA, indiquant que l'expression de ce récepteur est restreinte à une sous-population d'interneurons GABAergiques (Figure 23, Morales et al., 1996a; Morales & Bloom, 1997; Jakab & Goldman-Rakic, 2000). Morales et Bloom (1997) ont montré que, dans le néocortex de rat, le récepteur 5-HT₃ est principalement localisé au niveau des couches II-III et VI. Cette étude a révélé que ce récepteur n'est pas présent dans les interneurons à somatostatine, alors qu'il est fréquemment exprimé par les interneurons à cholecystokinine (entre 35 et 65 % des interneurons immunoréactifs pour la CCK exprimaient le récepteur 5-HT₃). Concernant les protéines de liaison du

calcium, le récepteur 5-HT₃ est fréquemment co-localisé avec la calrétinine, alors qu'il n'a pas été observé dans les neurones immunoréactifs pour la parvalbumine. Ces derniers résultats ont également été observés dans le néocortex de primate (Jakab & Goldman-Rakic, 2000).

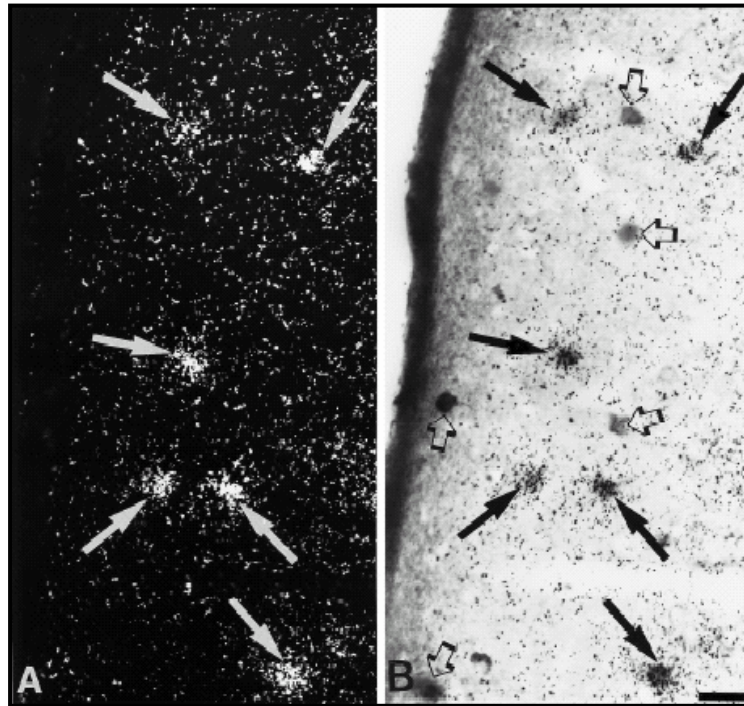


Figure 23 : Détection simultanée des transcrits du récepteur 5-HT₃ et de l'immunoréactivité du GABA dans la couche II du néocortex de rat.

A : Cellules exprimant le récepteur 5-HT₃ marquées par la technique d'hybridation in situ observées en épiluminescence. B : Observation en lumière transmise des neurones immunoréactifs pour le GABA. Dans cette section, tous les neurones exprimant le récepteur 5-HT₃ étaient immunoréactifs pour le GABA (flèches longues), par contre tous les neurones GABAergiques ne contenaient pas de transcrits du récepteur 5-HT₃ (flèches courtes). Barre d'échelle : 25µm. D'après Morales & Bloom, 1997.

L'observation de la localisation subcellulaire des récepteurs 5-HT₃ a révélé qu'ils se situent principalement au niveau du corps cellulaire et des dendrites des interneurons, indiquant qu'il s'agit de récepteurs post-synaptiques (Morales et al., 1996b; Morales & Bloom, 1997; Jakab & Goldman-Rakic, 2000).

Du point de vue fonctionnel, il existe très peu de données concernant l'effet de l'activation de ces récepteurs dans le néocortex. Zhou et Hablitz (1999) ont observé des réponses dépolarisantes, induites par l'application d'agonistes spécifiques des récepteurs 5-HT₃, dans une minorité d'interneurones de la couche I du néocortex de rat (4/52 neurones enregistrés). Enfin, une étude menée sur le néocortex de furet a décrit des courants post-synaptiques excitateurs spontanés et évoqués, bloqués par un antagoniste spécifique du récepteur 5-HT₃ (Roerig *et al.*, 1997).

4.4. MODULATION OPIOÏDERGIQUE.

La morphine, composant actif de l'opium, ainsi que ses dérivés, sont utilisés depuis des siècles pour leurs effets analgésiques et psychotropes puissants. La consommation de substances opiacées entraîne de nombreuses perturbations comportementales (sommolence, changements d'humeur, confusion mentale...) indiquant une action au niveau du système nerveux central et, vraisemblablement, au niveau du néocortex. La recherche concernant le mode d'action des substances opiacées a conduit à la découverte de trois récepteurs opioïdes (δ , κ et μ , *pour revue, voir Mansour et al.*, 1995), puis à l'identification de trois grandes familles de peptides opioïdes endogènes (enképhalines, dynorphines et endorphines, *pour revue, voir Akil et al.*, 1998).

Le clonage des récepteurs opioïdes a permis de montrer qu'ils appartiennent à la famille des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs de type δ , κ et μ , semblent couplés aux mêmes voies de signalisation intracellulaires, via des protéines G de type $G_{i/o}$ ou G_z (*pour revue, voir Connor & Christie*, 1999). L'étude des effets induits par l'inactivation génétique sélective de ces trois types de récepteurs a récemment montré qu'ils occupent des fonctions distinctes dans la modulation de la locomotion, la perception de la douleur et les comportements émotionnels (*pour revue, voir Kieffer & Gavériaux-Ruff*, 2002). Ces études ont tout particulièrement mis à jour le rôle essentiel du récepteur opioïde de type μ dans l'expression des effets d'analgésie, de dépendance et de récompense induits par la morphine.

Les peptides opioïdes endogènes sont synthétisés à partir de trois précurseurs : la proenképhaline, la prodynorphine et la pro-opio-melano-cortine (POMC). La proenképhaline génère un grand nombre de peptides parmi lesquels la Met-enképhaline et la Leu-enképhaline. La prodynorphine est également à l'origine d'une multitude de peptides, comprenant les dynorphines A et B, ou les neoendorphines α et β . Enfin, la POMC produit la β -endorphine.

Les relations entre ces trois familles de peptides et les trois récepteurs opioïdes aujourd'hui identifiés sont complexes. En effet, aucune correspondance claire entre un peptide particulier et un type récepteur n'a pu être établie. Il semble que les peptides peuvent se lier à tous les récepteurs opioïdes, avec des affinités variables. Néanmoins, on considère en général que les peptides dérivés de la proenképhaline seraient les agonistes préférentiels des récepteurs de type δ , et que les dérivés de la prodynorphine agiraient préférentiellement sur les récepteurs de type κ . Enfin, les enképhalines et la β -endorphine sont les peptides qui montrent la plus grande affinité pour les récepteurs de type μ .

Au sein du néocortex, il semble que seules la proenképhaline et la prodynorphine soient exprimées. Elles sont localisées, de manière éparse, majoritairement au sein des couches II-III et V-VI, dans des populations cellulaires distinctes (McGinty *et al.*, 1984; McGinty, 1985). Par contre, l'expression des trois types de récepteurs opioïdes a été rapportée dans le néocortex.

Chez le rat, les récepteurs δ sont localisés dans les cellules pyramidales, au niveau des couches II à VI. Le marquage immunocytochimique de ce récepteur a mis en évidence une localisation majoritaire dans la partie supérieure de la couche V (Cahill *et al.*, 2001). Des résultats similaires ont été rapportés chez l'homme (Schmidt *et al.*, 2000).

L'étude de la distribution du récepteur κ dans le néocortex humain a montré une localisation majoritaire au niveau des couches II, III et V (Wevers *et al.*, 1995). Néanmoins, chez le rat, l'expression de ce récepteur semble restreinte aux couches profondes (V-VI, Minami *et al.*, 1993). De plus, la partie ventrale du néocortex semble contenir un plus grand nombre de neurones immunoréactifs que la partie dorsale. Enfin, la morphologie de ces neurones suggère qu'il s'agit de cellules non pyramidales (Mansour *et al.*, 1996).

Il existe peu de données concernant la localisation précise du récepteur opioïde μ dans le néocortex humain. Au niveau du cortex frontal, les neurones immunoréactifs pour ce récepteur sont principalement localisés au niveau des couches II, III et V (Schmidt *et al.*, 2003). Chez le rat, le récepteur μ est exprimé principalement au niveau des couches II-III et V-VI. La morphologie des neurones immunoréactifs pour le récepteur μ indique qu'il s'agit de cellules non pyramidales (Mansour *et al.*, 1995). En outre, des expériences de doubles marquages ont permis de confirmer l'expression du récepteur μ dans une sous-population d'interneurones GABAergiques (Kalyuzhny & Wessendorf, 1998; Taki *et al.*, 2000).

Taki et collaborateurs (2000) ont effectué une étude plus approfondie de l'expression des récepteurs opioïdes de type μ dans le néocortex de rat. Ils ont

ainsi observé que les neurones immunoréactifs pour ce récepteur présentent une morphologie bipolaire, verticalement orientée, et qu'ils sont majoritairement localisés dans les couches superficielles. Des expériences de doubles marquages avec les marqueurs fréquemment utilisés pour caractériser les interneurons GABAergiques ont révélé que l'expression du récepteur μ est quasi systématiquement associée à celle du VIP (92 %), et fréquemment associée à l'expression de la CCK (35.3 %) et de la CR (35.4 %). Enfin, cette étude a montré une co-localisation très fréquente du récepteur opioïde de type μ avec le peptide précurseur de la proenképhaline (87.7 %). Du point de vue fonctionnel, les effets de l'activation des récepteurs opioïdes sur l'activité des neurones néocorticaux sont à ce jour inexplorés.

III. RÉSULTATS

Je résumerais le contexte scientifique général qui a donné le jour à ce travail de thèse de la manière suivante :

- ▶ La grande diversité des interneurons GABAergiques du néocortex a poussé les scientifiques à établir des classifications dans l'espoir de définir des classes d'interneurons fonctionnellement distinctes.
- ▶ Après plus d'un siècle de recherches dans ce domaine, il n'existe pas aujourd'hui de consensus définissant des critères de classification prépondérants permettant de remplir cet objectif.
- ▶ Une nouvelle approche du problème de la diversité des interneurons, basée sur la multiplicité des critères de classification, a conduit à la définition d'un nombre restreint de classes d'interneurons.
- ▶ La validation de cette méthode de classification nécessite la mise en évidence de propriétés fonctionnelles communes aux interneurons appartenant à une même classe.
- ▶ Les données concernant la modulation de l'activité du réseau néocortical par les voies cholinergiques, sérotoninergiques et opioïdiques, révèlent un nouvel aspect de l'hétérogénéité fonctionnelle des interneurons GABAergiques.

L'objectif de mon travail de thèse, basé sur ces différents constats, était de contribuer à l'exploration fonctionnelle des interneurons GABAergiques du néocortex, en étudiant la manière dont une classe d'interneurons, définie sur la base d'une approche multifactorielle de classification, est impliquée dans la modulation de l'activité néocorticale.

L'ensemble de ce travail a été réalisé à partir de tranches de néocortex de rat maintenues en survie, grâce à la combinaison des techniques de patch-clamp, de RT-PCR sur cellule unique et d'histochimie mise au point au laboratoire (pour une description détaillée des protocoles expérimentaux utilisés, se référer aux articles 1 et 2). Les résultats obtenus au cours de cette thèse seront présentés dans deux chapitres correspondant aux deux publications auxquelles ils ont donné lieu.

1. LES RÉCEPTEURS 5-HT3 ET L'EXCITATION SYNAPTIQUE RAPIDE DES INTERNEURONES VIP/CCK.

1.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1 : « 5-HT3 Receptors Mediate Serotonergic Fast Synaptic Excitation of Neocortical Vasoactive Intestinal Peptide / Cholecystokinin Interneurons. »

1.1.1. INTRODUCTION.

Comme nous l'avons vu précédemment (*Cf. Introduction*), différentes classes d'interneurones peuvent être identifiées sur la base de leurs propriétés morphologiques, neurochimiques et électrophysiologiques. Comprendre comment l'excitabilité de ces populations neuronales est régulée est un point essentiel à l'élucidation de leurs rôles fonctionnels spécifiques.

Les fibres sérotoninergiques afférentes, originaires des noyaux du raphé, se projettent sur les neurones non pyramidaux du néocortex. L'observation, en microscopie électronique, de contacts synaptiques différenciés entre les terminaisons axonales sérotoninergiques et leurs cibles corticales, suggère que ces afférences sérotoninergiques peuvent exercer une modulation rapide de l'excitabilité des interneurones néocorticaux. Parmi les récepteurs à la sérotonine, le récepteur 5-HT3 est le seul récepteur canal, susceptible d'intervenir dans des phénomènes de transmission synaptique rapide. Les études d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie ont montré que le récepteur 5-HT3 est sélectivement exprimé par une sous-population d'interneurones GABAergiques exprimant fréquemment la cholecystokinine (CCK), principalement localisés dans les couches II-III du néocortex. Bien que des réponses à l'activation du récepteur 5-HT3 aient été rapportées dans le néocortex, une corrélation claire entre les effets excitateurs rapides dus à la stimulation de ces récepteurs, et une population neuronale spécifique reste à déterminer.

1.1.2. RÉSULTATS & DISCUSSION.

1.1.2.1. Expression Sélective de Récepteurs 5-HT3 Post-Synaptiques Fonctionnels par une Sous-Population d'Interneurones VIP/CCK.

Dans cette étude, les neurones néocorticaux exprimant le récepteur 5-HT3 ont été identifiés et caractérisés, à l'aide de la méthode de patch-clamp couplée à la RT-PCR sur cellule unique, dans les couches I-III et V de néocortex de rats âgés de 14

à 21 jours. Le protocole d'amplification par PCR était élaboré de manière à permettre la détection des enzymes de synthèse du GABA, GAD 65 et GAD 67, des marqueurs biochimiques classiquement utilisés pour caractériser les interneurones néocorticaux [calbindine (CB), calrétinine (CR), parvalbumine (PV), neuropeptide Y (NPY), somatostatine (SOM), peptide vasoactif intestinal (VIP) et cholecystokinine (CCK)], et des deux sous unités du récepteur 5-HT3 identifiées à l'heure actuelle : 5-HT3A et 5-HT3B. Sur 13 cellules pyramidales et 94 interneurones ainsi analysés, l'expression de la sous-unité 5-HT3A a été détectée dans 19 neurones qui présentaient les caractéristiques électrophysiologiques d'interneurones de types RSNP (*Regular Spiking Nonpyramidal*) et IS (*Irregular Spiking*). Le profil moléculaire de ces neurones a révélé un fort taux d'expression des enzymes de synthèse du GABA, GAD 65 et GAD 67, du VIP, et de la CCK (95, 89, 95 et 100 %, respectivement), ainsi que l'expression relativement fréquente de la CB et de la CR (37 et 53 %, respectivement). Par contre, la sous-unité 5-HT3B n'a jamais été détectée dans cette étude, indiquant que les récepteurs 5-HT3 exprimés par les interneurones néocorticaux ne comprennent pas cette sous-unité.

Ces résultats indiquent que, dans le néocortex, l'expression du récepteur 5-HT3 est spécifique des interneurones GABAergiques de type IS et RSNP-VIP. Cependant, il est à noter que la sous-unité 5-HT3A n'a été détectée que dans une sous-population de ces interneurones (38 et 42 %, respectivement).

Les interneurones exprimant la sous-unité 5-HT3A, ont répondu à l'application locale de sérotonine par une dépolarisation excitatrice rapide due à l'activation d'un courant entrant. Ces réponses à la sérotonine étaient totalement bloquées en présence d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT3, le tropisetron. Ainsi, l'expression de la sous-unité 5-HT3A par les interneurones est corrélée à la présence de récepteurs 5-HT3 post-synaptiques fonctionnels.

Nous avons vu précédemment que les interneurones de type IS et RSNP-VIP partagent des caractéristiques neurochimiques et fonctionnelles communes (*Cf. Introduction*). Les résultats présentés ici contribuent, une fois de plus, à rapprocher ces deux populations neuronales sur le plan fonctionnel, c'est pourquoi elles seront regroupées par la suite sous le terme d'interneurones VIP/CCK.

Des réponses à l'activation de récepteurs 5-HT3 ont été observées dans quelques interneurones de la couche I (*Zhou & Hablitz, 1999*) et dans des interneurones FS (*Fast Spiking*) de la couche V (*Xiang & Prince, 2003*). Cependant, nos résultats, en accord avec les données obtenues par hybridation *in situ* et immunocytochimie (*Morales et al., 1998; Jakab & Goldman Rakic, 2000*) indiquent que les interneurones

VIP/CCK constituent le site majeur d'expression du récepteur 5-HT3 dans le néocortex.

1.1.2.2. Excitation Synaptique Rapide des Interneurones VIP/CCK par les Fibres Sérotoninergiques Afférentes.

Afin de déterminer dans quelle mesure les interneurones répondant à l'activation des récepteurs 5-HT3 sont susceptibles d'être directement activés par les fibres sérotoninergiques afférentes, des expériences de doubles marquages ont été réalisées. Le marquage intracellulaire de neurones testés pour leur sensibilité à un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT3 a été combiné au marquage immunocytochimique de la sérotonine. Nous avons ainsi observé que les neurones répondant à l'activation des récepteurs 5-HT3, par une dépolarisation accompagnée d'une décharge de potentiels d'actions, ont une morphologie bipolaire/bitouffue caractéristique des interneurones VIP/CCK. De plus, nous avons constaté la présence de contacts étroits formés par les fibres sérotoninergiques sur le corps cellulaire et des dendrites de ces interneurones.

Dans le but de déterminer la nature fonctionnelle de ces contacts, j'ai par la suite effectué une série d'expériences, visant à observer l'effet de la stimulation électrique des fibres sérotoninergiques, sur les interneurones qui expriment le récepteur 5-HT3. Après caractérisation du profil de décharge des neurones enregistrés, une brève application de sérotonine était tout d'abord effectuée afin de mettre en évidence l'expression éventuelle de récepteurs 5-HT3 dans ces neurones. Des stimulations électriques ont ensuite été réalisées, à proximité des neurones enregistrés, dans des conditions expérimentales prévenant toute transmission synaptique de type glutamatergique ou GABAergique.

Ces expériences ont permis d'observer des courants post-synaptiques excitateurs de grande amplitude, évoqués par les stimulations électriques, dans cinq interneurones de type RSNP. Ces réponses étaient bloquées par l'application d'un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT3, indiquant qu'elles résultaient de l'activation de récepteurs 5-HT3 post-synaptiques. Ces résultats nous ont permis de démontrer que le récepteur 5-HT3 peut transmettre une excitation synaptique rapide des interneurones VIP/CCK du néocortex, par les fibres sérotoninergiques afférentes originaires des noyaux du raphé.

Une étude plus approfondie de la manière dont cette transmission sérotoninergique module l'excitabilité des interneurones VIP/CCK serait particulièrement utile pour en évaluer les conséquences au niveau du réseau néocortical. Cependant, la faible proportion de neurones exprimant le récepteur 5-HT3 dans le néocortex, et l'impossibilité de visualiser les fibres

sérotoninergiques en vidéomicroscopie infrarouge, sont autant d'obstacles dont il faudrait s'affranchir à l'aide de nouvelles approches expérimentales pour entreprendre une telle étude.

1.1.2.3. Co-expression des Récepteurs 5-HT3 et Nicotiniques par les Interneurones VIP/CCK.

Nous avons vu précédemment que les interneurones VIP/CCK répondent sélectivement aux agonistes nicotiniques via l'activation de récepteurs contenant les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ (Cf. *introduction*). Pour savoir dans quelle mesure les récepteurs 5-HT3 et les récepteurs nicotiniques sont co-exprimés au sein de cette population d'interneurones, j'ai appliqué des agonistes sélectifs de ces deux types de récepteurs, successivement, sur les mêmes neurones.

Tous les neurones répondant à l'activation des récepteurs 5-HT3 répondaient également à l'application de l'agoniste nicotinique. Par contre, des neurones répondant uniquement à l'activation des récepteurs nicotiniques ont été observés. Ainsi, les interneurones qui expriment le récepteur 5-HT3 représentent une sous-population des interneurones sensibles aux agonistes nicotiniques. Ces résultats mettent en évidence une convergence remarquable entre les voies de neurotransmission rapides de type sérotoninergiques et cholinergiques au niveau d'une même sous-population d'interneurones GABAergiques.

En outre, il a été montré que la sous-unité 5-HT3A du récepteur 5-HT3 peut s'assembler avec la sous-unité nicotinique $\alpha 4$ pour former des récepteurs hétéromériques fonctionnels dans des systèmes hétérologues. Ces récepteurs hybrides sont activés par les agonistes des récepteurs 5-HT3, mais pas par les agonistes nicotiniques (*vanHooft et al., 1998; Kriegler et al., 1999*). Les résultats présentés ici suggèrent que les sous-unités 5-HT3A et nicotiniques $\alpha 4$ sont exprimées dans les mêmes interneurones et qu'elles seraient donc susceptibles de former de tels récepteurs hybrides. Il serait particulièrement intéressant de tester cette hypothèse, cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'outils pharmacologiques permettant de caractériser de tels récepteurs.

1.2. ARTICLE 1 : 5-HT3 Receptors Mediate Serotonergic Fast Synaptic Excitation of Neocortical Vasoactive Intestinal Peptide / Cholecystokinin Interneurones.

5-HT₃ Receptors Mediate Serotonergic Fast Synaptic Excitation of Neocortical Vasoactive Intestinal Peptide/Cholecystokinin Interneurons

Isabelle Férézou,¹ Bruno Cauli,¹ Elisa L. Hill,¹ Jean Rossier,¹ Edith Hamel,² and Bertrand Lambollez¹

¹Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7637, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de la ville de Paris, 75005 Paris, France, and ²Complex Neural Systems Neurobiology Unit, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada H3AZB4

Neocortical neurons expressing the serotonin 5-HT₃ receptor (5-HT₃R) were characterized in rat acute slices by using patch-clamp recordings combined with single-cell RT-PCR and histochemical labeling. The 5-HT_{3A} receptor subunit was expressed selectively in a subset of GABAergic interneurons coexpressing cholecystokinin (CCK) and vasoactive intestinal peptide (VIP). The 5-HT_{3B} subunit was never detected, indicating that 5-HT₃Rs expressed by neocortical interneurons did not contain this subunit. In 5-HT_{3A}-expressing VIP/CCK interneurons, serotonin induced fast membrane potential depolarizations by activating an inward current that was blocked by the selective 5-HT₃R antagonist tropisetron. Furthermore, we observed close appositions between serotonergic fibers and the dendrites and somata of 5-HT₃R-expressing neurons, suggestive of possible synaptic contacts. Indeed, in interneurons exhibit-

ing rapid excitation by serotonin, local electrical stimulations evoked fast EPSCs of large amplitude that were blocked by tropisetron. Finally, 5-HT₃R-expressing neurons were also excited by a nicotinic agonist, indicating that serotonergic and cholinergic fast synaptic transmission could converge onto VIP/CCK interneurons. Our results establish a clear correlation between the presence of the 5-HT_{3A} receptor subunit in neocortical VIP/CCK GABAergic interneurons, its functional expression, and its synaptic activation by serotonergic afferent fibers from the brainstem raphe nuclei.

Key words: neocortex; GABAergic interneurons; vasoactive intestinal peptide; cholecystokinin; single-cell RT-PCR; raphe nucleus; serotonin; 5-HT₃ receptor; 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} subunits; tropisetron; EPSC; nicotinic receptor

Neurons of the neocortex are classified as pyramidal cells or nonpyramidal cells according to their morphology. Pyramidal cells accumulate glutamate and are the main excitatory cortical neuron, whereas most nonpyramidal cells use GABA as a neurotransmitter and are believed to be inhibitory interneurons (Peters and Jones, 1984). The large diversity of neocortical GABAergic interneurons has led to several classifications (Houser et al., 1983; Hendry et al., 1989; Connors and Gutnick, 1990; Kawaguchi, 1993; Cauli et al., 1997, 2000; Kawaguchi and Kubota, 1997; Somogyi et al., 1998). However, the specific function of interneuron subtypes in the physiology of the neocortex remains to be established. Understanding how the excitability of interneuron subtypes is regulated by extracortical inputs therefore may contribute to elucidating their specific role.

It is well documented that serotonergic neurons of the midbrain raphe nuclei innervate neocortical nonpyramidal cells. At the electron microscopy level it has been demonstrated that serotonergic fibers can form conventional synapses on their cortical

targets, suggesting that this subcortical projection may exert a fast modulation of interneuron excitability (Papadopoulos et al., 1987a; DeFelipe et al., 1991; Paspalas and Papadopoulos, 2001). The neurotransmitter serotonin (5-HT) interacts with several receptors, all of which are G-protein-coupled, with the exception of the 5-HT₃ receptor (5-HT₃R), which is a cation-selective ligand-gated ion channel suggested to mediate fast synaptic transmission (Derkach et al., 1989; Maricq et al., 1991; Sugita et al., 1992). Two 5-HT₃R subunits have been cloned, 5-HT_{3A}, which forms functional homomeric 5-HT₃Rs, and 5-HT_{3B}, which can assemble with 5-HT_{3A} subunits into heteromeric receptors (Davies et al., 1999; Hanna et al., 2000). *In situ* hybridization and immunocytochemical analyses have shown that 5-HT₃Rs are expressed selectively by a subgroup of GABAergic interneurons characterized by the expression of cholecystokinin (CCK) and located predominantly in neocortical layers II and III (Morales and Bloom, 1997). Although 5-HT₃R-mediated responses have been reported in the neocortex (Roerig et al., 1997; Zhou and Hablitz, 1999), a clear correlation between fast excitatory effects mediated by 5-HT₃Rs and a neuronal population remains to be established.

In the present study we combined patch-clamp recordings followed by single-cell reverse transcription and multiplex PCR (single-cell RT-mPCR; Lambollez et al., 1992; Ruano et al., 1995) analyses to identify and characterize 5-HT₃R-expressing neocortical neurons in rat acute slices. We found that functional postsynaptic 5-HT₃R expression was restricted to a small subset of GABAergic interneurons that coexpressed CCK and vasoactive

Received May 3, 2002; revised June 11, 2002; accepted June 14, 2002.

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (France) and European Union Grant QL3-CT-1999-00649. I.F. and E.L.H. were supported by Ministère de la Recherche (France); E.H. was funded by a Blaise Pascal International Research Chair from the Région Ile de France. We thank Nora Fehlbaum, Zsolt Lenkei, Armelle Rancillac, Richard Schwartzmann, Paul Schweitzer, and Jim Surmeier.

Correspondence should be addressed to Dr. Bertrand Lambollez, Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, 10 Rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: bertrand.lambollez@espci.fr.

Copyright © 2002 Society for Neuroscience 0270-6474/02/227389-09\$15.00/0

Table 1. PCR primers and FRET probes

	Size	PCR	FRET probes
GAD 65 #M72422	391	Sense ^b , 713: TCTTTTCTCCTGGTGGTGCC Antisense ^b , 1085: CCCAAGCAGCATCCACAT	3' FITC, 848: TTTCTCTCAAGAAGGGAGCTGCA 5' R705, 872: CCTTGGGGATCGGAACAGACA
GAD 67 #M76177	600	Sense ^a , 713: TACGGGGTTCGCACAGGTC Antisense, 1294: same as GAD65	3' FITC, 930: CCTGGGGGAGCCATATCCAA 5' R705, 951: ATGTACAGCATCATGGCGGCTC
CaB #M27839	432	Sense ^a , 134: AGGCACGAAAGAAGGCTGGAT Antisense ^a , 544: TCCACACATTTTGTATTCCTTG	3' FITC, 263: TCCTGGCTGCTCTTTTCGATGCC 5' R705, 285: GCAACTGAAGTCTCGCAGAGAA
PV #M12725	381	Sense, 247: ACAAGAGCGTGTAGTGGCTGC Antisense, 607: CGTGGTCTTCGCTCTCTCTC	3' FITC, 283: GACGGCAAGATTGGGGTTGA 5' R705, 304: GAATTCACCCTCTGGTGGCCG
CR #X66974	309	Sense ^a , 142: CTGAGAAAGGCAAGGAAAGGT Antisense ^a , 429: AGGTTTCATCATAGGACGGTTG	3' FITC, 248: TTGAGATGGCAGAGCTGGCG 5' R705, 269: AGATCTGCCAACCGAAGAGAAT
NPY #M15880	359	Sense ^a , -45: GCCAGAGCAGAGCACCC Antisense ^a , 292: CAAGTTTCATTTCCCATCACCA	3' FITC, 17: AACGAATGGGGCTGTGTGGA 5' R705, 38: TGACCCTCGCTCTATCCCTGC
SOM #K02248	209	Sense ^a , 43: ATCGTCTGGCTTTGGGC Antisense ^a , 231: GCCTCATCTCGTCTGCTCA	3' FITC, 105: GCAGAAGTCTCTGGCGGCTG 5' R705, 126: CACGGGAAACAGGAAGTGGC
VIP #X02341	286	Sense ^a , 167: TGCCTTAGCGGAGAATGACA Antisense ^a , 434: CCTCACTGCTCCTTTCCCA	3' FITC, 199: TGTGTCCAGAAATGCCAGGCA 5' R705, 221: GCTGATGGAGTTTTCACCAGCG
CCK #K01259	216	Sense ^a , 174: CGCACTGCTAGCCCGATACA Antisense ^a , 373: TTTCTCATTTCCGCTCTCTCC	3' FITC, 198: CCAGCAGTCCGCAAAGCT 5' R705, 218: CCTCTGGCCGATGTCCG
5-HT ₃ A #U59672	411	Sense, 1105: TTCCAAGCCAACAAGACTGATG Antisense, 1499: AGGGGACTGGGTTGCTC	3' FITC, 1127: ACTGCTCAGCCATGGGAACCC 5' R705, 1149: CTGACCCATGTGCGAAGCC
5-HT ₃ B #NM_022189	275	Sense, 51: CACAGCGACACCTCAGCCT Antisense, 304: TGGCACTGAGAGGGAGAGAGAT	Position 1: first base of the start codon

^aCauli et al. 1997.^bBochet et al. 1994.

intestinal peptide (VIP). Furthermore, we present functional and anatomical evidence of the fast synaptic excitation of 5-HT₃R-expressing interneurons by 5-HT-containing afferent fibers. Finally, 5-HT₃R-expressing interneurons are also responsive to a nicotinic agonist, suggesting that serotonergic and cholinergic fast synaptic transmission could converge onto the same subpopulation of neocortical interneurons.

MATERIALS AND METHODS

Slice preparation. Young Wistar rats (postnatal day 14–21) were anesthetized deeply with a mixture of ketamine (65 mg/kg) and xylazine (14 mg/kg) and decapitated. Subsequently, 300- μ m-thick parasagittal sections of cerebral sensorimotor cortex were prepared as described previously (Cauli et al., 1997). The slices were incubated at room temperature (20–25°C) in artificial CSF (ACSF) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 20 glucose, and 5 pyruvate, which was bubbled with a mixture of 95% O₂/5% CO₂.

Whole-cell recordings. Slices were transferred to a chamber and perfused at 1–2 ml/min with ACSF at room temperature. Patch pipettes (6–8 M Ω), pulled from borosilicate glass, were filled with 8 μ l of internal solution containing (in mM): 123 K-gluconate, 21 KCl, 3 MgCl₂, 0.5 EGTA, and 10 HEPES plus 2 mg/ml biocytin (Sigma, St. Louis, MO). In the internal solution used for recording evoked postsynaptic currents (see below), KCl was replaced by K-gluconate (144 mM final). The pH was adjusted to 7.2 and osmolarity to 285/295 mOsm. Whole-cell recordings were made from neocortical neurons identified under infrared video microscopy with Nomarski optics (Stuart et al., 1993) and with a patch-clamp amplifier (Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, CA). Resting membrane potential was measured just after passing in whole-cell configuration, and only cells with a resting membrane potential more hyperpolarized than -50 mV were analyzed. All membrane potentials were corrected for junction potential (-11 mV). Cells were maintained at a holding potential of -71 mV by continuous current injection, and their firing behavior was tested by applying depolarizing current pulses. Action potential discharges were recorded by using the I-clamp fast mode of the amplifier. The signals were filtered at 5 kHz, digitized at 10 kHz, saved to a PC, and analyzed off-line with Acquis1 software (Gérard Sadoc, Gif-Yvette, France).

The nicotinic receptor agonist 1–1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium iodide (DMPP), 5-hydroxytryptamine hydrochloride (5-HT), and the 5-HT₃R agonist 1-(m-chlorophenyl)-biguanide hydrochloride (m-CPBG; Sigma) were added either to the bathing solution or were applied by pressure from a large pipette onto the recorded neuron. The 5-HT₃R antagonist 3-tropanyl-indole-3-carboxylate hydrochloride (tropisetron, ICS 205-930; Sigma) was added to the bathing solution.

Electrical stimulations were performed in the presence of D(-)-2-amino-5-phosphopentanoic acid (D-AP-5) and 6-cyano-7-nitroquinoline-2,3-dione (CNQX; Tocris, Ballwin, MO) by using conventional glass electrodes filled with ACSF. The holding potential of the recorded neurons was adjusted to the reversion potential of inhibitory currents in our experimental conditions (-78 mV). We did not use GABA_A receptor antagonists in these experiments because of their reported lack of selectivity within the GABA_A, nicotinic, and 5-HT₃ receptor channel superfamily (Mayer and Straughan, 1981; Demuro et al., 2001; Erkkila et al., 2001). Stimulations (0.1–1 mA, 0.3 msec) were applied every 15 sec by using a stimulation isolation unit (Isolator-11, Axon Instruments). For each cell several locations of the stimulating electrode in the rostral local environment of the recorded neurons (60–100 μ m) were tested for their ability to evoke postsynaptic currents. Hyperpolarizing voltage steps (5 mV) were applied before each stimulation to monitor passive electrical properties of the recorded cell as well as the stability of access resistances. Series resistances ranged from 15 to 30 M Ω , and a 50–70% compensation was achieved routinely by using the amplifier adjustments.

Cytoplasm harvesting and reverse transcription. At the end of the recording as much as possible of the content of the cell was aspirated into the recording pipette by the application of a gentle negative pressure in the pipette while maintaining the tight seal. Then the pipette was removed delicately allowing, in most instances, outside-out patch formation. Next, the content of the pipette was expelled into a test tube, and reverse transcription (RT) was performed in a final volume of 10 μ l as described previously (Lambolez et al., 1992).

Multiplex PCR. Two steps of mPCR were performed essentially as described previously (Ruano et al., 1995). The cDNAs present in 10 μ l of the reverse transcription reaction first were amplified simultaneously by using all of the primer pairs described in Table 1 (for each primer pair the sense and antisense primers were positioned on two different exons). *Taq* polymerase (2.5 U; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and 10 pmol

of each primer were added to the buffer supplied by the manufacturer (final volume, 100 μ l), and 20 cycles (94°C for 30 sec; 60°C for 30 sec; 72°C for 35 sec) of PCR were run. Second rounds of PCR were performed by using 2 μ l of the first PCR product as a template. In this second round each cDNA was amplified individually with its specific primer pair by performing 35 PCR cycles (as described above). Then 10 μ l of each individual PCR was run on a 2% agarose gel, with ϕ x174 digested by *Hae*III as a molecular weight marker and was stained with ethidium bromide.

Identification of the PCR products. PCR-generated fragments obtained from each cell were analyzed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) between two adjacent oligoprobes (purchased from Genset, Paris, France; see Table 1) internal to the amplified sequence. The upstream probe was FITC-labeled at the 3' end (donor; excitation, 470 nm), and the downstream probe was Red705-labeled at the 5' end (acceptor; emission, 710 nm). FRET between the two fluorophores, which can occur only when both probes are hybridized to their cognate PCR fragment, was measured with a LightCycler instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) that used the following protocol. At the end of the second PCR, 18 μ l of the PCR was mixed with the oligoprobes (each at 0.2 μ M final) and EDTA (2 mM final) in a final volume of 20 μ l. After 10 sec of denaturation at 95°C and 1 min of hybridization at 50°C, the FRET was measured continuously during a ramp to 95°C (1°C/sec) and analyzed with the manufacturer's software.

Test of the RT-mPCR protocol. The RT-mPCR protocol was tested on 500 pg of total RNA purified from rat neocortex (Chomczynski and Sacchi, 1987). All of the transcripts were detected from 500 pg of neocortical RNA, except for the 5-HT_{3B} subunit, which was detected from 10 ng of whole brain RNA. The absence of 5-HT_{3B} mRNA detection from neocortical RNA is consistent with a recent report showing the very low abundance of 5-HT_{3B} transcripts in the rat CNS (Wang et al., 2001). The sizes of the PCR-generated fragments were as predicted by the mRNA sequences (see Table 1), and their identity was confirmed by FRET between adjacent oligoprobes (as described above).

Intracellular labeling and immunocytochemistry. The slices containing cells recorded and filled with biocytin were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C, rinsed six times in 0.1 M phosphate buffer for 10 min, incubated for 30 min in PBS containing 70% methanol, and rinsed three times in PBS supplemented with 0.1 M gelatin and 0.25% Triton X-100 (GT-PBS) for 10 min. For the immunostaining of 5-HT fibers, before biocytin revelation, the slices were incubated overnight with rabbit antisera raised against serotonin (1:10,000; Diasorin, Stillwater, MN) in GT-PBS. Slices then were washed four times in GT-PBS for 10 min and incubated for 4 hr at room temperature with Streptavidin Alexafluor 488 (1:1000; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) and Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:400; Chemicon, Temecula, CA); they were diluted in GT-PBS and subsequently were rinsed twice in PBS. The slices were mounted in Vectashield (Vector, Burlingame, CA) medium for observation, and labeled cells were reconstructed with a confocal microscope (Leica, TCS NT, Mannheim, Germany).

RESULTS

The 5-HT_{3R} is expressed by a subset of VIP/CCK interneurons

To identify and characterize 5-HT_{3R}-expressing neocortical neurons, 13 pyramidal neurons and 94 interneurons from neocortical layers I, II, III, and V were visually selected via infrared video microscopy, electrophysiologically characterized, and analyzed by single-cell RT-mPCR. All cells were classified as irregular spiking (IS), fast spiking (FS), regular spiking nonpyramidal (RSNP), or pyramidal neurons according to their action potential firing behavior (McCormick et al., 1985; Cauli et al., 1997, 2000; Porter et al., 1998) after application of depolarizing current pulses. The molecular analysis protocol was designed to probe for the mRNA expression of the 5-HT_{3A} subunit of the 5-HT_{3R} in addition to nine interneuron markers [GAD 65; GAD 67; three calcium binding proteins: parvalbumin (PV), calretinin (CR), and calbindin (CB); and four neuropeptides: neuropeptide-Y (NPY), somatostatin (SOM), cholecystokinin (CCK), and vasoactive intestinal peptide (VIP)].

The 5-HT_{3A} mRNA expression was restricted to a small subset

of neocortical neurons ($n = 19$ of 107) exhibiting the firing properties of RSNP ($n = 14$) or IS ($n = 5$) interneurons. The molecular profile of 5-HT_{3A}-expressing neurons is summarized in Figure 1A. The high occurrence of GAD 65, GAD 67, VIP, and CCK (95, 89, 95, and 100%, respectively) indicated that the 5-HT_{3R} was expressed selectively by GABAergic interneurons that coexpressed VIP and CCK (VIP/CCK interneurons). As documented previously (Morales and Bloom, 1997), 5-HT_{3A}-expressing neurons also showed substantial expression of CB and CR (37 and 53%, respectively). Among VIP/CCK interneurons ($n = 41$) we did not observe significant differences between the expression profiles of 5-HT_{3A}-positive and 5-HT_{3A}-negative interneurons. 5-HT_{3A} was expressed in 33% of the sampled CCK-expressing interneurons and in 27% of those containing VIP (data not shown). In addition, 5-HT_{3B} subunit expression was tested in 56 of the 107 neurons that were tested for 5-HT_{3A} expression. 5-HT_{3B} was never detected, even in five 5-HT_{3A}-positive cells, suggesting that the 5-HT_{3Rs} expressed in neocortical interneurons were composed primarily of the 5-HT_{3A} subunit.

Figure 1B,C shows the molecular profiles of the two neuronal populations that expressed the 5-HT_{3A} subunit: IS interneurons ($n = 12$) and RSNP VIP/CCK cells ($n = 32$). Consistent with previous studies (Porter et al., 1998; Cauli et al., 2000), IS interneurons frequently expressed VIP and CCK (83 and 75%, respectively). Although our present sample of IS and RSNP VIP/CCK cells differed by the occurrence of CR, NPY, and SOM (Fig. 1B,C), they exhibited a similar incidence of 5-HT_{3A} expression (42 and 38%, respectively). Indeed, previous studies have shown that these two interneuron populations form a relatively homogeneous cell type (Cauli et al., 2000).

Functional 5-HT_{3R} expression by VIP/CCK neocortical interneurons

The functionality of the 5-HT_{3Rs} that were expressed by neocortical interneurons was tested by local pressure application of 5-HT (200 μ M, 50 msec) in 48 of the 107 neurons that were analyzed by single-cell RT-mPCR (see above).

In nine interneurons (7 RSNP and 2 IS cells; see examples in Fig. 2A), 5-HT applications induced a rapid membrane potential depolarization resulting, in most instances, in action potential discharge (Fig. 2B1,B2). Voltage-clamp recordings from the same neurons showed that 5-HT applications elicited inward currents, with peak amplitudes ranging from -22 to -319 pA (mean, -125 pA) and a time course similar to that of the depolarization (rise time, 2.5–5 sec and decay time, 15–30 sec; see examples in Fig. 2C1,C2). We observed that repetitive applications of 5-HT at 2 min intervals resulted in inward currents with no substantial change in peak amplitude (data not shown). Responses to 5-HT applications were blocked totally by the bath application of the highly potent and selective 5-HT_{3R} antagonist tropisetron (10 nM) (Fig. 2C1,C2). Recovery of the 5-HT-induced currents was not observed even after 25 min of tropisetron washout. This was consistent with previous studies that showed only partial recovery after 0.5–1.5 hr of tropisetron washout (Ropert and Guy, 1991; Kawa, 1994; McMahon and Kauer, 1997). RT-mPCR analyses of 5-HT₃-responsive cells consistently revealed the expression of the 5-HT_{3A} subunit in addition to GAD65 and/or GAD67, VIP, and CCK (Fig. 2D1,D2). Conversely, the 5-HT_{3A} mRNA was never detected in unresponsive neurons. Occasionally 5-HT application induced a slowly developing depolarization ($n = 1$) or hyperpo-

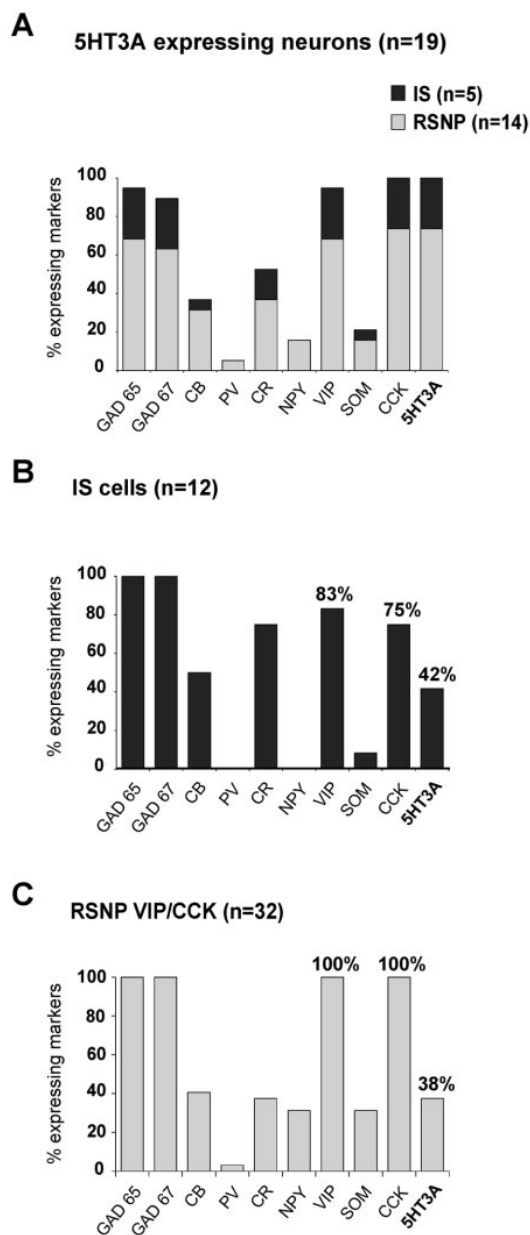


Figure 1. 5-HT_{3R} is expressed selectively in a subset of GABAergic interneurons coexpressing VIP and CCK. Single-cell RT-mPCR analyses of 107 neocortical neurons, including 13 pyramidal cells and 94 interneurons, revealed 5-HT_{3A} expression in five IS and 14 RSNP interneurons. The histogram in *A* illustrates the percentage of 5-HT_{3A}-expressing IS (dark gray) and RSNP (light gray) neurons that expressed each of the biochemical markers. The high occurrence of GAD 65, GAD 67, VIP, and CCK (95, 89, 95, and 100%, respectively) indicated that 5-HT_{3R} expression was restricted to a subset of neocortical GABAergic interneurons coexpressing VIP and CCK. 5-HT_{3R}-expressing interneurons were also characterized by a low occurrence of PV, SOM, and NPY (5, 16, and 21%, respectively) and the relatively frequent expression of CB and CR (37 and 53%, respectively). *B*, *C*, Two histograms illustrating the molecular profiles of IS interneurons and VIP/CCK RSNP cells. The 5-HT_{3A} mRNA was detected in 42% of IS and 38% of RSNP VIP/CCK interneurons. No significant difference was observed between 5-HT_{3A}-expressing and 5-HT_{3A}-nonexpressing IS and RSNP VIP/CCK neurons. The 5-HT_{3B} subunit was never detected (56 neurons tested).

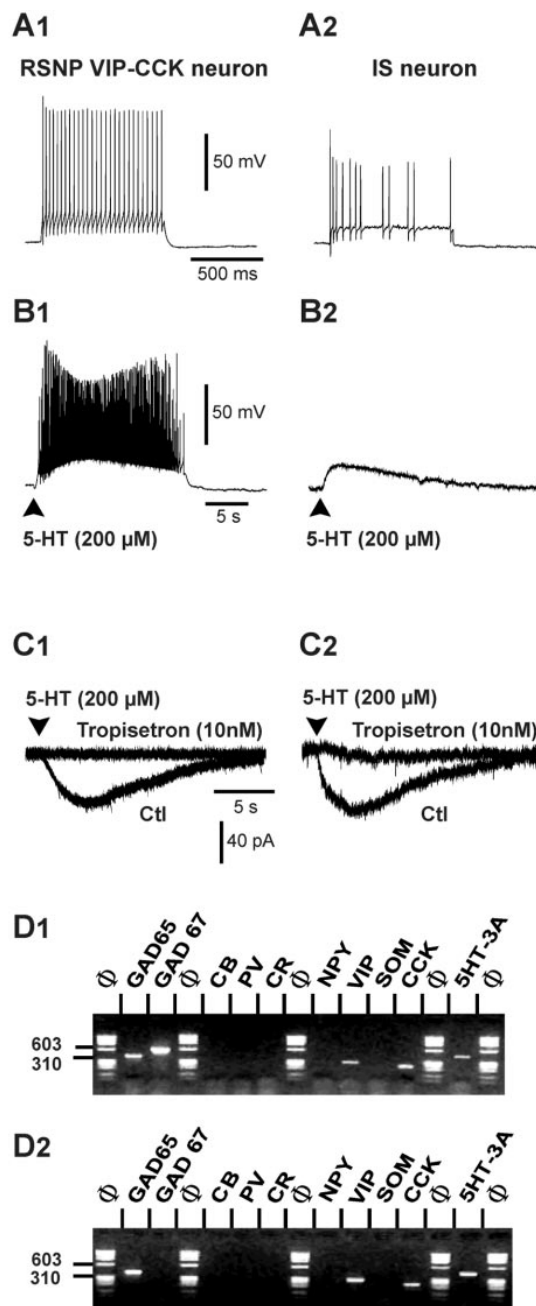


Figure 2. Functional 5-HT_{3R} expression by VIP/CCK interneurons. *A*, In current-clamp mode the RSNP and IS neurons were identified by their firing properties after depolarizing current injections (100 pA; holding potential, -71 mV). The RSNP neuron exhibited a 50.9% reduction of firing frequency along the discharge (A1), and the IS neuron showed an initial burst of action potentials followed by irregularly emitted action potentials (A2). *B*, Local pressure applications of 5-HT (200 μM, 50 msec) induced fast membrane potential depolarizations in these neurons (B1, B2). Note the action potential discharge in B1. *C*, In voltage clamp (holding potential, -71 mV) the 5-HT applications induced inward currents (C1, -68.5 pA; C2, -67.5 pA) that were blocked by bath application of tropisetron (10 nM). *D*, Agarose gel analysis of PCR products obtained from these two 5-HT_{3R}-responsive neurons (D1, D2) revealed the expression of the 5-HT_{3A} subunit together with GAD65 (and GAD67 in D1), VIP, and CCK.

larizations ($n = 2$) of small amplitude. These slow responses were not associated with 5-HT₃R expression (data not shown).

Consistent with the GABAergic nature of 5-HT₃R-expressing cells, the selective agonist mCPBG has been reported to induce IPSCs in neocortical neurons (Zhou and Hablitz, 1999). Indeed, the bath application of mCPBG (100 μ M, 15 sec) in the presence of CNQX (10 μ M) and D-AP-5 (50 μ M) increased the frequency of spontaneous IPSCs in three of seven interneurons that were tested (data not shown). In these neurons recorded in voltage-clamp mode at a holding potential of -80 mV, mCPBG induced a mean 3.3-fold increase in the frequency of IPSCs but did not affect their amplitudes. Hence, these observations demonstrated a good correspondence between the 5-HT_{3A} expression and physiological 5-HT₃R responses, indicating that the 5-HT_{3A} subunit expressed by VIP/CCK GABAergic interneurons forms functional 5-HT₃Rs.

Close apposition of serotonergic fibers with dendrites and somata of 5-HT₃R-expressing neurons

Within the neocortex, serotonergic (5-HT) fibers originating from the brainstem raphe nuclei project broadly and diffusely and constitute the only source of 5-HT (Mulligan and Tork, 1988; Seguela et al., 1989; DeFelipe et al., 1991; Hornung and Celio, 1992; Smiley and Goldman-Rakic, 1996). To investigate whether these fibers could exert fast synaptic excitation of 5-HT₃R-expressing interneurons, we combined intracellular biocytin labeling of recorded neurons with 5-HT immunostaining. 5-HT₃R-expressing interneurons were identified by the local pressure application of mCPBG (100 μ M, 50 msec). Like for 5-HT, responses to mCPBG consisted of rapid membrane potential depolarizations leading to action potential discharges (Fig. 3*A1*, *B1*). Examples of confocal reconstructions are shown for two mCPBG-responsive RSNP neurons from layer V (Fig. 3*A2*) and layer II (Fig. 3*B2*). Neurons responsive to mCPBG ($n = 8$) exhibited a bipolar/bitufted morphology, typical of VIP/CCK interneurons (Morrison et al., 1984; Kawaguchi and Kubota, 1996; Bayraktar et al., 1997, 2000; Kubota and Kawaguchi, 1997; Porter et al., 1998). Immunocytochemical staining of 5-HT revealed an intricate network of thin, varicose, and tortuous fibers for which the overall distribution and orientation pattern were consistent with earlier descriptions (Lidov et al., 1980; Papadopoulos et al., 1987a). The density of 5-HT fibers coursing in the vicinity of the labeled neurons was highly variable (Fig. 3*A2*, *B2*). However, in each case it was possible to highlight close appositions of 5-HT-containing varicosities onto the soma and dendrites of mCPBG-responsive neurons (as seen at higher magnification in Fig. 3*A3–A7*, *B3*, *B4*), suggestive of possible synaptic contacts.

Evoked synaptic responses mediated by the 5-HT₃R

To assess the presence of functional serotonergic synapses, we attempted to stimulate 5-HT fibers by performing local electrical stimulation in the vicinity of 5-HT₃R-expressing interneurons. In this set of experiments 99 neurons were recorded in current-clamp mode and, after characterization of their firing properties, were exposed to bath application of 5-HT (10 μ M, 10 sec). In this case 5-HT was preferred to mCPBG because this latter agonist induced significantly longer desensitization (data not shown) (see also Kawa, 1994). Electrical stimulation of 5-HT fibers was attempted for four IS and 20 RSNP interneurons that exhibited rapid depolarization in response to 5-HT application. Voltage-clamp recordings of these neurons were performed in the presence of D-AP-5 (20 μ M) and CNQX (10 μ M) to prevent glutama-

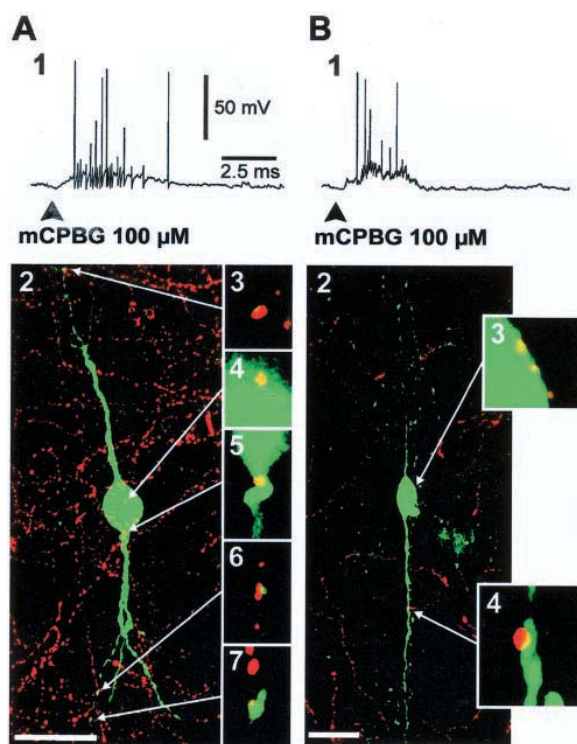


Figure 3. 5-HT-containing fibers form close appositions with 5-HT₃-responsive neurons. Confocal reconstruction shows two mCPBG-responsive neurons from layers V (*A2*) and II (*B2*) labeled by biocytin (green) and immunostained 5-HT-containing fibers (red). Responses to local pressure applications of mCPBG (100 μ M, 50 msec), a selective 5-HT₃R agonist, consisted of membrane potential depolarizations surmounted by action potentials (*A1*, *B1*). Confocal reconstructions shown in *A2* and *B2* (scale bars, 20 μ m) consisted of a z-series of 48 and 28 images, respectively, projected in one layer via the maximum intensity method (the spacing of successive z-images was 1 μ m). mCPBG-responsive neurons exhibited a bipolar morphology, typical of VIP/CCK-expressing interneurons. 5-HT immunostaining showed thin varicose fibers coursing in the vicinity of these neurons. As seen at higher magnification ($6\times$) on unitary z-images, 5-HT-containing varicosities were in close apposition to the soma (*A4*, *A5*, *B3*) or dendrites (*A3*, *A6*, *A7*, *B4*) of mCPBG-responsive neurons.

tergic transmission and at a holding potential of -78 mV, which corresponded to the reversal potential of GABA_A receptor-mediated events. The effective block of glutamatergic and GABAergic postsynaptic currents in these conditions was verified in each recorded cell (data not shown). Because it is not possible to predict the exact trajectory of 5-HT fibers in acute neocortical slices, electrical stimulations were applied at different sites in the rostral environment of the recorded neurons (distance between stimulating and recording electrodes varied from 60 to 100 μ m). For five 5-HT-responsive RSNP neurons the electrical stimulations evoked fast EPSCs of large amplitude that were blocked by tropisetron. Examples of these evoked EPSCs recorded in a layer II RSNP cell are shown in Figure 4. Local electrical stimulation applied in layer I ~ 100 μ m away from the soma of this cell induced fast EPSCs (Fig. 4*A*, black arrow) with a latency of 2.3 ± 0.2 msec (measured between the beginning of the stimulation artifact and the peak of the EPSCs) and a steady amplitude of -287 ± 13 pA (mean \pm SD for 10 successive events) (Fig. 4*A*, *C*). The rise time (10–90%) of EPSCs was 0.29 msec, and their decay

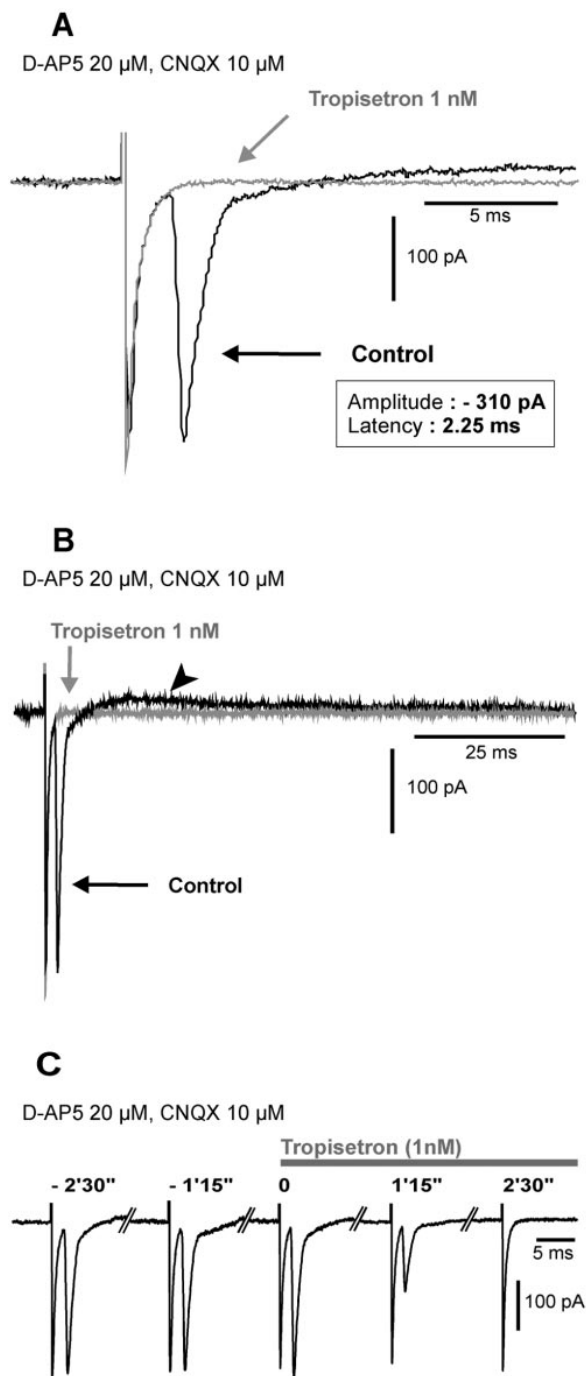


Figure 4. Serotonergic synaptic transmission in 5-HT₃-responsive cells. A 5-HT-responsive RSNP interneuron located in layer II was recorded in voltage-clamp mode at a holding potential of -78 mV (corresponding to the reversal potential of GABA_A-mediated events). Electrical stimulation (0.2 mA; 0.067 Hz) applied in layer I, ~ 100 μ m above the soma of this neuron, evoked D-AP-5/CNQX-resistant EPSCs. The example of evoked D-AP-5/CNQX-resistant EPSCs shown in *A* had an amplitude of -310 pA and a latency to peak of 2.25 msec. For this EPSC the rise time was 0.29 msec (10 – 90%), and the decay was fit with two exponentials with time constants of 0.65 msec (87%) and 2.63 msec (13%). The same EPSC shown in *B* at a different time scale was followed by a slowly inactivating

outward current (17 pA; *arrowhead*). Both the EPSC and the outward current were blocked completely by the 5-HT₃R antagonist tropisetron (*A*, *B*). *C* shows the steady amplitude of the evoked EPSCs (mean, -287 ± 13 pA for 10 successive events) that were blocked completely by tropisetron 2.5 min after the beginning of the bath application.

was well fit with two exponentials, with time constants of 0.62 ± 0.03 msec (84% of decay) and 3.16 ± 0.73 msec (16% of decay, mean \pm SD, for 10 successive events). A slowly inactivating outward current was apparent at the end of the EPSCs (13.9 ± 3.7 pA) (Fig. 4*B*, *arrowhead*). It is likely that this outward current partly contributed to the very fast decay of the EPSCs.

As shown in Figure 4*A,B*, these D-AP-5/CNQX-resistant postsynaptic currents were blocked completely by bath application of tropisetron (1 nM), suggesting that both inward and outward currents resulted from the activation of 5-HT₃R. It is known that 5-HT₃R are highly permeable to calcium (Yang et al., 1992; Brown et al., 1998). The slowly inactivating outward current therefore might be attributable to calcium-activated potassium conductances (Sah, 1996). Figure 4*C* shows the steady amplitude of the 5-HT₃R postsynaptic responses and their complete block by tropisetron 2.5 min after the beginning of the bath application. Similar results were obtained for the other four cells showing D-AP-5/CNQX-resistant evoked EPSCs.

In our sample of five neurons showing D-AP-5/CNQX-resistant EPSCs, the mean EPSC amplitude was -240.8 ± 50 pA, and the mean latency to peak was 1.6 ± 0.9 msec (ranging from 0.8 to 3.1 msec). Mean decay time constants were 0.71 ± 0.03 msec (fast exponential, 84%) and 4.84 ± 1.96 msec (slow exponential, 16%). The mean amplitude of the slowly inactivating outward current was 5.25 ± 2.04 pA. The D-AP-5/CNQX-resistant evoked postsynaptic currents of all five cells were blocked totally by the bath application of tropisetron (1 nM) in 2–3 min, indicating that they were mediated by 5-HT₃R activation. The 5-HT₃R-mediated EPSCs exhibited an “all-or-none” behavior because their amplitude did not vary according to the stimulation intensity. Furthermore, within each neuron the response-to-response amplitude variability was very small ($6 \pm 3\%$), and, once effective location and intensity of stimulation was found, no transmission failure was observed. The latencies appeared to be correlated to the distance of the stimulation electrode from the recorded neurons. The low conduction velocity of 5-HT fibers (Jones, 1982; Goldfinger et al., 1992), together with their tortuous topology, also could explain the large latency variability. We did not detect D-AP-5/CNQX-resistant evoked postsynaptic currents in any of the remaining 19 cells that responded to 5-HT application (see above). In addition, three IS, nine RSNP, and four pyramidal neurons that did not respond to 5-HT bath application were also tested as negative controls. No D-AP-5/CNQX-resistant postsynaptic currents were recorded in these cells.

These results indicated that 5-HT₃R can mediate fast synaptic excitation of 5-HT_{3A}-expressing VIP/CCK neocortical interneurons by fibers originating from the raphe nucleus.

Convergence of fast serotonergic and nicotinic pathways on a subset of VIP/CCK interneurons

It has been shown previously that nicotinic receptor agonists selectively excite a subpopulation of GABAergic interneurons coexpressing VIP and CCK via the activation of somatodendritic nicotinic receptors containing the $\alpha 4$, $\alpha 5$, and $\beta 2$ subunits (Porter et al., 1999). To establish whether 5-HT₃ and nicotinic receptors

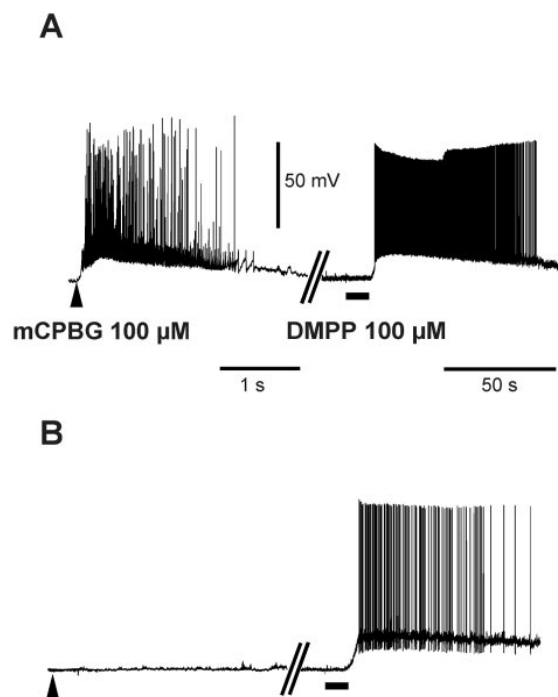


Figure 5. 5-HT₃R expression is restricted to a subset of DMPP-sensitive interneurons. On 86 recorded neurons we successively applied mCPBG (local pressure application, 100 μM; 50 msec) and the nicotinic agonist DMPP (bath application, 100 μM). All of the mCPBG-responsive neurons ($n = 7$) also responded to DMPP (*A*). However, 42 neurons responded only to DMPP (*B*), and 37 neurons did not show any response (data not shown). DMPP responses were not affected by tropisetron (1 nM; data not shown).

are expressed by the same interneurons, we sequentially applied mCPBG (100 μM; local pressure application), and the nicotinic agonist DMPP (100 μM; bath application) to another set of nonpyramidal neurons ($n = 86$, including 79 RSNP, 3 FS, and 4 IS cells). All of the mCPBG-responsive neurons ($n = 7$) also responded to DMPP (Fig. 5*A*). Forty-two neurons responded only to DMPP (Fig. 5*B*), and 37 neurons were not responsive to either mCPBG or DMPP (data not shown). Neurons responsive only to mCPBG were not observed in our sample. Neurons responding only to DMPP showed a lower occurrence of CCK (35% in 20 neurons that were analyzed molecularly; data not shown) compared with 5-HT₃R-expressing neurons (100%; see above). No other significant difference was observed among their firing patterns, morphologies, or molecular profiles. Therefore, these data indicated that 5-HT₃R-expressing neurons represented a subset of DMPP-responsive interneurons. It must be noted that no nicotinic receptor-mediated EPSC was observed in the above stimulation experiments despite the reported existence of cholinergic synaptic junctions in the neocortex, albeit at a low incidence (Chedotal et al., 1994; Umbriaco et al., 1994). The fact that DMPP responses were not affected by tropisetron (1 nM; $n = 3$ responsive neurons; data not shown) confirms that the above D-AP-5/CNQX-resistant EPSCs indeed were mediated by 5-HT₃Rs.

DISCUSSION

In the present study we found that, in the rat neocortex, 5-HT₃R expression was restricted to a subset of IS and RSNP GABAergic

interneurons that coexpressed VIP and CCK. The occurrence of evoked fast EPSCs mediated by 5-HT₃Rs in these interneurons suggested that they received synaptic inputs from the raphe nuclei, as further emphasized by the presence of close appositions between 5-HT-immunostained nerve terminals and 5-HT₃R-responsive neurons. Finally, 5-HT₃R-responsive interneurons represented a subset of interneurons responding to nicotinic agonists.

5-HT₃R is expressed selectively by a subset of VIP/CCK-expressing GABAergic interneurons

Using single-cell RT-mPCR, we probed for the expression of both 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} subunits in neocortical neurons. We found that the expression of the 5-HT_{3A} subunit was selective for VIP/CCK-expressing GABAergic interneurons. In contrast, no 5-HT_{3B} transcripts were detected, either at the single neuron level or in total neocortical RNA preparations (see Materials and Methods). Together, the present results agree with previous findings of the neocortical expression of 5-HT₃Rs demonstrated by radioligand binding, *in situ* hybridization, and immunocytochemistry (Kilpatrick et al., 1987, 1988; Barnes et al., 1990; Gehlert et al., 1991; Laporte et al., 1992; Morales et al., 1996a, 1998; Morales and Bloom, 1997) but further indicate that these receptors are composed primarily with the 5-HT_{3A} subunit.

Consistent with previous studies, we detected 5-HT₃R expression only in CCK-containing GABAergic interneurons that also expressed CB and CR (Morales et al., 1996a; Morales and Bloom, 1997). 5-HT₃-expressing neurons represented 33% of our CCK-positive interneurons, in accordance with an earlier study (Morales and Bloom, 1997). Assuming that CCK is expressed by 10% of interneurons (Demeulemeester et al., 1988) and that interneurons represent 20% of neocortical neurons, 5-HT₃R would be expressed in 0.7% of the neurons in the neocortex. In the present study we found that 5-HT₃R-containing interneurons were also characterized by VIP expression, which is coexpressed mainly with CCK in the neocortex (Papadopoulos et al., 1987b; Kubota and Kawaguchi, 1997; Cauli et al., 2000). 5-HT_{3A}-expressing neurons represented 27% of our sampled VIP-positive neurons. A similar assumption as above with VIP (present in ~20% of neocortical interneurons; Kubota et al., 1994; Cauli et al., 1997) indicates the expression of 5-HT₃R in 1% of the neurons in the neocortex. 5-HT₃R-expressing neurons therefore would represent 0.7–1% of neocortical neurons.

5-HT₃R-expressing neurons exhibited IS or RSNP firing properties with an IS/RSNP proportion (0.35) similar to that we reported previously for VIP/CCK interneurons (0.5; Cauli et al., 2000). Conversely, the proportion of 5-HT₃-positive cells in our sampled IS neurons (42%) was equivalent to that observed in RSNP VIP/CCK interneurons (38%). Together, the present results support our previous studies indicating that neocortical IS and RSNP VIP/CCK interneurons form a relatively homogeneous cell type (Cauli et al., 2000), also characterized by the selective expression of postsynaptic nicotinic receptors (Porter et al., 1999).

Selective excitation of neocortical VIP/CCK interneurons mediated by the 5-HT₃Rs

We observed an excellent correlation between 5-HT-evoked rapid depolarizing responses blocked by tropisetron and the expression of the 5-HT_{3A} subunit in VIP/CCK interneurons. This clearly indicated that the 5-HT₃R-mediated excitation of these interneurons was attributable to the activation of postsynaptic

receptors. This is in agreement with immunocytochemical studies that described a dense labeling of neocortical interneuron somata with 5-HT₃R antibodies (Morales et al., 1996b; Morales and Bloom, 1997; Jakab and Goldman-Rakic, 2000). A similar excitation of interneurons via somatodendritic 5-HT₃R has been reported in hippocampal (Kawa, 1994; McMahon and Kauer, 1997) and neocortical layer I (Zhou and Hablitz, 1999) interneurons. As described by these authors, 5-HT₃R activation resulted in an inward current that showed a large amplitude variability from one cell to another (from 22 to 319 pA). The present results provide a direct correlation between the expression of native 5-HT_{3A} receptors and their ligand-gated ion channel function.

Coexpression of 5-HT₃R and nicotinic receptors in VIP/CCK interneurons

Because IS interneurons and RSNP cells coexpressing VIP and CCK had been shown previously to be responsive selectively to nicotinic stimulation (Porter et al., 1999), we investigated whether the same interneurons could be excited by both 5-HT₃R and nicotinic agonists (mCPBG and DMPP, respectively). We found that all mCPBG-responsive cells also responded to DMPP and therefore represented a subgroup (14%) of DMPP-responsive neurons. This finding discloses a remarkable convergence between putative serotonergic and cholinergic fast transmission in the same interneuron subtype.

Nicotinic receptors expressed by VIP/CCK interneurons are formed with a combination of the $\alpha 4$, $\alpha 5$, and $\beta 2$ subunits (Porter et al., 1999). It has been shown that the 5-HT_{3A} subunit can coassemble with the $\alpha 4$ nicotinic subunit in heterologous expression systems to form functional hybrid receptors that are activated by 5-HT₃R agonists, but not by nicotinic agonists (van Hooft et al., 1998; Kriegler et al., 1999). Our results suggest that both the nicotinic $\alpha 4$ and the 5-HT_{3A} subunits can be expressed in the same interneurons and thus open the possibility that such hybrid receptors exist in native conditions. The absence of discriminative pharmacological tools did not allow us to investigate the existence of 5-HT_{3A}- $\alpha 4$ hybrid receptors. However, if 5-HT_{3A}-expressing interneurons contain such hybrid receptors, they also express “pure” nicotinic receptors, because all of them also responded to DMPP.

5-HT₃R mediate fast synaptic excitation of VIP/CCK neocortical interneurons

Many histochemical studies have reported a dense innervation of neocortical interneurons by serotonergic fibers originating from the midbrain raphe nuclei (Mulligan and Tork, 1988; Seguela et al., 1989; DeFelipe et al., 1991; Hornung and Celio, 1992; Smiley and Goldman-Rakic, 1996). In addition, at the electron microscopy level it has been shown that some of the 5-HT varicosities form identifiable synapses onto their cortical targets (Descarries et al., 1975; Papadopoulos et al., 1987a; Seguela et al., 1989; Smiley and Goldman-Rakic, 1996; Paspalas and Papadopoulos, 2001). In the present study, using two-channel confocal microscopy, we observed close appositions of 5-HT fibers on the dendrites and somata of 5-HT₃R-expressing interneurons, suggestive of possible synaptic contacts.

In five neurons showing fast depolarizing responses to 5-HT, electrical stimulation evoked robust D-AP-5/CNQX-resistant EPSCs of large amplitude. The complete block of these currents by the highly selective antagonist tropisetron indicated that they resulted from the activation of 5-HT₃R. The short mean latency to peak of these EPSCs (1.6 msec), together with the absence of

serotonergic neocortical intrinsic neurons, indicates that the tropisetron-sensitive EPSCs were attributable to the stimulation of 5-HT fibers originating from the raphe nuclei. Although 5-HT₃R-mediated synaptic responses have been reported previously (Sugita et al., 1992; Roerig et al., 1997), we establish here a clear correlation between the functional expression of the 5-HT_{3A} receptor subunit in VIP/CCK GABAergic interneurons and its synaptic activation by serotonergic afferent fibers.

The most remarkable characteristics of the 5-HT₃R-mediated EPSCs were their “all or none” behavior and their high amplitude, suggesting that they resulted from the stimulation of a single 5-HT fiber, which probably excited the neuron via multiple synaptic contacts. Indeed, the amplitude of the EPSCs (-240 ± 50 pA) was always superior to that necessary to induce action potential discharge in these neurons (below 50 pA at a membrane potential of -71 mV), suggesting that a single raphe serotonergic neuron could synchronize the activity of its VIP/CCK neocortical interneuron target.

Because 5-HT₃R appear to mediate fast direct synaptic excitation from the raphe nucleus to neocortical interneurons, their selective expression by the VIP/CCK GABAergic subtype may have important functional implications. It is known that peptidergic release requires higher levels of activity than that of classical neurotransmitters (for review, see Zupanc, 1996). It might be hypothesized that, with the excitation via 5HT₃R, VIP/CCK interneurons would reach the activity threshold of CCK release. Synaptic activation of neocortical VIP/CCK interneurons by the raphe serotonergic system therefore might provide a functional and cellular explanation to the well known involvement of both 5HT₃R and CCK in anxiety and other emotional disorders (for review, see van Meegen et al., 1996).

REFERENCES

- Barnes JM, Barnes NM, Champaneria S, Costall B, Naylor RJ (1990) Characterization and autoradiographic localization of 5-HT₃ receptor recognition sites identified with [³H]-(-)-zacopride in the forebrain of the rat. *Neuropharmacology* 29:1037–1045.
- Bayraktar T, Staiger JF, Acsady L, Cozzari C, Freund TF, Zilles K (1997) Colocalization of vasoactive intestinal polypeptide, γ -aminobutyric acid, and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Res* 757:209–217.
- Bayraktar T, Welker E, Freund TF, Zilles K, Staiger JF (2000) Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory cortex: morphology and spatial relationship to barrel-related columns. *J Comp Neurol* 420:291–304.
- Bochet P, Audinat E, Lambolez B, Crepel F, Rossier J, Iino M, Tsuzuki K, Ozawa S (1994) Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* 12:383–388.
- Brown AM, Hope AG, Lambert JJ, Peters JA (1998) Ion permeation and conduction in a human recombinant 5-HT₃ receptor subunit (h5-HT_{3A}). *J Physiol (Lond)* 507[Pt 3]:653–665.
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17:3894–3906.
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E (2000) Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6144–6149.
- Chedotal A, Umbriaco D, Descarries L, Hartman BK, Hamel E (1994) Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the neurovascular relationships of choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide nerve terminals in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 343:57–71.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13:99–104.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF (1999) The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin receptor function. *Nature* 397:359–363.
- DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T, Jones EG (1991) Synaptic rela-

- tionships of serotonin-immunoreactive terminal baskets on GABA neurons in the cat auditory cortex. *Cereb Cortex* 1:117–133.
- Demeulemeester H, Vandesande F, Orban GA, Brandon C, Vanderhaeghen JJ (1988) Heterogeneity of GABAergic cells in cat visual cortex. *J Neurosci* 8:988–1000.
- Demuro A, Palma E, Eusebi F, Milei R (2001) Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by bicuculline. *Neuropharmacology* 41:854–861.
- Derkach V, Surprenant A, North RA (1989) 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* 339:706–709.
- Descarries L, Beaudet A, Watkins KC (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100:563–588.
- Erkkil   BE, Wotring VE, Weiss DS (2001) Picrotoxin inhibits $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *Soc Neurosci Abstr* 35.16.
- Gehlert DR, Gackenh  mer SL, Wong DT, Robertson DW (1991) Localization of 5-HT₃ receptors in the rat brain using [³H]LY278584. *Brain Res* 553:149–154.
- Goldfinger MD, Roettger VR, Pearson JC (1992) Theoretical studies of impulse propagation in serotonergic axons. *Biol Cybern* 66:399–406.
- Hanna MC, Davies PA, Hales TG, Kirkness EF (2000) Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT₃ receptors in rodents. *J Neurochem* 75:240–247.
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC, Lawson DE, Heizmann CW, Streit P (1989) Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res* 76:467–472.
- Hornung JP, Celio MR (1992) The selective innervation by serotonergic axons of calbindin-containing interneurons in the neocortex and hippocampus of the marmoset. *J Comp Neurol* 320:457–467.
- Houser CR, Hendry SH, Jones EG, Vaughn JE (1983) Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J Neurocytol* 12:617–638.
- Jakab RL, Goldman-Rakic PS (2000) Segregation of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *J Comp Neurol* 417:337–348.
- Jones RS (1982) Responses of cortical neurones to stimulation of the nucleus raphe medianus: a pharmacological analysis of the role of indoleamines. *Neuropharmacology* 21:511–520.
- Kawa K (1994) Distribution and functional properties of 5-HT₃ receptors in the rat hippocampal dentate gyrus: a patch-clamp study. *J Neurophysiol* 71:1935–1947.
- Kawaguchi Y (1993) Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 69:416–431.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16:2701–2715.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476–486.
- Kilpatrick GJ, Jones BJ, Tyers MB (1987) Identification and distribution of 5-HT₃ receptors in rat brain using radioligand binding. *Nature* 330:746–748.
- Kilpatrick GJ, Jones BJ, Tyers MB (1988) The distribution of specific binding of the 5-HT₃ receptor ligand [³H]GR65630 in rat brain using quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* 94:156–160.
- Kriegler S, Sudweeks S, Yakel JL (1999) The nicotinic $\alpha 4$ receptor subunit contributes to the lining of the ion channel pore when expressed with the 5-HT₃ receptor subunit. *J Biol Chem* 274:3934–3936.
- Kubota Y, Kawaguchi Y (1997) Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Res* 752:175–183.
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994) Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649:159–173.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9:247–258.
- Laporte AM, Koscielniak T, Ponchant M, Verge D, Hamon M, Gozlan H (1992) Quantitative autoradiographic mapping of 5-HT₃ receptors in the rat CNS using [¹²⁵I]iodo-zacopride and [³H]zacopride as radioligands. *Synapse* 10:271–281.
- Lidov HG, Grzanna R, Molliver ME (1980) The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat—an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 5:207–227.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254:432–437.
- Mayer ML, Straughan DW (1981) Effects of 5-hydroxytryptamine on central neurones antagonized by bicuculline and picrotoxin. *Neuropharmacology* 20:347–350.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54:782–806.
- McMahon LL, Kauer JA (1997) Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. *J Neurophysiol* 78:2493–2502.
- Morales M, Bloom FE (1997) The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J Neurosci* 17:3157–3167.
- Morales M, Battenberg E, de Lecea L, Bloom FE (1996a) The type 3 serotonin receptor is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Brain Res* 731:199–202.
- Morales M, Battenberg E, de Lecea L, Sanna PP, Bloom FE (1996b) Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptor in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 36:251–260.
- Morales M, Battenberg E, Bloom FE (1998) Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT₃ receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 402:385–401.
- Morrison JH, Magistretti PJ, Benoit R, Bloom FE (1984) The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP-positive cell: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 292:269–282.
- Mulligan KA, Tork I (1988) Serotonergic innervation of the cat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 270:86–110.
- Papadopoulos GC, Parnavelas JG, Buijs RM (1987a) Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the serotonin innervation of the rat visual cortex. *J Neurocytol* 16:883–892.
- Papadopoulos GC, Parnavelas JG, Cavanagh ME (1987b) Extensive coexistence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Res* 420:95–99.
- Paspalas CD, Papadopoulos GC (2001) Serotonergic afferents preferentially innervate distinct subclasses of peptidergic interneurons in the rat visual cortex. *Brain Res* 891:158–167.
- Peters A, Jones EG (1984) Classification of cortical neurons. In: *Cerebral cortex, Vol 1, Cellular components of the cerebral cortex* (Peters A, Jones EG, eds), pp 107–121. New York: Plenum.
- Porter JT, Cauli B, Staiger JF, Lambolez B, Rossier J, Audinat E (1998) Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur J Neurosci* 10:3617–3628.
- Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E (1999) Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19:5228–5235.
- Roerig B, Nelson DA, Katz LC (1997) Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex. *J Neurosci* 17:8353–8362.
- Ropert N, Guy N (1991) Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol (Lond)* 441:121–136.
- Ruano D, Lambolez B, Rossier J, Paternain AV, Lerma J (1995) Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron* 14:1009–1017.
- Sah P (1996) Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles, and modulation. *Trends Neurosci* 19:150–154.
- Seguela P, Watkins KC, Descarries L (1989) Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J Comp Neurol* 289:129–142.
- Smiley JF, Goldman-Rakic PS (1996) Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J Comp Neurol* 367:431–443.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organization in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113–135.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pfl  gers Arch* 423:511–518.
- Sugita S, Shen KZ, North RA (1992) 5-Hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT₃ receptors in rat amygdala. *Neuron* 8:199–203.
- Umbriaco D, Watkins KC, Descarries L, Cozzari C, Hartman BK (1994) Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *J Comp Neurol* 348:351–373.
- van Hooft JA, Spier AD, Yakel JL, Lummis SC, Vijverberg HP (1998) Promiscuous coassembly of serotonin 5-HT₃ and nicotinic $\alpha 4$ receptor subunits into Ca²⁺-permeable ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11456–11461.
- van Megen HJ, Westenberg HG, den Boer JA, Kahn RS (1996) Cholecystokinin in anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol* 6:263–280.
- Wang SD, McCollum N, Morales M (2001) Differential expression of the 5-HT₃ receptor subunits A and B in CNS and PNS. *Soc Neurosci Abstr* 600.6.
- Yang J, Mathie A, Hille B (1992) 5-HT₃ receptor channels in dissociated rat superior cervical ganglion neurons. *J Physiol (Lond)* 448:237–256.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1999) Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 82:2989–2999.
- Zupanc GK (1996) Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron* 27:35–91.

2. LES INTERNEURONES VIP/CCK ET LA MODULATION DE L'ACTIVITÉ NÉOCORTICALE PAR LE SYSTÈME OPIOÏDE ENDOGÈNE.

2.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2 : « The Cellular Crosstalk Between Nicotine And Morphine In The Neocortex. »

2.1.1. INTRODUCTION.

Les données présentées jusqu'ici indiquent que les interneurones VIP/CCK jouent un rôle spécifique dans la modulation de l'activité du réseau néocortical par les systèmes cholinergiques et sérotoninergiques ascendants.

Une étude immunocytochimique a révélé que, dans le néocortex de rat, les interneurones GABAergiques qui contiennent le neuropeptide VIP expriment sélectivement le récepteur opioïde de type μ ainsi que la préproenképhaline (*Taki et al., 2000*). Ces résultats suggèrent, tout d'abord, que les interneurones VIP/CCK pourraient constituer une cible préférentielle de l'action des substances opiacées telles que la morphine dans le néocortex. De plus, parce que la préproenképhaline donne naissance à des peptides opioïdes capables d'activer les récepteurs opioïdes de type μ , ces données indiquent qu'il pourrait exister une boucle d'autorégulation opioïde, de type paracrine ou autocrine, au sein de cette population d'interneurones.

Pour aller plus loin dans l'exploration fonctionnelle des interneurones VIP/CCK, j'ai donc entrepris d'étudier la manière dont le système opioïde peut réguler leur activité.

En outre, Berrendero et collaborateurs (2002) ont récemment mis en évidence l'implication du récepteur opioïde de type μ dans les réponses comportementales induites par la nicotine. En effet, ils ont montré que, chez des souris pour lesquelles le gène codant pour le récepteur opioïde de type μ a été invalidé, les effets de récompense induits par la nicotine sont supprimés, et le syndrome somatique de sevrage à la nicotine est atténué.

Ces données ont tout particulièrement attiré notre attention. En effet, les interneurones VIP/CCK étant susceptibles d'exprimer à la fois la préproenképhaline, le récepteur opioïde de type μ , et des récepteurs à haute affinité pour la nicotine comprenant les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$, ils constituent un lien cellulaire potentiel entre les systèmes nicotiques et opioïdes dans le néocortex.

2.1.2. RÉSULTATS.

2.1.2.1. Expression Sélective de Récepteurs Opiïdes de Type μ Fonctionnels par les Interneurones VIP/CCK.

Dans cette étude, les neurones néocorticaux exprimant le récepteur opioïde de type μ ont été identifiés et caractérisés, à l'aide de la méthode de patch-clamp couplée à la RT-PCR sur cellule unique, dans les couches I à V de néocortex de rats âgés de 14 à 21 jours.

Sur 57 cellules pyramidales et 197 interneurones ainsi analysés, l'ARN messager codant pour le récepteur opioïde de type μ a été détectée dans 42 neurones qui exprimaient tous les enzymes de synthèse du GABA. Le profil moléculaire de ces interneurones a révélé l'expression fréquente des neuropeptides VIP et CCK (86 et 63 %, respectivement). Enfin, nous avons également détecté l'ARN messager codant pour la proenképhaline dans une majorité de ces interneurones (55 %).

La fonctionnalité des récepteurs opioïdes de type μ exprimés par ces neurones a été testée à l'aide d'un agoniste sélectif de ce récepteur, le DAMGO ([D-Ala₂,N-Me-Phe₄,Gly₅-ol]-enképhaline). Les interneurones exprimant le récepteur opioïde de type μ ont répondu à l'application de DAMGO par une hyperpolarisation inhibitrice, due à l'activation d'un courant sortant. L'observation de telles réponses en présence de tétródotoxine, agent bloquant de la propagation des potentiels d'action, indique qu'elles résultent de l'activation de récepteurs post-synaptiques.

Des expériences complémentaires ont révélé que le courant induit par le DAMGO dans les interneurones présente une rectification entrante, que son potentiel d'inversion est proche du potentiel d'équilibre du potassium, et qu'il est sensible à de faibles concentrations extracellulaires de Barium. Ces données suggèrent que l'activation du récepteur opioïde de type μ conduit à l'ouverture de canaux potassiques à rectification entrante couplés aux protéines G dans le néocortex.

Ces résultats, en accord avec les données obtenues par immunocytochimie confirment l'expression sélective des récepteurs opioïdes de type μ dans une population restreinte d'interneurones GABAergiques du néocortex. Le profil moléculaire de ces interneurones indique qu'ils appartiennent à la population des interneurones de type VIP/CCK. Enfin, les données électrophysiologiques révèlent que l'activation récepteurs opioïdes de type μ dans ces interneurones peut induire une réponse post-synaptique inhibitrice via l'ouverture de canaux potassiques.

2.1.2.2. Convergence des Systèmes Nicotiniques et Opiïdes de Type μ au Niveau des Interneurones VIP/CCK.

Par la suite, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure ces récepteurs opioïdes de type μ et les récepteurs nicotiniques sont co-exprimés au sein de la population des interneurones VIP/CCK. Dans cet objectif, j'ai appliqué un agoniste sélectif des récepteurs nicotiniques, le DMPP (1-1-diméthyl-4-phényl piperazinium), et le DAMGO, successivement, sur les mêmes interneurones, en présence de tétrotoxine. J'ai ainsi observé que 95 % des interneurones répondant au DMPP (n=38) étaient également sensibles au DAMGO. De manière similaire, 97 % des neurones répondant au DAMGO (n=36), ont présenté des réponses lors de l'application de DMPP. Ces résultats indiquent une co-localisation quasi totale des récepteurs post-synaptiques nicotiniques et opioïdes de type μ .

Pour savoir comment les signaux transmis par ces deux types de récepteurs sont intégrés par les interneurones, j'ai effectué par la suite une série d'expériences consistant à observer l'effet du DMPP sur les interneurones en l'absence ou en présence de DAMGO. J'ai ainsi observé que l'excitation induite par le DMPP, qui résulte en une forte décharge de potentiels d'action, était abolie par l'application de DAMGO. En présence de tétrotoxine, l'amplitude de la dépolarisation induite par le DMPP était fortement réduite par l'application de DAMGO. Ces résultats indiquent qu'une intégration des signaux nicotiniques et opioïdiques a lieu, au niveau somato-dendritique, dans les interneurones VIP/CCK.

Les conséquences de cette intégration sur les cibles post-synaptiques des interneurones VIP/CCK ont par la suite été étudiées. Comme précédemment le DMPP était appliqué, dans la solution extracellulaire, en l'absence ou en présence de DAMGO. Ainsi, dans 6 cellules pyramidales et 1 interneurone, le DMPP a induit une forte augmentation de la fréquence et de l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs. Ces réponses à l'application de DMPP étaient totalement bloquées en présence de DAMGO.

Ces résultats ont permis de confirmer la co-localisation des récepteurs nicotiniques et opioïdes de type μ au sein d'une même population d'interneurones GABAergiques. De plus, ils révèlent que la modulation de l'activité des interneurones VIP/CCK a une forte influence sur celle des cellules pyramidales. Ainsi, l'effet désinhibiteur des agonistes opioïdiques qui a été rapporté à plusieurs reprises (*Zieglgansberger et al., 1979; Madison & Nicoll, 1988*) résulte, dans le néocortex, de l'inhibition sélective des interneurones VIP/CCK sensibles à la nicotine.

2.1.2.3. Mise en Évidence d'une Boucle de Régulation Enképhalinergique Autocrine Activée par la Stimulation Nicotinique des Interneurones VIP/CCK.

Nos résultats, en accord avec les données obtenues par immunocytochimie indiquent que les interneurones VIP/CCK expriment la proenképhaline, et donc qu'il peuvent libérer des peptides opioïdes tels que la Met- enképhaline ou la Leu-enképhaline. Ces peptides sont des agonistes puissants des récepteurs opioïdes de type μ . Nous avons donc voulu établir dans quelle mesure la stimulation des interneurones VIP/CCK par les agonistes nicotiques est susceptible d'induire une libération de ces peptides et, par voie de conséquence l'activation des récepteurs opioïdes de type μ . Pour aborder cette question, j'ai enregistré des cellules pyramidales et effectué des applications prolongées de DMPP en l'absence, ou en présence, d'un antagoniste sélectif des récepteurs opioïdes de type μ , le CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂).

En condition contrôle, l'application prolongée de DMPP induisait tout d'abord une augmentation de la fréquence des événements post-synaptiques inhibiteurs. Puis, dans une seconde phase, cette fréquence diminuait pour atteindre des valeurs inférieures à celles enregistrées avant l'application de DMPP. En présence de CTOP une seule phase a été observée, l'application de DMPP provoquait une augmentation de fréquence plus importante des événements post-synaptiques inhibiteurs et, après cette réponse, la fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs retrouvait sa valeur initiale. Ces résultats indiquent que la dépression de la transmission GABAergique observée en l'absence de CTOP résulte de l'activation des récepteurs opioïdes de type μ . Ces expériences ont donc permis de valider l'hypothèse selon laquelle l'activation nicotinique des interneurones VIP/CCK peut induire une libération d'enképhalines endogènes, capables d'activer, dans un mécanisme auto/paracrine, les récepteurs opioïdes de type μ . De plus, ces résultats indiquent que ce mécanisme conduit à une dépression notable de la transmission GABAergique originaire des neurones sensibles à la nicotine et donc à une désinhibition des cellules principales du néocortex. Cette boucle d'autorégulation enképhalinergique spécifique des interneurones VIP/CCK, conditionne très certainement la manière dont leur activation physiologique se répercute sur le réseau néocortical (*Cf. Discussion Générale*).

2.1.3. DISCUSSION.

Les effets de dépendance induits par la consommation chronique de nicotine, comme de nombreuses autres drogues, sont généralement attribués à la stimulation de voies dopaminergiques méso-limbiques et méso-corticales

(Robbins & Everitt, 1999). Cependant, depuis le début des années 1980, de nombreuses études pharmacologiques et comportementales ont rapporté la participation du système opioïde endogène dans les effets d'antinociception, de récompense et de dépendance physique induits par la nicotine (*pour revue, voir Pomerleau, 1998*). Ceci a été récemment confirmé par l'observation d'une altération de ces effets chez des souris dont le gène du récepteur opioïde de type μ a été invalidé (Berrendero *et al.*, 2002). Carboni et collaborateurs (2000) ont mis en évidence une composante opioïdergique, indépendante des voies dopaminergiques, dans les mécanismes responsables des syndromes somatiques liés au sevrage d'animaux traités chroniquement à la nicotine. Ainsi, la diminution de la stimulation des voies dopaminergiques, dites de récompense, lors du sevrage à la nicotine serait responsable des symptômes de type dépressifs, alors que les réponses de type anxiété, irritabilité, seraient plutôt attribués à une composante opioïdergique (Malin, 2001). Cependant, ces approches comportementales ne permettent pas d'identifier les composants cellulaires responsables de telles interactions.

Au sein du néocortex nous avons observé que la nicotine peut induire une libération d'enképhalines endogènes qui résulte en une désinhibition des cellules principales, par un mécanisme cellulaire spécifique des interneurones VIP/CCK. Ce mécanisme pourrait participer aux effets positifs de la nicotine sur les performances cognitives (Levin, 1992), mais également aux réponses liées à la consommation chronique de nicotine. Les données dont nous disposons actuellement sur les interneurones VIP/CCK indiquent qu'ils représentent un point de convergence remarquable entre de nombreuses voies de neurotransmission/neuromodulation impliquées dans les états émotionnels et motivationnels (*Cf. Discussion Générale*). Nous avons notamment mis en évidence l'expression de récepteurs 5-HT₃ dans une sous-population d'interneurones VIP/CCK sensibles à la nicotine (*Cf. Article 1*). Des expériences complémentaires effectuées en présence de tétradotoxine ont révélé que tous les neurones sensibles à un agoniste sélectif du récepteur 5-HT₃ répondent également à l'application d'agonistes nicotiniques et opioïdergiques de type μ (n=19, résultats non illustrés). Les effets anxiolytiques des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ ont été rapportés à plusieurs reprises (Jones *et al.*, 1988; Costall *et al.*, 1990; Roychoudhury & Kulkarni, 1997). De manière similaire, la CCK est bien connue pour ses effets anxiogènes puissants (van Meegen *et al.*, 1996). Ces données suggèrent que les interneurones VIP/CCK participent aux effets émotionnels et motivationnels induits par la consommation de nicotine. Cependant, il est encore difficile, à l'heure actuelle de spéculer sur la manière dont les interactions entre ces différents systèmes de neurotransmission, sont susceptibles de se répercuter sur les réponses comportementales induites par la nicotine.

Des études indiquent que les effets de la nicotine pourraient être relayés par le système opioïde (enképhalines/récepteur de type μ), dans un mécanisme cellulaire, similaire à celui que nous avons observé, au niveau d'autres structures du système nerveux central. En effet, une augmentation du niveau d'expression de la préproenképhaline a été détectée, à la suite d'un traitement aigu à la nicotine, dans le striatum et l'hippocampe (Houdi *et al.*, 1998). Dans le cas de traitements chroniques à la nicotine, le niveau d'expression de la préproenképhaline était notablement diminué dans ces structures, et présentait un rebond spectaculaire lors de la cessation du traitement. Parallèlement à ces données, une diminution de Met-enképhaline accompagnée d'une augmentation de l'expression des récepteurs opioïdes de type μ a été rapportée dans le striatum d'animaux traités chroniquement à la nicotine (Wewers *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que le mécanisme de libération d'enképhaline suivie de l'activation des récepteurs opioïdes de type μ que nous avons mis en évidence au niveau du néocortex n'est vraisemblablement pas exclusif à cette structure, et qu'il est probablement sujet à de fortes adaptations dans des conditions de traitement chronique, puis de sevrage à la nicotine. Il serait donc particulièrement pertinent d'étudier l'évolution de ce mécanisme dans de telles conditions.

A l'heure actuelle, de nombreuses données indiquent que les circuits neuronaux qui participent aux phénomènes de dépendance aux drogues telles que la nicotine ou les substances opiacées, sont intimement liés à ceux que l'on sait impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Nestler, 2002). Ainsi, diverses structures sont considérées comme centrales dans les processus d'adaptation moléculaire et cellulaire liés à l'apprentissage mais aussi à la dépendance. On citera pour exemple : l'hippocampe, structure particulièrement importante pour la mémoire déclarative et spatiale, le striatum ventral (noyau accumbens) impliqué dans la mémoire des états émotionnels positifs, le striatum dorsal qui joue un rôle dans la mémoire motrice, et l'amygdale particulièrement impliquée dans la mémoire des états émotionnels négatifs. Le néocortex, structure hautement intégrative, contrôle l'attention à ces divers domaines via des fonctions exécutives, pour finalement conditionner les réponses aux stimuli environnementaux. Les résultats présentés dans ce second article suggèrent que le néocortex, site d'interaction entre les systèmes nicotinique et opioïde endogène, peut également être directement impliqué dans les phénomènes d'adaptation moléculaire et cellulaire liés à la consommation de nicotine ou de substances opiacées.

2.2. ARTICLE 2 : The Cellular Crosstalk Between Nicotine and Morphine in the Neocortex.

The Cellular Crosstalk Between Nicotine and Morphine in the Neocortex

Isabelle Férézou*, Elisa Hill*, Bruno Cauli*, Nathalie Gibelin*, Takeshi Kaneko#, Jean Rossier*, Bertrand Lambollez*

**Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, CNRS UMR 7637, École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.*

#Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan.

Current hypotheses for tobacco smoking reinforcement and addiction involve endogenous neurotransmitters that mediate downstream activation of brain reward circuits by nicotine¹. The recent demonstration that nicotine effects are hampered in μ -opioid receptor (MOR) knock-out mice² supports previous evidence for the involvement of endogenous opioids in tobacco abuse^{1,3}. Yet, the cellular mechanisms and neuronal circuits underlying such interaction remain to be determined. Here we show that the neocortical circuit activated by nicotine contains an intrinsic μ -opioid component that allows rapid silencing of nicotine responsive interneurons and network disinhibition. The dynamic properties of this circuit suggest changes in neocortical integration that help to explain the transition from acute nicotine effects to dependence. The sharing of a common cortical circuit by nicotine and opiates may contribute to the context sensitivity of their similar relapse patterns^{1,3,4}.

In the neocortex, nicotinic agonists selectively excite a subset of GABAergic interneurons that co-express vasoactive intestinal peptide (VIP) and cholecystokinin via postsynaptic receptors containing the nicotinic $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits⁵. These subunits constitute the primary site of nicotine action^{6,7}. The observation that MOR and its endogenous agonist enkephalin are expressed by VIP-containing GABAergic neocortical interneurons⁸ suggested a potential interaction site between nicotinic and opioid systems.

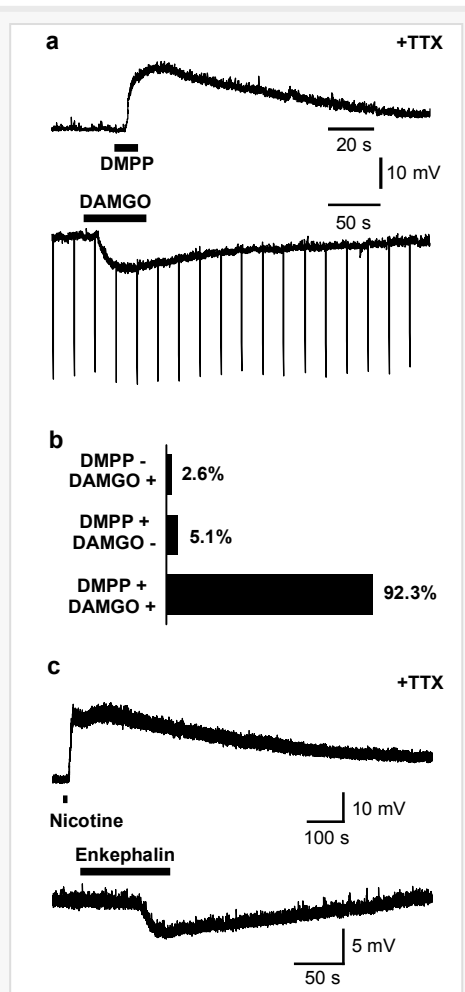
The colocalization of nicotinic receptors and MOR was examined by sequential applications of their selective agonists (1-1-dimethyl-4-phenyl piperazinium, DMPP and [D-Ala2,N-Me-Phe4,Gly5-ol]-enkephalin, DAMGO, respectively) on neocortical interneurons from layers I to V (Fig. 1a, b). As previously reported, nicotine responsive interneurons, found in all layers, were depolarized by DMPP application (19.2 ± 1.1 mV, n=10) through the activation of somatodendritic receptors^{5,9,10}. DAMGO responses, that consisted of a TTX resistant hyperpolarization (10.4 ± 1.9 mV, n=10), were observed in the majority of DMPP responsive interneurons. Indeed, among 39 responsive neurons, 36 responded to both agonists. DMPP and DAMGO responses were mimicked by nicotine and the endogenous MOR agonist methionine-enkephalin respectively (Fig. 1c). Consistent with the expression of the high affinity $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits^{5,6,7}, a low dose of nicotine (1 μ M) also depolarized these neurons and triggered action potentials (n=3, not shown). The almost complete overlap between nicotine and μ -opioid responsive interneuron populations in cortical layers I to V indicates that interactions between these neurotransmitter systems occur at the cellular level.

Figure 1 : A single interneuron population responds to both nicotinic and μ -opioid agonists.

a: As shown for this representative neuron recorded in current-clamp conditions, DMPP (100 μ M) induced depolarizing responses, whereas DAMGO induced hyperpolarizing responses (Steps of -50 pA were applied every 20s).

b: Extensive overlap of nicotinic and μ -opioid responsive populations.

c: This typical example of responses to nicotine (100 μ M, 15.3 ± 3.4 mV, n=3) and Met-enk (30 μ M, -4.9 ± 1.9 mV, n=6) illustrates their similarity with those induced by DMPP and DAMGO, respectively. Note the long lasting effect of nicotine.



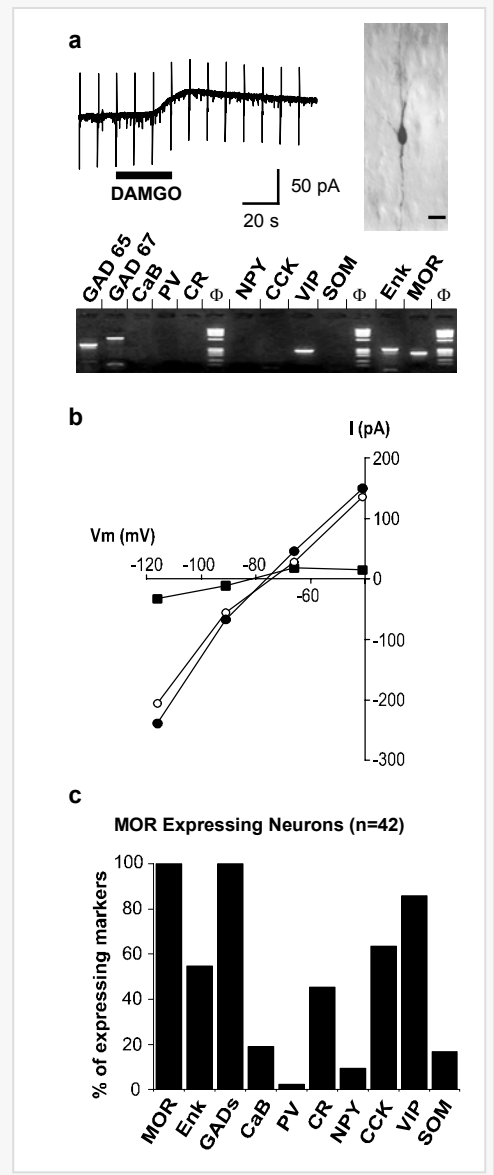
MOR expression was next examined by single cell RT-PCR¹¹ on 57 pyramidal neurons and 197 interneurons. MOR mRNA was only detected in 42 GABAergic interneurons, confirming that neocortical MOR expression is restricted to a subpopulation of inhibitory interneurons⁸. All MOR-expressing interneurons tested responded to DAMGO (n=18, *Fig. 2a*). Conversely, DAMGO responses were not observed in pyramidal neurons or in other interneurons (n=19 and 103, respectively). DAMGO responses were totally blocked by the selective MOR antagonist CTOP (n=4, *not shown*). Altogether, these results correlate DAMGO responses to the activation of somatodendritic MORs in neocortical interneurons. In voltage-clamp conditions, DAMGO responses (n=46) consisted of an outward current (16.3 ± 6.8 pA) associated with a decrease in membrane resistance (215.9 ± 143.5 M Ω). The DAMGO-induced current exhibited inward rectification and reversed at the equilibrium potential of potassium (*Fig. 2b*). Moreover, this current was blocked in the presence of 200 μ M barium (n=5, *not shown*). These results indicate that neocortical MOR activation leads to the opening of G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels, as described in other structures¹².

MOR-expressing interneurons were characterized by the frequent expression of VIP, cholecystinin, enkephalin and calretinin, and the low occurrence of calbindin, somatostatin, neuropeptide-Y and parvalbumin (*Fig. 2c*), in good agreement with a previous immunocytochemical study⁸. The bipolar/bitufted morphology of most MOR-expressing neurons⁸ (*Fig. 2a*), their spiking patterns¹³⁻¹⁵, and their expression profile indicate they belong primarily to the VIPergic interneuron type¹⁶. Expression of δ and κ -opioid receptors and of dynorphin mRNAs showed only minor overlap with that of MOR mRNA (see supplementary information). Pro-opio-melanocortin was never detected, confirming that enkephalin is the only μ -opioid endogenous agonist in the neocortex¹⁷⁻¹⁹. As expected, the expression profile of MOR-positive neurons was remarkably similar to that reported for nicotine responsive interneurons⁵.

Figure 2 : Characterization of MOR-expressing neurons.

a: DAMGO induced a slow outward current with a peak amplitude of 32 pA (upper left panel), in a neuron recorded in voltage-clamp mode (V_H , -71 mV, with steps of -5 mV applied every 10 s). Single cell RT-PCR analysis of this neuron showed the expression of MOR together with GAD 65, GAD 67, VIP and Enk (lower left panel, Φ :MW marker). Labeling of the same neuron by biocytin (right panel, bar: 20 μ m) revealed a bipolar morphology typical of VIP-expressing interneurons. **b:** Current-voltage plots obtained from another cell in control conditions (open circles) and at the peak of the DAMGO response (filled circles). The third plot (filled squares) shows the DAMGO-induced current obtained by subtracting control values. DAMGO-induced current reversed at -84.2 ± 1.6 mV ($n=4$), close to E_K (-85 mV in our conditions).

c: Single cell RT-PCR analyses of 57 pyramidal neurons and 197 GABAergic interneurons revealed MOR expression in 42 interneurons containing GAD 67 and/or GAD 65 (GADs), characterized by a high occurrence of VIP, CCK, and the endogenous MOR agonist Enk (86, 63, and 55%, respectively).



The functional consequences of MOR and nicotinic receptor colocalization were next investigated in responsive interneurons and their postsynaptic target neurons. In interneurons, the DMPP-induced action potential discharge was prevented by DAMGO ($n=4$, *Fig. 3a*). In the presence of TTX, DMPP responses (10.9 ± 5.7 mV) were reduced to 28 % of control in the presence of DAMGO (3.1 ± 2.1 mV) and recovered upon DAMGO washout (8.2 ± 3.6 mV, $n=5$, not shown). In their postsynaptic targets, DMPP stimulation of nicotine responsive interneurons induced a large increase in the amplitude and frequency of inhibitory postsynaptic currents (IPSC) that was suppressed in the presence of DAMGO and recovered after DAMGO washout (*Fig. 3b,c*). These results confirm that MOR and nicotinic receptor expression patterns overlap extensively within the same GABAergic interneuron population. These interneurons selectively

integrate nicotinic and MOR effects at the somatodendritic level, although further integration may occur at the axonal level²⁰. Previous studies have established that interneuron inhibition by enkephalin causes a disinhibition of pyramids and other interneurons^{21,22}. Our observations demonstrate that this effect is mediated by MOR inhibition of nicotine responsive VIP interneurons.

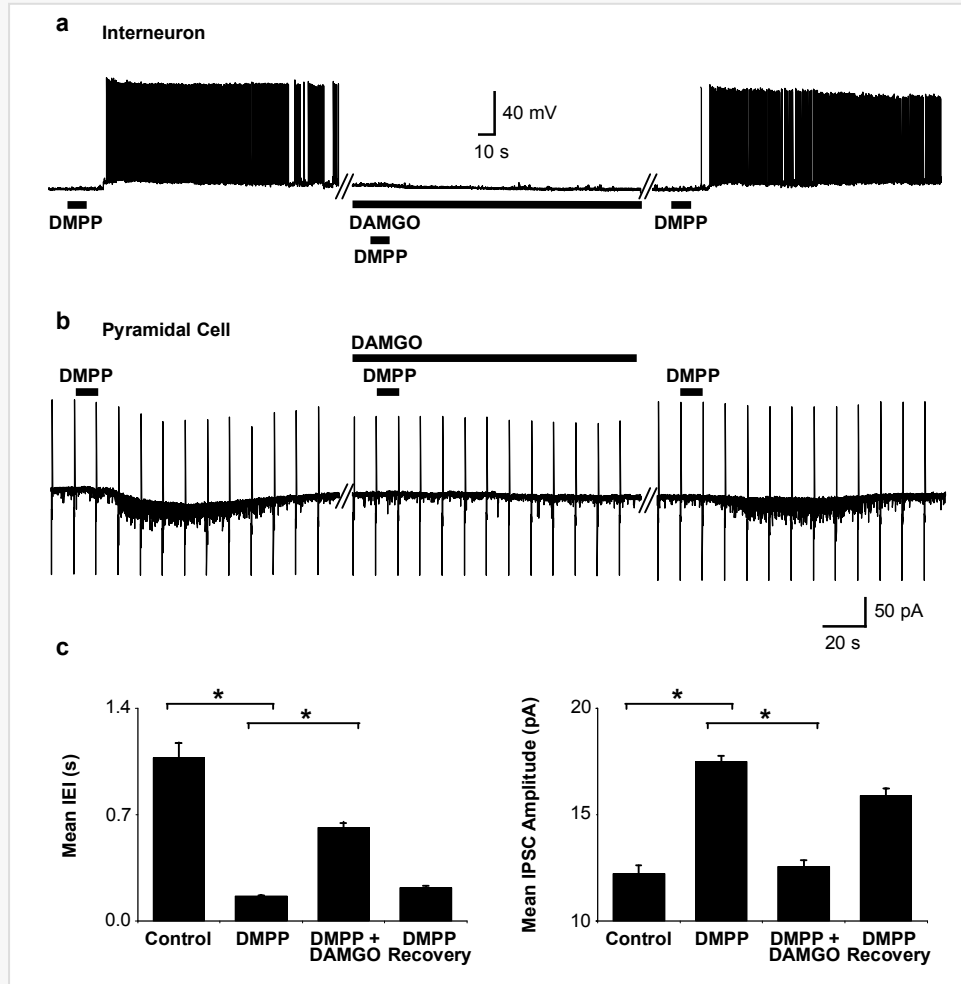


Figure 3. Integration of nicotinic and MOR responses by interneurons modulates their GABA output.

a: In this interneuron recorded in current-clamp conditions, DMPP (100 μ M) elicited an action potential discharge that was prevented in the presence of DAMGO (2.5 μ M) and recovered after DAMGO washout. This effect was observed in 3 additional interneurons.

b: The voltage-clamp recording of a pyramidal neuron (V_H , -71 mV, with steps of -5 mV applied every 10 s) shows that the IPSC increase induced by DMPP application was totally blocked in the presence of DAMGO, and recovered after DAMGO washout.

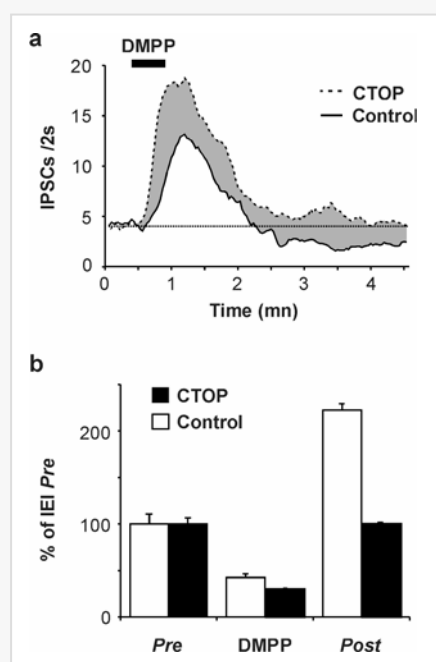
c: Mean IPSC inter-event interval (IEI) and amplitude recorded for 6 pyramidal neurons and 1 interneuron in control conditions and following DMPP application: prior to DAMGO, in the presence of DAMGO and after DAMGO washout (recovery). Asterisk, $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks followed by a Dunn's test.

The co-expression of enkephalin and MOR in these interneurons suggests nicotine can activate a μ -opioid autocrine loop at the single-neuron or at the population level. We thus examined the effects of MOR activation by endogenous enkephalin released upon nicotinic stimulation (*Fig. 4*). The changes in IPSC frequency induced by prolonged DMPP application were determined in pyramidal neurons, either in the absence (control) or in the continuous presence of the MOR antagonist CTOP. In control conditions, DMPP induced an initial phase where the IPSC frequency was increased, followed by a period where IPSC frequency was lower than the pre-DMPP baseline value (*Fig. 4a*). Accordingly, in control conditions, the intervals between IPSC measured in the first and second phase both differed significantly from the pre-DMPP value ($p < 0.001$, *Fig. 4b*). In the presence of CTOP, the first phase of DMPP effects was potentiated. Then, in contrast with control conditions, the IPSC frequency subsequently returned to the pre-DMPP value without undershooting the baseline (*Fig. 4a,b*).

Figure 4. Nicotinic stimulation activates the endogenous μ -opioid system.

a: Effect of prolonged DMPP application on IPSC frequency recorded in pyramidal neurons, in the absence ($n=11$) or in the presence ($n=11$) of CTOP ($1 \mu\text{M}$). The gray area indicates the effect of MOR activation by endogenous enkephalin.

b: Same results presented as mean IEI measured before (pre, 0-30 s), during (DMPP, 50-100 s) and after (post, 180-280 s) the peak response to DMPP. IEIs are expressed as percentages of the pre values. Post IEI differed significantly from pre IEI values in control ($P < 0.001$) but not in CTOP condition ($P = 0.88$, two way analysis of variance completed by the Holm-Sidak method of comparison).



From these results, it can be inferred that stimulation of nicotine responsive interneurons leads to auto/paracrine MOR activation via enkephalin release. Physiological stimulation of these interneurons likely produces the same effect. Hence, the μ -opioid system endows VIP interneurons with an activity-dependent auto-inhibitory mechanism that first increases the amplitude and duration of their GABA output and then depresses this output in the post-stimulus period. At the network level, silencing VIP interneurons whose vertical axonal arborization

forms perisomatic contacts^{23,24} can increase the excitation/inhibition ratio locally and reshape cortical patterns of inhibition. Indeed, disinhibition of other interneuron types should enhance both lateral and dendritic inhibition^{23,24}. This process presumably induces important changes in neocortical integration properties. Interestingly, similar changes of cortical inhibition patterns have been suggested to mediate the positive effects of dopamine on selective attention²⁵.

Nicotine consumption likely affects this circuitry in a complex time- and dose-dependent manner, especially in smoking behavior where nicotine concentration follows an intermittent spike pattern^{1,3}. The predicted scenario can be correlated to the well-established sequence of tobacco effects^{1,3,6,7}. Indeed, after an initial enhancement of GABAergic transmission that may participate in its transient anxiolytic properties, nicotine rapidly induces cellular tolerance to further nicotine administration based on two mechanisms. One is the desensitization of nicotinic receptors that reduces both exogenous and endogenous cholinergic excitation of nicotine responsive neurons²⁶. Another is the activation of the μ -opioid system that silences these interneurons and likely modulates neocortical integration properties. This latter mechanism helps to explain the positive effects of nicotine on cognitive performance²⁷ and is highly relevant to the context sensitivity of nicotine and opiate addictions^{1,3}. It further suggests that upon prolonged exposure, these drugs induce common adaptive changes of the cortical network that may underlie the similarities between tobacco and opiate dependence^{1,3,4,28}.

Materials and Methods

► Slice preparation and whole cell recordings.

Cortical parasagittal slices (300 μ m thick) of young Wistar rats (14-21 postnatal day-old) were prepared as described¹⁵. Bath solution contained (in mM): NaCl, 126; KCl, 5; NaH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; NaHCO₃, 26; Glucose, 20; and pyruvate 5. Whole-cell patch-clamp recordings were made from neocortical neurons identified under infrared videomicroscopy as described²⁹. Internal solution contained (in mM) : K-gluconate, 144; MgCl₂, 3; EGTA, 0.5; HEPES, 10 and biocytin, 2 mg/ml. After characterization of the recorded neurons according to their firing behavior¹³⁻¹⁵, effects of different drugs applied in the bath solution were investigated using current-clamp or voltage-clamp methods (V_H , -71mV). DMPP (100 μ M) was applied with the muscarinic receptor antagonist Atropine (5 μ M). In this study, DMPP was preferred to nicotine that induces a long lasting desensitization precluding repetitive application²⁶. Reproducible responses to DMPP and DAMGO (2.5 μ M) were obtained with 6 min and 13 min intervals between applications, respectively. Somatodendritic responses to drug

applications are presented as mean±SD. For voltage-clamp recordings of inhibitory postsynaptic currents (IPSCs; V_H , -71 mV), 27 mM of K-gluconate was replaced by KCl in the internal solution, resulting in a theoretical chloride reversal potential of -40.4 mV. IPSCs were thus recorded as inward currents in our conditions. Recordings were performed in the presence of (±)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5, 20 μ M) and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M) to prevent glutamatergic transmission. In this set of experiments, DMPP was bath-applied in the presence of Atropine (5 μ M) and the selective antagonist for the $\alpha 7$ subtype of nicotinic receptors, methyllycaconitine (10 nM). The GABAergic nature of the DMPP-induced post-synaptic events was confirmed by applying DMPP in the absence of glutamate receptor antagonists and in the presence of bicuculline (10 μ M), using an internal solution containing Lidocaine N-ethyl bromide (QX-314, 5mM). In these conditions, DMPP did not induce any change in post-synaptic event amplitude or frequency (n=3). Post-synaptic currents were analyzed off-line using Mini Analysis software. Signals <7 pA were excluded from the measurements. Average DMPP effects on IPSC amplitude and frequency in different conditions are presented as mean±SEM.

► **Single-cell RT-PCR.**

Cytoplasm harvesting of the recorded neurons and reverse transcription were performed as described¹¹. Two steps of multiplex PCR were performed essentially as described³⁰ using all of the primer pairs described in supplementary information (for each primer pair, the sense and antisense primers were positioned on two different exons). 254 neurons were analyzed with a protocol designed to probe for the mRNA expression of MOR and its endogenous agonist enkephalin (Enk), in addition to nine interneuron markers [GAD 65, GAD 67, three calcium binding proteins : parvalbumin (PV), calretinin (CR) and calbindin (CB), and four neuropeptides: neuropeptide-Y (NPY), somatostatin (SOM), VIP and cholecystokinin (CCK)]. Expression of the δ and κ -opioid receptors as well as pro-opio-melanocortin and dynorphin was tested in a subset of 223 neurons, including 30 MOR-expressing interneurons (see supplementary information).

► **Identification of the PCR products and test of the RT-mPCR protocol.**

The sizes of the PCR generated fragments obtained from each cell were as predicted by the mRNA sequences and their identity was confirmed by Fluorescence Resonance Energy Transfer between two adjacent oligoprobes as described³¹ (see Supplementary Table). All of the transcripts were detected from 4 ng of total RNA purified from rat neocortex, except for the POMC mRNA which was detected from 4 ng of whole brain RNA.

► **Intracellular labeling.**

Diaminobenzidine intracellular labeling of the recorded neurons filled with biocytin were performed as described³¹.

References and notes

1. Mathieu-Kia, A. M., Kellogg, S. H., Butelman, E. R. & Kreek, M. J. Nicotine addiction: insights from recent animal studies. *Psychopharmacology (Berl)* **162**, 102-118 (2002).
2. Berrendero, F., Kieffer, B. L. & Maldonado, R. Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* **22**, 10935-10940 (2002).
3. Pomerleau, O. F. Endogenous opioids and smoking: a review of progress and problems. *Psychoneuroendocrinology* **23**, 115-130 (1998).
4. Hunt, W. A., Barnett, L. W. & Branch, L. G. Relapse rates in addiction programs. *J Clin Psychol.* **27**, 455-456 (1971).
5. Porter, J. T. *et al.* Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J. Neurosci.* **19**, 5228-5235 (1999).
6. Marubio, L. M. & Changeux, J. P. Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function. *Eur. J. Pharmacol.* **393**, 113-121 (2000).
7. Picciotto, M. R., Caldarone, B. J., King, S. L. & Zachariou, V. Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology* **22**, 451-465 (2000).
8. Taki, K., Kaneko, T. & Mizuno, N. A group of cortical interneurons expressing mu-opioid receptor-like immunoreactivity: a double immunofluorescence study in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* **98**, 221-231 (2000).
9. Christophe, E. *et al.* Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons. *J. Neurophysiol.* **88**, 1318-1327 (2002).
10. Xiang, Z., Huguenard, J. R. & Prince, D. A. Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science* **281**, 985-988 (1998).
11. Lambolez, B., Audinat, E., Crepel, F. & Rossier, J. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* **9**, 247-258 (1992).
12. Williams, J. T., Christie, M. J. & Manzoni, O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* **81**, 299-343 (2001).
13. McCormick, D. A., Connors B. W., Lighthall, J. W. & Prince, D. A. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* **54**, 782-806 (1985).
14. Kawaguchi, Y. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J. Neurosci.* **15**, 2638-2655 (1995).

15. Cauli, B. *et al.* Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* **17**, 3894-3906 (1997).
16. Cauli, B. *et al.* Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6144-6149 (2000).
17. Rossier, J. *et al.* Regional dissociation of beta-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5162-5165 (1977).
18. Giraud, P., Castanas, E., Patey, G., Olivier, C. & Rossier, J. Regional distribution of methionine-enkephalin-Arg6-Phe7 in the rat brain: comparative study with the distribution of other opioid peptides. *J. Neurochem.* **41**, 154-160 (1983).
19. Gee, C. E., Chen, C. L., Roberts, J. L., Thompson, R. & Watson, S. J. Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* **306**, 374-376 (1983).
20. Capogna, M., Gähwiler, B. & Thompson, S. M. Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* **470**, 539-558 (1993).
21. Zieglgansberger, W., French, E. D., Siggins, G. R. & Bloom, F. E. Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science* **205**, 415-417 (1979).
22. Madison, D. V. & Nicoll, R. A. Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus. *J. Physiol.* **398**, 123-130 (1988).
23. Kawaguchi, Y. & Kubota, Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex *Cereb. Cortex* **7**, 476-486 (1997).
24. Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R. & Buhl, E.H. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* **26**, 113-135 (1998).
25. Gao, W. J., Wang, Y. & Goldman-Rakic, P. S. Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci.* **23**, 1622-1630 (2003).
26. Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T. & Dani, J. A. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* **390**, 401-404 (1997).
27. Levin E. D. Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl)* **108**, 417-431 (1992).
28. Watkins, S. S., Stinus, L., Koob, G. F. & Markou, A. Reward and somatic changes during precipitated nicotine withdrawal in rats: centrally and peripherally mediated effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 1053-1064 (2000).
29. Stuart, G. J., Dodt, H. U. & Sakmann, B. Patch-clamp recording from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared videomicroscopy. *Pflugers Arch.* **423**, 511-518 (1993).
30. Ruano, D., Lambolez, B., Rossier, J., Paternain, A. V. & Lerma, J. Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron* **14**, 1009-1017 (1995).

31. Ferezou, I. *et al.* 5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J. Neurosci.* **22**, 7389-1397 (2002).

Acknowledgements We thank P. Schweitzer, G. Koob, X.J. Wang, P. Kenny, E. Hamel and M.C. Potier for comments on the manuscript, J. Roeper for advice on experiments and P. Gouédard for assistance with the database.

Competing interests statement The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.L. (bertrand.lambolez@espci.fr).

Supplementary Information

This supplement contains :

Supplementary results of single cell RT-PCR analyses,

Table of PCR primers and FRET probes,

Supplementary references.

MOR single cell RT-PCR was initially performed with sense and antisense primers A (see Supplementary Table) located in exons 1 and 2 respectively. Primer pair B (exons 2 and 3) was used subsequently due to the existence of exon 1 alternative splicing in mouse¹. Both primer pairs were equally effective in detecting MOR expression in single cells, suggesting that exon 1 is present in a significant proportion of rat neocortical MOR mRNAs.

Expression of the δ and κ -opioid receptors (DOR and KOR, respectively) as well as pro-opio-melano-cortin (POMC) and dynorphin was tested in 223 neurons, including 30 MOR-expressing interneurons. DOR and KOR mRNAs were detected in 1 and 4 MOR-positive cells, and in 3 and 10 MOR-negative interneurons, respectively. POMC mRNA was never detected and dynorphin mRNA was detected in 18 MOR-negative interneurons characterized by a high occurrence of somatostatin.

Table of PCR primers and FRET probes

	Size	PCR	FRET Probes
MOR # NM_013071	236	Sense A, 75 : ACCTGGCTCCTGGCTCAACT Antisense A, 290 : TGGTGGCAGTCTTCATTTTGG Sense B, 486 : CGTGGACCGCTACATTGCTG Antisense B, 711 : CGGCATGATGAAAGCGAAGATA	3' FITC, 340 : AACGACAGCCTGTGCCCTCA 5' R705, 361 : ACCGGCAGCCCTTCCATG Nested sense, 498 : CATTGCTGTCTGCCACCCA Nested antisense, 687 : AAGACACAGATTTTGAGCAGGTTTC
DOR # NM_012617	508	Sense, 33 : GCAGTTTTGCGTCTCTCGC Antisense, 520 : CCCAACACCTGAAGCCAAGAC	3' FITC, 307 : CCCTTCCAGAGCGCCAAGT 5' R705, 327 : CCTGATGGAACGTGGCCG
KOR # NM_017167	326	Sense, 590 : GAGGCACCAAAGTCAGGGAA Antisense, 898 : GCTGTGGGAGGTGCTGCC	3' FITC, 733 : TGCTACACCCTGATGATCCTGC 5' R705, 756 : CTTGAAGAGTGTCCGGCTCCTC
enkephalin # M28263	345	Sense, 451 : GCCAACTCCTCCGACCTGCT Antisense, 772 : GCCTCCGTATCTTTTTTCCATCTC	3' FITC, 588 : TGAAGACAGCAGCAGCAAGAGGT 5' R705, 612 : TGGGGGCTTCATGAGAGGC
dynorphin # NM_019374	286	Sense, 65 : ACTGCCTGTCTTGTGTTCCCT Antisense, 329 : GAGACGCTGGTAAGGAGTTGGC	3' FITC, 113 : CCCATCCCATCAACCCCT 5' R705, 133 : ATTTGCTCCCTGGAGTGCCAG
POMC # K01878	217	Sense, 105 : GGACCTCACCACGGAAAGCA Antisense, 304 : CCGTCTCTCCTCCGCAC	mRNA not detected in this study
Gad65 # M72422	391	Sense ² , 713 : TCTTTTCTCCTGGTGGTGCC Antisense ² , 1085 : CCCAAGCAGCATCCACAT	3' FITC ⁴ 848 : TTTCTCTCAAGAAGGGAGCTGCA 5' R705 ⁴ 872 : CCTTGGGGATCGGAACAGACA
Gad67 # M76177	600	Sense ³ , 713 : TACGGGGTTCGCACAGGTC Antisense ² , 1294 : same as GAD65	3' FITC ⁴ 930 : CCTGGGGGAGCCATATCCAA 5' R705 ⁴ 951 : ATGTACAGCATCATGGCGGCTC
Calbindin # M27839	432	Sense ³ , 134 : AGGCACGAAAGAAGGCTGGAT Antisense ³ , 544 : TCCCACACATTTTGATTCCCTG	3' FITC ⁴ 263 : TCCTGCTGCTCTTTTCGATGCC ⁽³⁾ 5'R705 ⁴ 285 : GCAACTGAAGTCTCGCAGGAA ⁽³⁾
Parvalbumin # M12725	381	Sense ⁴ , 247 : ACAAAGACGCTGATGGCTGC Antisense ⁴ , 607 : CGTGGTCTTCGCTCTCTCTC	3' FITC ⁴ 283 : GACGGCAAGATTGGGGTTGA 5' R705 ⁴ 304 : GAATTCTCCACTCTGGTGCCG
Calretinin # X66974	309	Sense ³ , 142 : CTGGAGAAGGCAAGGAAAGGT Antisense ³ , 429 : AGTTTCATCATAGGGACGGTTG	3' FITC ⁴ 248 : TTGAGATGGCAGAGCTGGCG 5' R705 ⁴ 269 : AGATCCTGCCAACCGAAGAGAAT
NPY # M15880	359	Sense ³ , -45 : GCCCAGAGCAGAGCACCC Antisense ³ , 292 : CAAGTTTCATTTCCCATCACCA	3' FITC ⁴ 17 : AACGAATGGGGCTGTGTGGA 5' R705 ⁴ 38 : TGACCCTCGCTCTATCCCTGC
Somatostatin # K02248	209	Sense ³ , 43 : ATCGTCTGGCTTTGGGC Antisense ³ , 231 : GCCTCATCTCGTCTGCTCA	3' FITC ⁴ 105 : GCAGAAGTCTCTGGCGGCTG 5' R705 ⁴ 126 : CACCGGAAACAGGAACTGGC
VIP # X02341	286	Sense ³ , 167 : TGCTTAGCGGAGAATGACA Antisense ³ , 434 : CCTCACTGCTCCTCTCCCA	3' FITC ⁴ 199 : TGTGTCCAGAAATGCCAGGCA 5' R705 ⁴ 221 : GCTGATGGAGTTTTACCAGCG
CCK # K01259	216	Sense ³ , 174 : CGCACTGCTAGCCGATACA Antisense ³ , 373 : TTTCTCATTCCGCCTCTCC	3' FITC ⁴ 198 : CCAGCAGGTCCGCAAAGCT 5' R705 ⁴ , 218 : CCTCTGGCCGATGTCCG
			Position 1 : 1 st base of the start codon

1. Pan, Y. X., Xu, J., Mahurter, L., Bolan, E., Xu, M. & Pasternak, G. W. Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,14084-14089 (2001).
2. Bochet, P. *et al.* Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* **12**, 383-388 (1994).
3. Cauli, B. *et al.* Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* **17**, 3894-3906 (1997).
4. Ferezou, I. *et al.* 5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J. Neurosci.* **22**, 7389-1397 (2002).

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail de thèse a apporté des données fonctionnelles qui contribuent à la caractérisation d'une population d'interneurones GABAergiques inhibiteurs du néocortex : les interneurones VIP/CCK. À la lumière des résultats obtenus grâce à la combinaison des techniques de patch-clamp, de RT-PCR sur cellule unique et d'histochimie, il apparaît que les interneurones VIP/CCK jouent un rôle spécifique dans la modulation de l'activité du réseau néocortical par les systèmes sérotoninergiques, cholinergiques et opioïdiques. Cette discussion générale, aura pour objectif, tout d'abord, de dresser un bilan des connaissances acquises concernant cette population d'interneurones VIP/CCK, puis d'établir, grâce aux données dont on dispose concernant la connectivité de ces interneurones, la manière dont la modulation de leur activité peut se répercuter sur le réseau néocortical.

LES INTERNEURONES VIP/CCK

Comme nous l'avons largement évoqué dans l'introduction, la grande diversité des interneurones GABAergiques du néocortex a donné lieu à diverses classifications, basées sur des critères morphologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques. La confrontation entre ces différentes classifications révèle que les recouvrements entre les populations neuronales ainsi définies ne sont que partiels, ce qui mène à une augmentation critique du nombre de classes neuronales possibles. La technique de RT-PCR sur cellule unique qui permet l'accès à un grand nombre de paramètres pour chaque neurone étudié, a donné lieu à une nouvelle approche de la diversité des interneurones, basée sur des critères descriptifs multiples (*Cf. Introduction*).

Cette approche multifactorielle a permis d'identifier, parmi les interneurones fusiformes, trois classes neuronales homogènes du point de vue de leurs propriétés électrophysiologiques et neurochimiques, les interneurones RSNP-SS, RSNP-VIP et IS (*Cauli et al., 2000*). Les classes d'interneurones de type RSNP-VIP et IS, diffèrent par leurs profil de décharge de potentiels d'action, cependant elles présentent un profil neurochimique similaire, avec un très fort taux d'expression du VIP (91 et 100 %, respectivement), une expression fréquente de la CCK, ainsi que l'expression majoritaire, parmi les protéines de liaison du calcium, de la calrétinine. De plus, ces interneurones VIPergiques constituent une population homogène du point de vue morphologique. Les neurones RSNP-VIP, comme les

neurones IS présentent en effet une morphologie bipolaire typique (*Porter et al., 1998, Kawaguchi & Kubota, 1996*). En outre, il a été montré que les interneurones RSNP-VIP et IS ont en commun la propriété d'être sélectivement activés par des agonistes nicotiniques, via des récepteurs post-synaptiques qui contiennent majoritairement les sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 4$ et $\beta 2$ (*Porter et al., 1999*).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse a également contribué à montrer que les interneurones de type RSNP-VIP et IS constituent une population homogène du point de vue fonctionnel. Tout d'abord, il apparaît que ces interneurones peuvent être sélectivement activés par les fibres sérotoninergiques afférentes originaires des noyaux du raphé. En effet, la stimulation électrique de ces fibres peut induire une réponse excitatrice rapide, de type synaptique, dans ces interneurones, via le récepteur à la sérotonine de type 3. J'ai observé par la suite l'expression sélective du récepteur opioïde de type μ ainsi que de la préproenképhaline dans les interneurones de type IS et RSNP-VIP, puis démontré l'existence d'une boucle d'autorégulation enképhalinergique spécifique de ces interneurones. En effet, la stimulation sélective de ces interneurones par des agonistes nicotiniques induit une libération d'enképhalines endogènes capables d'activer les récepteurs opioïdes de type μ dans un mécanisme autocrine. Parce que les interneurones IS et RSNP-VIP partagent un grand nombre de propriétés fonctionnelles, nous les avons regroupés sous le terme d'interneurones VIP/CCK.

IDENTIFICATION ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE, NEUROCHIMIQUE ET MORPHOLOGIQUE DES INTERNEURONES VIP/CCK

Cette population neuronale rassemble donc des interneurones qui présentent, soit une décharge de potentiels d'action soutenue caractérisée par une adaptation rapide de fréquence, soit une décharge irrégulière consistant en une bouffée initiale de potentiels d'action, suivis de potentiels d'action émis à une fréquence irrégulière (*Porter et al., 1998; Cauli et al., 2000*). Des investigations pharmacologiques ont montré que ces décharges irrégulières de potentiels d'actions sont dues à l'inactivation lente d'une conductance potassique de type ID. En effet, le blocage de cette conductance par la 4-aminopyridine, la dendrotoxine I ou la dendrotoxine K, est suffisant pour convertir ces décharges irrégulières en décharges soutenues de type RSNP (*Porter et al., 1998*).

Sur le plan neurochimique, les neurones VIP/CCK sont tout d'abord caractérisés par l'expression sélective et quasi systématique du neuropeptide VIP. Les études immunocytochimiques ont rapporté l'expression du VIP dans approximativement 20% des interneurones GABAergiques du néocortex de rat

(Kubota et al., 1994), indiquant que les interneurones VIP/CCK représentent ≈ 3 % des neurones néocorticaux. Les neurones qui expriment uniquement le VIP et les neurones qui co-expriment VIP et CCK sont très similaires du point de vue de leurs propriétés morphologiques et électrophysiologiques. Par contre, les neurones qui expriment la CCK en l'absence de VIP, présentent des caractéristiques très différentes des neurones VIPergiques. On retrouve en effet parmi ces neurones, des cellules pyramidales, des interneurones de la couche I, des interneurones à somatostatine et de larges cellules multipolaires (Peters et al., 1983; Kubota & Kawaguchi, 1994; Cauli et al., 2000). Par conséquent, l'expression de la CCK seule n'est pas un critère suffisant pour identifier un neurone comme appartenant à la population des interneurones VIP/CCK.

Enfin, les études immunocytochimiques, comme les données de RT-PCR sur cellule unique indiquent que la calrétinine est exprimée par une large proportion des interneurones VIP/CCK (Kubota et al., 1994; Kawaguchi & Kubota, 1997; Cauli et al., 1997; Cauli et al., 2000).

Ces interneurones VIPergiques sont présents dans toutes les aires corticales au niveau des couches II à V, cependant, on les retrouve majoritairement dans les couches supragranulaires. Ils présentent une morphologie bipolaire, verticalement orientée. Leur corps cellulaire fusiforme, de petite taille ($< 20\mu\text{m}$), donne naissance à des dendrites ascendantes et descendantes orientées perpendiculairement à la surface du cortex. Leurs dendrites descendantes qui atteignent les couches infragranulaires sont souvent plus ramifiées que leurs dendrites ascendantes qui ne se ramifient que quand elles atteignent la couche I. L'arborisation axonale des interneurones VIP/CCK présente peu d'extension latérale, elle prend fréquemment naissance au niveau d'une dendrite primaire, à proximité du soma, pour s'étendre ensuite vers les couches profondes.

Ces caractéristiques morphologiques placent les interneurones VIP/CCK dans une position privilégiée pour traiter l'information au sein d'une colonne néocorticale (Morrisson et al., 1984; Peters & Harriman, 1988; Peters, 1990; Porter et al., 1998; Bayraktar et al., 2000).

LA PLACE DES INTERNEURONES VIP/CCK DANS LE RÉSEAU NÉOCORTICAL

Les interneurones VIP/CCK sont directement connectés par les fibres thalamo-corticales.

Des études neuroanatomiques couplant le traçage de voies thalamo-corticales au marquage immunocytochimique du VIP ont révélé que les interneurones VIPergiques sont contactés par les fibres originaires du noyau ventro-postero-

median au niveau du cortex sensoriel (Staiger *et al.*, 1996), et par les fibres originaires du noyau géniculé latéral, au niveau du cortex visuel (Hajós *et al.*, 1997). Les contacts synaptiques formés par ces fibres thalamo-corticales glutamatergiques sont en majorité situés au niveau du corps cellulaire et des dendrites proximales de ces interneurons. Ces données indiquent que les interneurons VIP/CCK interviennent dans les stades précoces de traitement du signal sensoriel.

Les interneurons VIP/CCK sont connectés réciproquement aux cellules pyramidales.

L'innervation des interneurons VIP/CCK par les cellules pyramidales a été mise en évidence au niveau des couches néocorticales II, III et V (Porter *et al.*, 1998; Staiger *et al.*, 2002). De plus, l'observation des axones immunoréactifs pour le VIP en microscopie électronique a révélé qu'ils contactent fréquemment les corps cellulaires des cellules pyramidales, principalement au niveau de leur corps cellulaire (Peters & Harriman, 1988; Hajós *et al.*, 1988; Peters, 1990). Cette innervation réciproque entre les interneurons VIP/CCK et les cellules pyramidales a été étudiée par des expériences de doubles enregistrements au niveau des couches II-III du cortex sensoriel (Rozov *et al.*, 2001). Ces investigations ont révélé que l'activité répétitive des cellules pyramidales évoque des réponses post-synaptiques excitatrices, dont l'amplitude diminue progressivement au cours du temps, dans les interneurons VIP/CCK. La désensibilisation de récepteurs glutamatergiques de type AMPA contribue à ce phénomène de dépression synaptique à court terme (*paired-pulse depression*). Par contre, l'amplitude des réponses post-synaptiques inhibitrices, enregistrées dans les cellules pyramidales, lors de l'activation des interneurons VIP/CCK, est constante au cours du temps.

Ces données suggèrent que les interneurons VIP/CCK se comportent comme un « filtre passe-bas » lorsque l'activité des cellules pyramidales et thalamiques est synchronisée. L'inhibition exercée par les interneurons VIP/CCK sur les cellules pyramidales serait atténuée lors d'une augmentation trop importante de la fréquence des entrées glutamatergiques.

Un phénomène de dépression synaptique à court terme a également été mis en évidence au niveau des synapses entre les cellules pyramidales et les interneurons multipolaires à parvalbumine (Reyes *et al.*, 1998). Il est établi que les neurones à parvalbumine constituent une population neuronale relativement homogène caractérisée par des décharges rapides de potentiels d'action de type FS (*fast-spiking*) et par une morphologie en panier ou en chandelier (Cf. Introduction). Une étude des connections cellules pyramidales-interneurons FS à différents stades du développement a montré que, chez le rat adulte, cette

dépression à court terme est convertie en une facilitation à court terme lorsque les cellules pyramidales sont activées à de très basses fréquences (*Angulo et al., 1999*).

Par contre, les interneurons de type RSNP-SS ont un comportement opposé à celui des interneurons VIP/CCK. En effet, l'amplitude des événements post-synaptiques excitateurs enregistrés dans les interneurons à somatostatine augmente au cours du temps, lors d'une activité répétitive des cellules pyramidales (*Reyes et al., 1998*). L'inhibition exercée par ces interneurons sur les cellules pyramidales serait donc plus importante lors d'une augmentation de fréquence des entrées glutamatergiques.

Connections des interneurons VIP/CCK avec les interneurons GABAergiques.

Les interneurons VIP/CCK reçoivent des afférences inhibitrices provenant d'interneurons GABAergiques. Une étude immunocytochimique a mis en évidence une large innervation de ces interneurons VIPergiques par les interneurons à parvalbumine (*Staiger et al., 1997*). Cette étude rapporte en effet la présence de 3 à plus de 20 contacts synaptiques formés par les interneurons à parvalbumine au niveau du corps cellulaire et des dendrites proximales des interneurons VIPergiques. Une étude associant enregistrements électrophysiologiques, marquages intracellulaires et microscopie électronique, a permis d'observer que les interneurons qui présentent des profils de décharge de type FS peuvent former des contacts synaptiques avec 4 à 6 interneurons immunoréactifs pour le VIP (*Staiger et al., 2002*). Ces interneurons FS, largement étudiés en raison de la nature de leurs connections avec les cellules pyramidales, peuvent donc également exercer une puissante inhibition sur les interneurons VIP/CCK.

Les études morphologiques des terminaisons immunoréactives pour le VIP indiquent que les interneurons VIP/CCK contactent d'autres interneurons GABAergiques (*Peters & Harriman, 1988; Peters, 1990*). Une étude immunocytochimique récente rapporte que la majorité des neurones à calbindine sont contactés par les interneurons VIPergiques, au niveau de leurs dendrites proximales et distales (*Staiger et al., 2004*). En outre, il a été montré que la calbindine est très fréquemment co-localisée avec la parvalbumine au niveau des couches supragranulaires et avec la somatostatine dans toutes les couches corticales (*Kubota et al., 1994; Kawaguchi & Kubota, 1997; Cauli et al., 2000*). Ainsi, les interneurons de type FS et RSNP-SS seraient les cibles préférentielles des interneurons VIP/CCK.

Enfin, des données morphologiques suggèrent que les interneurones VIP/CCK seraient également connectés entre eux (*Staiger, communication personnelle; Peters & Harriman, 1988; Hajós et al., 1988; Peters, 1990*).

Afférences cholinergiques et sérotoninergiques des interneurones VIP/CCK.

L'étude menée par Porter et collaborateurs (1999) a révélé que 86 % des interneurones exprimant le VIP et 75 % des neurones positifs pour la CCK répondaient à l'application d'un agoniste nicotinique par des dépolarisations accompagnées de potentiels d'action. Parmi les neurones sensibles à cet agoniste nicotinique, 70 % co-exprimaient le VIP et la CCK, 17 % exprimaient uniquement le VIP et 7 % exprimaient uniquement la CCK. Cette étude a également révélé que les réponses nicotiniques enregistrées dans ces neurones étaient corrélées à l'expression de récepteurs post-synaptiques contenant majoritairement les sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 4$ et $\beta 2$. Des contacts synaptiques entre des fibres cholinergiques et des interneurones GABAergiques du néocortex ont été observés en microscopie électronique (*Cf. Introduction*), suggérant que les interneurones VIP/CCK qui expriment les récepteurs nicotiniques pourraient être directement activés par ces fibres, de manière synaptique. Cependant il n'existe aucune démonstration électrophysiologique d'une telle neurotransmission cholinergique au niveau des interneurones VIP/CCK.

Au cours de ce travail de thèse, la combinaison des techniques de patch-clamp, de RT-PCR sur cellule unique et d'histochimie m'a permis de montrer que le récepteur 5-HT₃ est sélectivement exprimé par les interneurones VIP/CCK dans le néocortex. En effet, les ARN messagers codant pour le VIP et la CCK ont été détectés, respectivement, dans 95 et 100 % des neurones exprimant le récepteur 5-HT₃. En revanche le récepteur 5-HT₃ n'a été détecté que dans ≈ 40 % des interneurones VIP/CCK. Les expériences de doubles marquages ont montré que les fibres sérotoninergiques forment des contacts sur les corps cellulaires et les dendrites des neurones VIP/CCK qui expriment le récepteur 5-HT₃. La présence de synapses sérotoninergiques sur ces neurones a été confirmée par la suite à l'aide d'un protocole de stimulations électriques.

Interneurones VIP/CCK et modulation peptidergique de l'activité du réseau néocortical.

Dans la présente étude, nous avons montré que l'activité des interneurones VIP/CCK peut être modulée de manière spécifique par des peptides opioïdes, via le récepteur opioïde de type μ . En effet, il apparaît, à la lumière de nos résultats et en accord avec les données immunocytochimiques (*Taki et al., 2000*), que l'expression du récepteur opioïde de type μ est sélective des interneurones VIP/CCK dans le néocortex. L'activation de ce récepteur induit des réponses post-synaptiques inhibitrices dans ces interneurones, via l'activation de

conductances potassiques. En outre, nous avons observé que l'excitation des interneurons VIP/CCK par un agoniste nicotinique résulte en une activation des récepteurs opioïdes de type μ , via la libération d'enképhalines endogènes. Ce mécanisme d'autorégulation est à l'origine d'une phase de dépression de l'activité des interneurons VIP/CCK consécutive à leur excitation.

Ces résultats suggèrent que, dans des conditions physiologiques, l'activation supraliminaire des interneurons VIP/CCK par leurs afférences, qu'elles soient de nature cholinergique, sérotoninergique ou glutamatergique, exerce une action biphasique sur le réseau néocortical. À une première phase d'inhibition due à l'augmentation de la libération de GABA par ces interneurons succède une phase de désinhibition résultant d'un mécanisme d'autorégulation enképhalinergique spécifique des interneurons VIP/CCK.

De plus, ces données indiquent que les interneurons VIP/CCK sont susceptibles de libérer des neuropeptides lorsqu'ils sont activés de manière soutenue. Ainsi, ces neurones pourraient exercer une action à deux niveaux sur le réseau néocortical : une action synaptique inhibitrice liée à la libération de GABA au niveau des contacts synaptiques qu'ils forment avec leurs cibles néocorticales, et une action peptidergique de type paracrine. En effet, des études immunocytochimiques ont révélé que ces interneurons expriment, outre le VIP et la CCK, la corticolibérine (*corticotropin releasing factor* ou CRF, *Taki et al., 2000*) et la neurokinine B (*Kaneko et al., 1998*). Les rares données concernant la distribution cellulaire des récepteurs à ces neuropeptides indiquent qu'ils sont préférentiellement exprimés par les cellules pyramidales (*Csillag et al., 1993; Mercer et al., 2000; Chen et al., 2000; Ding et al., 1996*). De la même manière, l'effet de l'activation des récepteurs sur l'activité des cellules principales du néocortex reste à étudier. Cependant, les investigations pharmacologiques effectuées au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe ont montré un effet excitateur des neuropeptides VIP, CCK, CRF et NKB sur les cellules pyramidales (*Shinohara & Kawasaki, 1997; Haug & Storm, 2000; Stacey et al., 2002*).

INTERNEURONES VIP/CCK ET MODULATION DE L'ACTIVITÉ DU RÉSEAU NÉOCORTICAL

L'ensemble des données dont nous disposons actuellement sur la population des interneurons VIP/CCK indique qu'ils forment une unité fonctionnelle au sein du néocortex, en vertu de connections et de voies de neurotransmission spécifiques. L'expression sélective des récepteurs nicotiques et 5-HT₃ dans ces interneurons suggère qu'ils occupent un rôle clef dans la modulation de l'activité du réseau néocortical par les voies cholinergiques et sérotoninergiques

afférentes. La manière dont l'excitation rapide des interneurons VIP/CCK induite par l'activation de ces récepteurs ionotropiques se répercute sur le réseau néocortical peut être évaluée sur la base des connaissances acquises concernant les propriétés intrinsèques et la connectivité de ces interneurons (voir *Figure 24*).

Ainsi, l'excitation des interneurons VIP/CCK aurait pour effet premier une inhibition de leurs cibles post-synaptiques, à savoir, les cellules pyramidales ainsi que les interneurons de type RSNP-SS et FS. Les interneurons de type RSNP-SS ont une morphologie dendritique hétérogène, leur axone ascendant contacte les dendrites distales des cellules pyramidales (*Hendry et al., 1984a; De Lima & Morrison, 1989; Kawaguchi & Kubota, 1997*). Les axones des interneurons de type FS sont très étendus latéralement, ils contactent les cellules pyramidales au niveau de leur corps cellulaire ou du segment initial de leur axone (*Kawaguchi & Kubota, 1993; Kawaguchi 1995*). Ainsi l'excitation des interneurons VIP/CCK conduirait à une inhibition somatique des cellules pyramidales coordonnée avec une levée d'inhibition au niveau de leurs dendrites distales. De plus, cette inhibition locale serait contrebalancée par la désinhibition des cellules pyramidales plus distales via les interneurons FS.

Au-delà d'un certain seuil d'excitation des interneurons VIP/CCK, une boucle de rétro-inhibition serait mise en place par le biais de la libération d'enképhalines et de l'activation des récepteurs opioïdes de type μ , induisant une désinhibition des cibles post-synaptiques des interneurons VIP/CCK. La libération de neuropeptides nécessite en effet une activité neuronale plus élevée que celle des neurotransmetteurs classiques (*Zupanc, 1996*). Lors d'une activation supraliminaire des interneurons VIP/CCK, la libération de peptides opioïdes pourrait être accompagnée de celle des neuropeptides VIP, CCK, NKB et CRF, également synthétisés par ces neurones. Ces neuropeptides, en exerçant une action excitatrice sur les cellules pyramidales agiraient en synergie avec la désinhibition provoquée par la diminution des sorties GABAergiques des interneurons VIP/CCK, pour renverser la balance inhibition/excitation au niveau local. L'action de ces peptides est en effet limitée par leur volume de diffusion. En outre, nos résultats indiquent que ces mécanismes de transmission peptidergique auto/paracrine suivent des cinétiques particulièrement lentes (de l'ordre de la minute), suggérant un effet à long terme de cette libération peptidique.

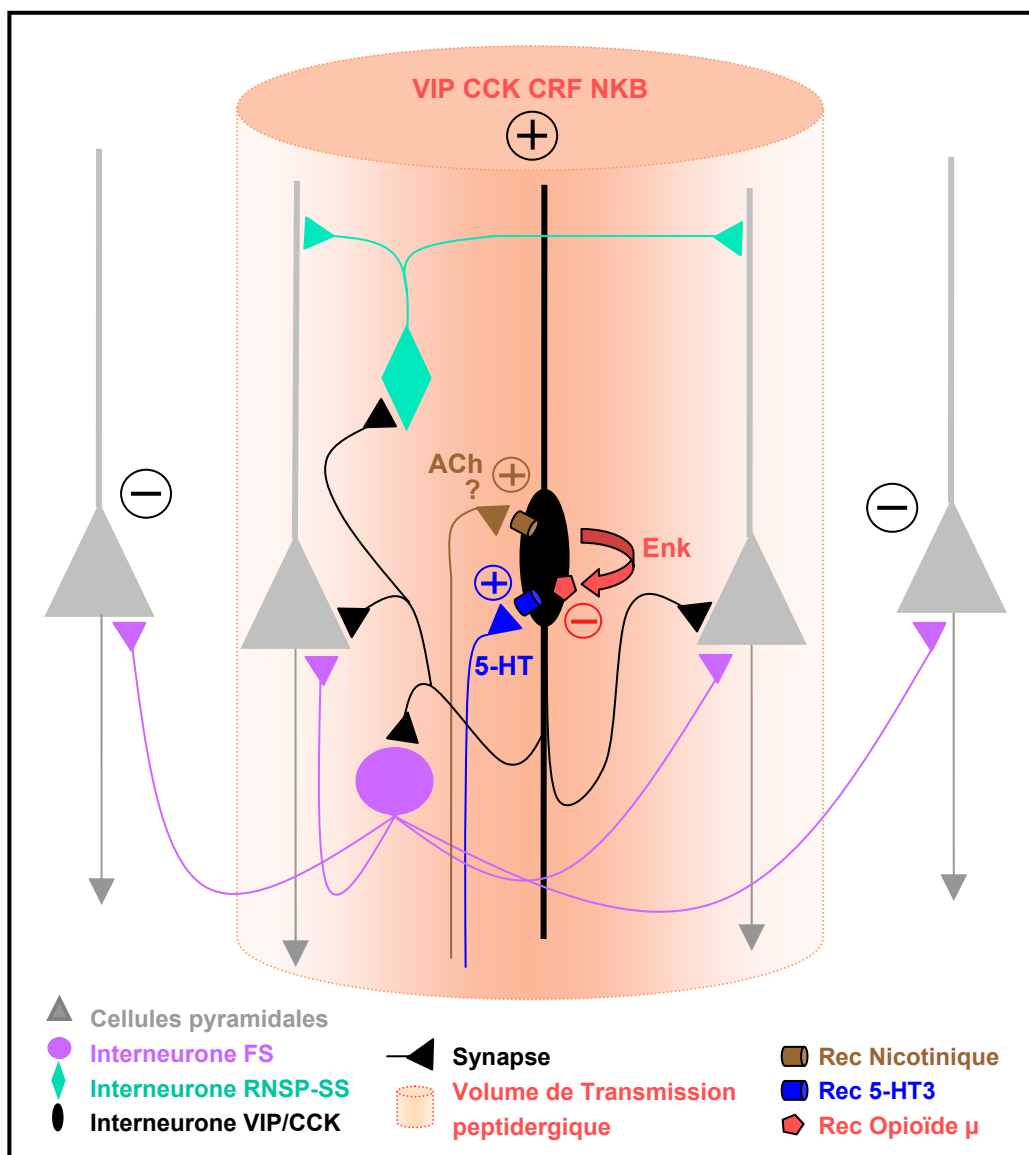


Figure 24 : Interneurones VIP/CCK et modulation du réseau néocortical.

Schéma illustrant le modèle proposé concernant la modulation de l'activité des interneurons VIP/CCK et ses conséquences sur le réseau néocortical (les projections glutamatergiques n'ont pas été représentées pour plus de clarté). Au-delà d'un certain seuil d'activation des interneurons VIP/CCK, l'effet inhibiteur qu'ils exercent sur leurs cibles post-synaptiques serait succédé par une désinhibition résultant à la fois d'un mécanisme de rétro-inhibition enképhalinergique et de la libération des neuropeptides VIP, CCK, NKB et CRF.

IMPLICATION DES INTERNEURONES VIP/CCK DANS LES ÉTATS MOTIVATIONNELS ET ÉMOTIONNELS

Les résultats présentés dans ce travail de thèse, ainsi que les diverses données dont on dispose sur la population des interneurones VIP/CCK, indiquent qu'ils représentent un point de convergence remarquable entre de nombreuses voies de neuromodulation/neurotransmission impliquées dans la régulation des états émotionnels et motivationnels.

Des études comportementales ont rapporté des effets anxiolytiques et/ou anxiogènes induits par l'administration de nicotine, en fonction des doses administrées et des tests utilisés (*Costall et al., 1989; Brioni et al., 1993; Cao et al., 1993; Vale & Green 1996; File et al., 1998; Irvine et al., 2001a,b; Cheeta et al., 2001*). En outre, l'effet anxiolytique des antagonistes du récepteurs 5-HT₃ a été rapporté à plusieurs reprises (*Jones et al., 1988; Costall et al., 1990; Roychoudhury & Kulkarni, 1997*). Les neuropeptides CCK, NKB et CRF exprimés par les interneurones VIP/CCK, ainsi que les peptides opioïdes dérivés de la préproenképhaline sont également impliqués dans les phénomènes de stress et d'anxiété (*van Megen, 1996; Ribeiro, 1999; Koob, 1999; Clark & Kaiyala, 2003; Ragnauth et al., 2001*). L'ensemble de ces observations, suggère en accord avec l'hypothèse récemment formulée par Freund (2003) que les neurones VIP/CCK interviendraient dans l'intégration des informations relatives aux états émotionnels et motivationnels au niveau cortical.

Ces interneurones, à l'instar des interneurones de type FS, exercent une inhibition périsomatique des cellules pyramidales, modulant ainsi les efférences glutamatergiques du néocortex. Les cellules FS, capables de soutenir des décharges de potentiels d'action à haute fréquence et largement interconnectées entre elles par des synapses électriques, seraient impliquées dans les activités rythmiques nécessaires aux opérations de base du réseau néocortical (*Tamas et al., 2000; Kawaguchi, 2001; Galarreta & Hestrin, 2001; Freund, 2003*). Les interneurones VIP/CCK, dont l'activité est modulée par les afférences cholinergiques et sérotoninergiques via des récepteurs ionotropiques, et dont la stimulation peut induire des effets persistants sur le réseau via la libération de neuropeptides, permettraient une modulation de l'activité basale du néocortex en fonction des informations relatives à l'état émotionnel et motivationnel de l'individu. Une perturbation de leur activité dans des conditions pathologiques ou relatives à la consommation de drogue pourrait être impliquée dans des troubles comportementaux de type anxiété ou dépression.

V. REFERENCES

Abi-Dargham A, Laruelle M, Aghajanian GK, Charney D & Krystal J (1997) The role of serotonin in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* **9** (1) : 1-17.

Aghajanian GK & Marek GJ (1997) Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology.* **36** (4-5) : 589-599.

Agmon A & Connors BW (1992) Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *J Neurosci.* **12** (1) : 319-329.

Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E & Watson S (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.* **51** (1-2) : 127-140.

Angulo MC, Staiger JF, Rossier J & Audinat E (1999) Developmental synaptic changes increase the range of integrative capabilities of an identified excitatory neocortical connection. *J Neurosci.* **19** (5) : 1566-1576.

Araneda R & Andrade R (1991) 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience.* **40** (2) : 399-412.

Arango V, Underwood MD & Mann JJ (2002) Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog Brain Res.* **136** : 443-453.

Azmitia EC & Segal M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* **179** (3) : 641-667.

Baughman RW & Gilbert CD (1981) Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex. *J Neurosci.* **1** (4) : 427-439.

Bayraktar T, Staiger JF, Acsady L, Cozzari C, Freund TF & Zilles K (1997) Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide, gamma-aminobutyric acid and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Research.* **757** (2) : 209-17.

Bayraktar T, Welker E, Freund TF, Zilles K & Staiger JF (2000) Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory cortex: morphology and spatial relationship to barrel-related columns. *J Comp Neurol.* **420** (3) : 291-304.

Bear MF, Connors BW & Paradisio MA (1997) Anatomie du système nerveux. Dans : Neurosciences à la découverte du cerveau, pp 152-185 (Williams & Wilkins, eds). Masson, Paris.

- Beaulieu C & Somogyi P (1991)** Enrichment of cholinergic synaptic terminals on GABAergic neurons and coexistence of immunoreactive GABA and choline acetyltransferase in the same synaptic terminals in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol.* **304** (4) : 666-680.
- Beierlein M, Gibson JR & Connors BW (2000)** A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex. *Nat Neurosci.* **3** (9) : 904-910.
- Benshalom G & White EL (1986)** Quantification of thalamocortical synapses with spiny stellate neurons in layer IV of mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* **253** (3) : 303-314.
- Berrendero F, Kieffer BL & Maldonado R (2002)** Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci.* **22** (24) : 10935-10940.
- Blatow M, Rozov A, Katona I, Hormuzdi SG, Meyer AH, Whittington MA, Caputi A & Monyer H (2003)** A novel network of multipolar bursting interneurons generates theta frequency oscillations in neocortex. *Neuron.* **38** (5) : 805-817.
- Boess FG, Beroukhim R & Martin IL (1995)** Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *J Neurochem.* **64** (3) : 1401-1405.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC & Brann MR (1987)** Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* **237** (4814) : 527-532.
- Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG & Barnes NM (2001)** Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT_{3A} receptors versus heteromeric 5-HT_{3A/3B} receptors. *Neuropharmacology.* **41** (2) : 282-284.
- Breier A (1995)** Serotonin, schizophrenia and antipsychotic drug action. *Schizophr Res.* **14** (3) : 187-202.
- Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJ & Decker MW (1993)** Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol.* **238** (1) : 1-8.
- Brodmann K (1909)** Vergleichende lokalisationslehre der grosshirnrinde in ihren prinzipien dargestellt auf grund des zellenbaues. Leipzig, Barth. Traduit en anglais par Garey LJ (1994) : *Brodmann's 'Localisation in the Cerebral Cortex'*, Smith-Gordon, London.
- Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K & Harrison PJ (1995)** The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Research.* **676** (1) : 157-168.
- Cahill CM, McClellan KA, Morinville A, Hoffert C, Hubatsch D, O'Donnell D & Beaudet A (2001)** Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors

in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol.* **440** (1) : 65-84.

Calvin WH & Sybert GW (1976) Fast and slow pyramidal tract neurons: an intracellular analysis of their contrasting repetitive firing properties in the cat. *J Neurophysiol.* **39** (2) : 420-434.

Cao W, Burkholder T, Wilkins L & Collins AC (1993) A genetic comparison of behavioral actions of ethanol and nicotine in the mirrored chamber. *Pharmacol Biochem Behav.* **45** (4) : 803-809.

Carboni E, Bortone L, Giua C & Di Chiara G (2000) Dissociation of physical abstinence signs from changes in extracellular dopamine in the nucleus accumbens and in the prefrontal cortex of nicotine dependent rats. *Drug Alcohol Depend.* **58** (1-2) : 93-102.

Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* **58** (3) : 319-379.

Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S & Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci.* **17** (10) : 3894-3906.

Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B & Audinat E (2000) Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97** (11) : 6144-6149.

Cheeta S, Irvine E & File SE (2001) Social isolation modifies nicotine's effects in animal tests of anxiety. *Br J Pharmacol.* **132** (7) : 1389-1395.

Chen Y, Brunson KL, Muller MB, Cariaga W & Baram TZ (2000) Immunocytochemical distribution of corticotropin-releasing hormone receptor type-1 (CRF(1))-like immunoreactivity in the mouse brain: light microscopy analysis using an antibody directed against the C-terminus. *J Comp Neurol.* **420** (3) : 305-323.

Chédotal A, Cozzari C, Faure MP, Hartman BK & Hamel E (1994) Distinct choline acetyltransferase (ChAT) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) bipolar neurons project to local blood vessels in the rat cerebral cortex. *Brain Research.* **646** (2) : 181-93.

Christophe E, Roebuck A, Staiger JF, Lavery DJ, Charpak S & Audinat E (2002) Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons. *J Neurophysiol.* **88** (3) : 1318-1327.

Chu ZG, Zhou FM & Hablitz JJ (2000) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *Brain Research.* **887** (2) : 399-405.

Clark MS & Kaiyala KJ (2003) Role of corticotropin-releasing factor family peptides and receptors in stress-related psychiatric disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry.* **8** (2) : 119-136.

- Connor M & Christie MD (1999)** Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **26** (7) : 493-499.
- Connors BW & Amitai Y (1995)** Functions of local circuits in neocortex: synchrony and laminae. Dans : *The Cortical Neuron*. Chapitre 9 : pp 123-140 (Gutnick & Mody, eds). Oxford University Press, New York & Oxford.
- Connors BW & Gutnick MJ (1990)** Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* **13** (3) : 99-104.
- Costall B, Kelly ME, Naylor RJ & Onaivi ES (1989)** The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* **33** (1) : 197-203.
- Costall B, Naylor RJ & Tyers MB (1990)** The psychopharmacology of 5-HT₃ receptors. *Pharmacol Ther.* **47** (2) : 181-202.
- Coyle JT, Price DL & DeLong MR (1983)** Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* **219** (4589) : 1184-1190.
- Csillag A, Hajos F, Zilles K, Schleicher A & Schroder H (1993)** Matching localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and VIP-receptor at pre- and postsynaptic sites in the mouse visual cortex. *J Neurocytol.* **22** (6) : 491-497.
- Davies MF, Deisz RA, Prince DA & Peroutka SJ (1987)** Two distinct effects of 5-hydroxytryptamine on single cortical neurons. *Brain Research.* **423** (1-2) : 347-352.
- Davies P & Maloney AJ (1976)** Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* **2** (8000) : 1403.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG & Kirkness EF (1999)** The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature.* **397** (6717) : 359-363.
- De Lima AD & Morrison JH (1989)** Ultrastructural analysis of somatostatin-immunoreactive neurons and synapses in the temporal and occipital cortex of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* **283** (2) : 212-227.
- De Lima AD & Singer W (1986)** Cholinergic innervation of the cat striate cortex: a choline acetyltransferase immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol.* **250** (3) : 324-338.
- DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T & Jones EG (1991)** Synaptic relationships of serotonin-immunoreactive terminal baskets on GABA neurons in the cat auditory cortex. *Cereb Cortex.* **1** (2) : 117-133.
- DeFelipe J & Fariñas I (1992)** The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol.* **39** (6) : 563-607.
- DeFelipe J (1993)** Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex.* **3** (4) : 273-289.

- DeFelipe J (2002)** Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res.* **136** : 215-238.
- Demeulemeester H, Vandesande F, Orban GA, Brandon C & Vanderhaeghen JJ (1988)** Heterogeneity of GABAergic cells in cat visual cortex. *J Neurosci.* **8** (3) : 988-1000.
- Derkach V, Surprenant A & North RA (1989)** 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature.* **339** (6227) : 706-709.
- Descarries L, Beaudet A & Watkins KC (1975)** Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Research.* **100** (3) : 563-588.
- Deterre P & Tritsch D (1998)** Les récepteurs couplés aux G-protéines et la modulation des canaux ioniques. Dans : *Physiologie du neurone*. Chapitre 11 : pp 323-370 (Tritsch, Chesnoy-Marchais & Feltz, eds). Doin, Paris.
- Ding YQ, Shigemoto R, Takada M, Ohishi H, Nakanishi S & Mizuno N (1996)** Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* **364** (2) : 290-310.
- Douglas CL, Baghdoyan HA & Lydic R (2001)** M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in prefrontal cortex of C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* **299** (3) : 960-966.
- Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW & Erlander MG (1999)** The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem.* **274** (43) : 30799-30810.
- Eckenstein F & Thoenen H (1983)** Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neurosci Lett.* **36** (3) : 211-215.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B & Takahashi T (1989)** A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* **414** (5) : 600-612.
- Everitt BJ & Robbins TW (1997)** Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol.* **48** : 649-684.
- Fairén A, DeFelipe J & Regidor J (1984)** Nonpyramidal neurons: general account. Dans : *Cerebral Cortex*. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex. Chapitre 6 : pp 201-254 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Feldman ML (1984)** Morphology of the neocortical pyramidal neuron. Dans : *Cerebral Cortex*. Volume 1 : Cellular Components of the Cerebral Cortex. Chapitre 5 : pp 123-200 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.

- Feltz A (1998)** Les récepteurs nicotiniques neuronaux. Dans : Physiologie du neurone. Chapitre 13 : pp 405-322 (Tritsch, Chesnoy-Marchais & Feltz, eds). Doin, Paris.
- File SE, Kenny PJ & Ouagazzal AM (1998)** Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. *Behav Neurosci.* **112** (6) : 1423-1429.
- Freund TF (2003)** Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* **26** (9) : 489-495.
- Fricker D & Miles R (2001)** Interneurons, spike timing, and perception. *Neuron.* **32** (5) : 771-774.
- Galarreta M & Hestrin S (1999)** A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature.* **402** (6757) : 72-75.
- Galarreta M & Hestrin S (2001)** Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci.* **2** (6) : 425-433.
- Galzi JL & Changeux JP (1995)** Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology.* **34** (6) : 563-582.
- Gibson JR, Beierlein M & Connors BW (1999)** Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature.* **402** (6757) : 75-79.
- Gil Z, Connors BW & Amitai Y (1997)** Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron.* **19** (3) : 679-686.
- Golgi C (1873)** Sulla struttura della sostanza grigia dell cervello. *Gazz Med Ital Lombardia.* **6** : 244-246.
- Gonchar Y & Burkhalter A (1997)** Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex.* **7** (4) : 347-358.
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M & Dani JA (1996)** Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature.* **383** (6602) : 713-716.
- Gu Q (2002)** Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience.* **111** (4) : 815-835.
- Gurevich EV & Joyce JN (1997)** Alterations in the cortical serotonergic system in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry.* **42** (7) : 529-545.
- Hajós F, Zilles K, Schleicher A & Kalman M (1988)** Types and spatial distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing synapses in the rat visual cortex. *Anat Embryol (Berl).* **178** (3) : 207-17.
- Hajós F, Staiger JF, Halasy K, Freund TF & Zilles K (1997)** Geniculo-cortical afferents form synaptic contacts with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive neurons of the rat visual cortex. *Neurosci Lett.* **228** (3) : 179-182.

Haug T & Storm JF (2000) Protein kinase A mediates the modulation of the slow Ca(2+)-dependent K(+) current, I(sAHP), by the neuropeptides CRF, VIP, and CGRP in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* **83** (4) : 2071-2079.

Hedreen JC, Bacon SJ, Cork LC, Kitt CA, Crawford GD, Salvaterra PM & Price DL (1983) Immunocytochemical identification of cholinergic neurons in the monkey central nervous system using monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. *Neurosci Lett.* **43** (2-3) : 173-177.

Hendry SH, Jones EG & Emson PC (1984a) Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J Neurosci.* **4** (10) : 2497-2517.

Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, Schmechel D, Brandon C & Emson PC (1984b) Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc Natl Acad Sci USA.* **81** (20) : 6526-6530.

Hill E, Cepeda C, Férézou I, Cauli B, Rossier J & Lambolez B (2002) Two subtypes of cortical excitatory neurons express the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *Federation of European Neuroscience Societies.* Abstr. 217.12. Paris, France.

Hornung JP, Fritschy JM & Törk I (1990) Distribution of two morphologically distinct subsets of serotonergic axons in the cerebral cortex of the marmoset. *J Comp Neurol.* **297** (2) : 165-181.

Hornung JP & Celio MR (1992) The selective innervation by serotonergic axons of calbindin-containing interneurons in the neocortex and hippocampus of the marmoset. *J Comp Neurol.* **320** (4) : 457-467.

Houdi AA, Dasgupta R & Kindy MS (1998) Effect of nicotine use and withdrawal on brain preproenkephalin A mRNA. *Brain Research.* **799** (2) : 257-263.

Houser CR, Hendry SH, Jones EG & Vaughn JE (1983) Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J Neurocytol.* **12** (4) : 617-638.

Houser CR, Vaughn JE, Hendry SH, Jones EG & Peters A (1984) GABA neurons in the cerebral cortex. Dans : *Cerebral Cortex* . Volume 2 : Functional properties of cortical cells. Chapitre 3: pp 63-90 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.

Hoyer D, Hannon JP & Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* **71** (4) : 533-554.

Irvine EE, Bagnalasta M, Marcon C, Motta C, Tessari M, File SE & Chiamulera C (2001a) Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology (Berl).* **153** (3) : 315-320.

Irvine EE, Cheeta S, Marshall M & File SE (2001b) Different treatment regimens and the development of tolerance to nicotine's anxiogenic effects. *Pharmacol Biochem Behav.* **68** (4) : 769-776.

Jacobowitz DM & Winsky L (1991) Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol.* **304** (2) : 198-218.

Jacobs BL & Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* **72** (1) : 165-229.

Jakab RL & Goldman-Rakic PS (1998) 5-Hydroxytryptamine_{2A} serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95** (2) : 735-740.

Jakab RL & Goldman-Rakic PS (2000) Segregation of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *J Comp Neurol.* **417** (3) : 337-348.

Johnston MV, McKinney M & Coyle JT (1981) Neocortical cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp Brain Res.* **43** (2) : 159-172.

Jones BJ, Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Naylor RJ, Oakley NR & Tyers MB (1988) The potential anxiolytic activity of GR38032F, a 5-HT₃-receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* **93** (4) : 985-993.

Jones EG & Hendry SH (1984) Basket cells. Dans : *Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex.* Chapitre 8 : pp 309-336 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.

Jones EG (1984a) History of cortical cytology. Dans : *Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex.* Chapitre 1: pp 1-34 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.

Jones EG (1984b) Neurogliaform or spiderweb cells. Dans : *Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex.* Chapitre 12 : pp 409-418 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.

Jones EG (1984c) Laminar distribution of cortical efferent cells. Dans : *Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex.* Chapitre 16 : pp 521-554 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.

Kalyuzhny AE & Wessendorf MW (1998) Relationship of mu- and delta-opioid receptors to GABAergic neurons in the central nervous system, including antinociceptive brainstem circuits. *J Comp Neurol.* **392** (4) : 528-547.

Kandel ER (1991a) Brain and Behavior. Dans : *Principles of Neural Science.* pp 5-17 (Kandel, Schwartz & Jessel, eds). Norwalk, Appleton & Lange.

Kandel ER (1991b) Nerve Cells and Behavior. Dans : *Principles of Neural Science.* pp 18-32 (Kandel, Schwartz & Jessel, eds). Norwalk, Appleton & Lange.

- Kaneko T, Murashima M, Lee T & Mizuno N (1998)** Characterization of neocortical non-pyramidal neurons expressing preprotachykinins A and B: a double immunofluorescence study in the rat. *Neuroscience*. **86** (3) : 765-781.
- Kawaguchi Y (1993)** Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol*. **69** (2) : 416-431.
- Kawaguchi Y & Kubota Y (1993)** Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol*. **70** (1) : 387-396.
- Kawaguchi Y (1995)** Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci*. **15** (4) : 2638-2655.
- Kawaguchi Y & Kubota Y (1996)** Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci*. **16** (8) : 2701-2715.
- Kawaguchi Y & Kubota Y (1997)** GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex*. **7** (6) : 476-486.
- Kawaguchi Y (1997)** Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol*. **78** (3) : 1743-1747.
- Kawaguchi Y (2001)** Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. *J Neurosci*. **21** (18) : 7261-7272.
- Kawaguchi Y & Kondo S (2002)** Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol*. **31** (3-5) : 277-287.
- Kieffer BL & Gavériaux-Ruff C (2002)** Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol*. **66** (5) : 285-306.
- Kondo S & Kawaguchi Y (2001)** Slow synchronized bursts of inhibitory postsynaptic currents (0.1-0.3 Hz) by cholinergic stimulation in the rat frontal cortex in vitro. *Neuroscience*. **107** (4) : 551-560.
- Koob GF (1999)** Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann N Y Acad Sci*. **897** : 27-45.
- Kosofsky BE & Molliver ME (1987)** The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse*. **1** (2) : 153-168.
- Kriegler S, Sudweeks S & Yakel JL (1999)** The nicotinic alpha4 receptor subunit contributes to the lining of the ion channel pore when expressed with the 5-HT3 receptor subunit. *J Biol Chem*. **274** (7) : 3934-3936.

- Kristt DA, McGowan RA, Jr., Martin-MacKinnon N & Solomon J (1985)** Basal forebrain innervation of rodent neocortex: studies using acetylcholinesterase histochemistry, Golgi and lesion strategies. *Brain Research*. **337** (1) : 19-39.
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K & . (1986)** Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. **323** (6087) : 411-416.
- Kubota Y, Hattori R & Yui Y (1994)** Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Research*. **649** (1-2) : 159-173.
- Kubota Y & Kawaguchi Y (1994)** Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. *Jpn J Physiol*. **44** (Suppl 2) : S145-S148.
- Kubota Y & Kawaguchi Y (1997)** Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Research*. **752** (1-2) : 175-183.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F & Rossier J (1992)** AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron*. **9** (2) : 247-258.
- Lena C & Changeux JP (1997)** Pathological mutations of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders. *Curr Opin Neurobiol*. **7** (5) : 674-682.
- Levey AI, Wainer BH, Rye DB, Mufson EJ & Mesulam MM (1984)** Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience*. **13** (2) : 341-353.
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL & Brann MR (1991)** Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci*. **11** (10) : 3218-3226.
- Levey AI, Edmunds SM, Heilman CJ, Desmond TJ & Frey KA (1994)** Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience*. **63** (1) : 207-221.
- Levin ED (1992)** Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl)*. **108** (4) : 417-431.
- Levy RB & Aoki C (2002)** Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors occur at postsynaptic densities of AMPA receptor-positive and -negative excitatory synapses in rat sensory cortex. *J Neurosci*. **22** (12) : 5001-5015.
- Lubin M, Erisir A & Aoki C (1999)** Ultrastructural immunolocalization of the alpha 7 nAChR subunit in guinea pig medial prefrontal cortex. *Ann N Y Acad Sci*. **868** : 628-632.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G & Amar M (2003)** Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch*. **446** (1) : 17-29.

- Luiten PG, Spencer DG, Jr., Traber J & Gaykema RP (1985)** The pattern of cortical projections from the intermediate parts of the magnocellular nucleus basalis in the rat demonstrated by tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Neurosci Lett.* **57** (2) : 137-142.
- Luiten PG, Gaykema RP, Traber J & Spencer DG, Jr. (1987)** Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Research.* **413** (2) : 229-250.
- Lund JS (1984)** Spiny stellate neurons. Dans : Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex. Chapitre 7 : pp 255-308 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Lysakowski A, Wainer BH, Bruce G & Hersh LB (1989)** An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience.* **28** (2) : 291-336.
- MacDermott AB, Role LW & Siegelbaum SA (1999)** Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci.* **22** : 443-485.
- Madison DV & Nicoll RA (1988)** Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus. *J Physiol.* **398** : 123-130.
- Malin DH (2001)** Nicotine dependence: studies with a laboratory model. *Pharmacol Biochem Behav.* **70** (4) : 551-559.
- Mansour A, Watson SJ & Akil H (1995)** Opioid receptors: past, present and future. *Trends Neurosci.* **18** (2) : 69-70.
- Mansour A, Burke S, Pavlic RJ, Akil H & Watson SJ (1996)** Immunohistochemical localization of the cloned kappa 1 receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience.* **71** (3) : 671-690.
- Marek GJ & Aghajanian GK (1998)** 5-Hydroxytryptamine-induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by mu-opiate receptor activation. *Neuroscience.* **86** (2) : 485-497.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM & Julius D (1991)** Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science.* **254** (5030) : 432-437.
- Marin-Padilla M (1984)** Neurons of Layer I: a developmental analysis. Dans : Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex. Chapitre 14 : pp 447-478 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Marin-Padilla M (1998)** Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci.* **21** (2) : 64-71.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW & Prince DA (1985)** Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol.* **54** (4) : 782-806.

- McCormick DA & Prince DA (1985)** Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. **82** (18) : 6344-6348.
- McCormick DA & Prince DA (1986)** Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J Physiol*. **375** : 169-194.
- McGaughy J, Everitt BJ, Robbins TW & Sarter M (2000)** The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins. *Behav Brain Res*. **115** (2) : 251-263.
- McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P & Role LW (1995)** Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*. **269** (5231) : 1692-1696.
- McGinty JF, van der KD & Bloom FE (1984)** The distribution and morphology of opioid peptide immunoreactive neurons in the cerebral cortex of rats. *J Neurosci*. **4** (4) : 1104-1117.
- McGinty JF (1985)** Prodynorphin immunoreactivity is located in different neurons than proenkephalin immunoreactivity in the cerebral cortex of rats. *Neuropeptides*. **5** (4-6) : 465-468.
- Mechawar N, Cozzari C & Descarries L (2000)** Cholinergic innervation in adult rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical description. *J Comp Neurol*. **428** (2) : 305-318.
- Mercer LD, Le VQ, Nunan J, Jones NM & Beart PM (2000)** Direct visualization of cholecystokinin subtype2 receptors in rat central nervous system using anti-peptide antibodies. *Neurosci Lett*. **293** (3) : 167-170.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH & Levey AI (1983)** Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. **10** (4) : 1185-1201.
- Mesulam MM, Hersh LB, Mash DC & Geula C (1992)** Differential cholinergic innervation within functional subdivisions of the human cerebral cortex: a choline acetyltransferase study. *J Comp Neurol*. **318** (3) : 316-328.
- Minami M, Hosoi Y, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Katsumata S, Yabuuchi K, Onogi T & Satoh M (1993)** In situ hybridization study of kappa-opioid receptor mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett*. **162** (1-2) : 161-164.
- Morales M, Battenberg E, de Lecea L & Bloom FE (1996a)** The type 3 serotonin receptor is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Brain Research*. **731** (1-2) : 199-202.
- Morales M, Battenberg E, de Lecea L, Sanna PP & Bloom FE (1996b)** Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptor in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. **36** (2) : 251-260.

- Morales M & Bloom FE (1997)** The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J Neurosci.* **17** (9) : 3157-3167.
- Morales M, Battenberg E & Bloom FE (1998)** Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT₃ receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol.* **402** (3) : 385-401.
- Morrison JH, Magistretti PJ, Benoit R & Bloom FE (1984)** The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP-positive cell: an immunohistochemical analysis. *Brain Research.* **292** (2) : 269-282.
- Mountcastle VB (1957)** Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neuropsychology.* **4** : 1-24.
- Mountcastle VB (1997)** The columnar organization of the neocortex. *Brain.* **120** : 701-722.
- Mrzljak L, Pappay M, Leranth C & Goldman-Rakic PS (1995)** Cholinergic synaptic circuitry in the macaque prefrontal cortex. *J Comp Neurol.* **357** (4) : 603-617.
- Mulligan KA & Törk I (1987)** Serotonergic axons form basket-like terminals in cerebral cortex. *Neurosci Lett.* **81** (1-2) : 7-12.
- Mulligan KA & Törk I (1988)** Serotonergic innervation of the cat cerebral cortex. *J Comp Neurol.* **270** (1) : 86-110.
- Naegle JR & Barnstable CJ (1989)** Molecular determinants of GABAergic local-circuit neurons in the visual cortex. *Trends Neurosci.* **12** (1) : 28-34.
- Neher E & Sakmann B (1976)** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* **260** (5554) : 799-802.
- Nestler EJ (2002)** Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem.* **78** (3) : 637-647.
- Newberry NR, Footitt DR, Papanastassiou V & Reynolds DJ (1999)** Actions of 5-HT on human neocortical neurones in vitro. *Brain Research.* **833** (1) : 93-100.
- Ohuoha DC, Hyde TM & Kleinman JE (1993)** The role of serotonin in schizophrenia: an overview of the nomenclature, distribution and alterations of serotonin receptors in the central nervous system. *Psychopharmacology (Berl).* **112** (1 Suppl) : S5-15.
- Ong WY, Garey LJ & Sumi Y (1994)** Distribution of preprosomatostatin mRNA in the rat parietal and temporal cortex. *Brain Res Mol Brain Res.* **23** (1-2) : 151-156.
- Papadopoulos GC, Parnavelas JG & Cavanagh ME (1987a)** Extensive co-existence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Research.* **420** (1) : 95-99.

- Papadopoulos GC, Parnavelas JG & Buijs RM (1987b)** Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the serotonin innervation of the rat visual cortex. *J Neurocytol.* **16** (6) : 883-892.
- Parnavelas JG, Kelly W, Franke E & Eckenstein F (1986)** Cholinergic neurons and fibres in the rat visual cortex. *J Neurocytol.* **15** (3) : 329-336.
- Paspalas CD & Papadopoulos GC (2001)** Serotonergic afferents preferentially innervate distinct subclasses of peptidergic interneurons in the rat visual cortex. *Brain Research.* **891** (1-2) : 158-167.
- Peters A (1984a)** Chandelier cells. Dans : Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex. Chapitre 10 : pp 361-380 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Peters A (1984b)** Bipolar cells. Dans : Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex. Chapitre 11 : pp 381-408 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Peters A, Miller M & Kimerer LM (1983)** Cholecystokinin-like immunoreactive neurons in rat cerebral cortex. *Neuroscience.* **8** (3) : 431-448.
- Peters A & Harriman KM (1988)** Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. *J Comp Neurol.* **267** (3) : 409-432.
- Peters A (1990)** The axon terminals of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing bipolar cells in rat visual cortex. *J Neurocytol.* **19** (5) : 672-85.
- Pomerleau OF (1998)** Endogenous opioids and smoking: a review of progress and problems. *Psychoneuroendocrinology.* **23** (2) : 115-130.
- Porter JT, Cauli B, Staiger JF, Lambolez B, Rossier J & Audinat E (1998)** Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur J Neurosci.* **10** (12) : 3617-3628.
- Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J & Audinat E (1999)** Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci.* **19** (13) : 5228-5235.
- Ragnauth A, Schuller A, Morgan M, Chan J, Ogawa S, Pintar J, Bodnar RJ & Pfaff DW (2001)** Female preproenkephalin-knockout mice display altered emotional responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** (4) : 1958-1963.
- Ramón y Cajal S (1911)** Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Maloine, Paris. Traduit de l'espagnol : *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, Moya, Madrid, 1904, par Azoulay L. Traduit en anglais par Swanson N & Swanson LW (1995) : *Histology of the nervous system*. Oxford University Press, New York-Oxford.
- Reever CM, Ferrari-DiLeo G & Flynn DD (1997)** The M5 (m5) receptor subtype: fact or fiction? *Life Sci.* **60** (13-14) : 1105-1112.

- Reyes A, Lujan R, Rozov A, Burnashev N, Somogyi P & Sakmann B (1998)** Target-cell-specific facilitation and depression in neocortical circuits. *Nat Neurosci.* **1** (4) : 279-285.
- Ribeiro SJ, Teixeira RM, Calixto JB & De Lima TC (1999)** Tachykinin NK(3)receptor involvement in anxiety. *Neuropeptides.* **33** (2) : 181-188.
- Robbins TW & Everitt BJ (1999)** Drug addiction: bad habits add up. *Nature.* **398** (6728) : 567-570.
- Roerig B, Nelson DA & Katz LC (1997)** Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex. *J Neurosci.* **17** (21) : 8353-8362.
- Rogers JH (1992)** Immunohistochemical markers in rat brain: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with tyrosine hydroxylase. *Brain Research.* **587** (2) : 203-210.
- Role LW & Berg DK (1996)** Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron.* **16** (6) : 1077-1085.
- Roychoudhury M & Kulkarni SK (1997)** Antianxiety profile of ondansetron, a selective 5-HT₃ antagonist, in a novel animal model. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **19** (2) : 107-111.
- Rozov A, Jerecic J, Sakmann B & Burnashev N (2001)** AMPA receptor channels with long-lasting desensitization in bipolar interneurons contribute to synaptic depression in a novel feedback circuit in layer 2/3 of rat neocortex. *J Neurosci.* **21** (20) : 8062-8071.
- Ruberg M, Ploska A, Javoy-Agid F & Agid Y (1982)** Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Research.* **232** (1) : 129-139.
- Sarnat HB & Flores-Sarnat L (2002)** Role of Cajal-Retzius and subplate neurons in cerebral cortical development. *Semin Pediatr Neurol.* **9** (4) : 302-308.
- Sarter M & Bruno JP (1999)** Abnormal regulation of corticopetal cholinergic neurons and impaired information processing in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* **22** (2) : 67-74.
- Sarter MF & Bruno JP (1994)** Cognitive functions of cortical ACh: lessons from studies on trans-synaptic modulation of activated efflux. *Trends Neurosci.* **17** (6) : 217-221.
- Schiffmann SN & Vanderhaeghen JJ (1991)** Distribution of cells containing mRNA encoding cholecystokinin in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* **304** (2) : 219-233.
- Schmidt P, Schmolke C, Musshoff F, Menzen M, Prohaska C & Madea B (2000)** Numerical density of delta-opioid receptor expressing neurons in the frontal cortex of drug-related fatalities. *Forensic Sci Int.* **113** (1-3) : 423-433.

- Schmidt P, Schmolke C, Musshoff F, Menzen M, Prohaska C & Madea B (2003)** Area-specific increased density of mu-opioid receptor immunoreactive neurons in the cerebral cortex of drug-related fatalities. *Forensic Sci Int.* **133** (3) : 204-211.
- Séguéla P, Watkins KC & Descarries L (1989)** Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J Comp Neurol.* **289** (1) : 129-142.
- Sherman SM & Guillery RW (1996)** Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol.* **76** (3) : 1367-1395.
- Shinohara S & Kawasaki K (1997)** Electrophysiological changes in rat hippocampal pyramidal neurons produced by cholecystokinin octapeptide. *Neuroscience.* **78** (4) : 1005-1016.
- Smiley JF & Goldman-Rakic PS (1996)** Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J Comp Neurol.* **367** (3) : 431-443.
- Smiley JF, Morrell F & Mesulam MM (1997)** Cholinergic synapses in human cerebral cortex: an ultrastructural study in serial sections. *Exp Neurol.* **144** (2) : 361-368.
- Somogyi P & Cowey A (1984)** Double bouquet cells. Dans : Cerebral Cortex. Volume 1 : Cellular components of the cerebral cortex. Chapitre 9 : pp 337-360 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R & Buhl EH (1998)** Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev.* **26** (2-3) : 113-135.
- Stacey AE, Woodhall GL & Jones RS (2002)** Neurokinin-receptor-mediated depolarization of cortical neurons elicits an increase in glutamate release at excitatory synapses. *Eur J Neurosci.* **16** (10) : 1896-1906.
- Staiger JF, Zilles K & Freund TF (1996)** Innervation of VIP-immunoreactive neurons by the ventroposteromedial thalamic nucleus in the barrel cortex of the rat. *J Comp Neurol.* **367** (2) : 194-204.
- Staiger JF, Freund TF & Zilles K (1997)** Interneurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) are extensively innervated by parvalbumin-containing boutons in rat primary somatosensory cortex. *Eur J Neurosci.* **9** (11) : 2259-68.
- Staiger JF, Schubert D, Zuschratter W, Kotter R, Luhmann HJ & Zilles K (2002)** Innervation of interneurons immunoreactive for VIP by intrinsically bursting pyramidal cells and fast-spiking interneurons in infragranular layers of juvenile rat neocortex. *Eur J Neurosci.* **16** (1) : 11-20.
- Staiger JF, Masannek C, Schleicher A & Zuschratter W (2004)** Calbindin-containing interneurons are a target for VIP-immunoreactive synapses in rat primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* **468** : 179-189.

Steriade M (1997) Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *Cereb Cortex*. **7** (6) : 583-604.

Stewart A, Davies PA, Kirkness EF, Safa P & Hales TG (2003) Introduction of the 5-HT_{3B} subunit alters the functional properties of 5-HT₃ receptors native to neuroblastoma cells. *Neuropharmacology*. **44** (2) : 214-223.

Stuart GJ, Dodt HU & Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch*. **423** (5-6) : 511-518.

Takahashi K (1965) Slow and fast groups of pyramidal tract cells and their respective membrane properties. *J Neurophysiol*. **28** (5) : 908-924.

Taki K, Kaneko T & Mizuno N (2000) A group of cortical interneurons expressing mu-opioid receptor-like immunoreactivity: a double immunofluorescence study in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*. **98** (2) : 221-231.

Tamas G, Buhl EH, Lorincz A & Somogyi P (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci*. **3** (4) : 366-371.

Thomson AM & Deuchars J (1997) Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings in vitro. *Cereb Cortex*. **7** (6) : 510-522.

Thomson AM & Bannister AP (2003) Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex*. **13** (1) : 5-14.

Törk I (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci*. **600** : 9-35.

Turrini P, Casu MA, Wong TP, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A & Cuello AC (2001) Cholinergic nerve terminals establish classical synapses in the rat cerebral cortex: synaptic pattern and age-related atrophy. *Neuroscience*. **105** (2) : 277-285.

Umbriaco D, Watkins KC, Descarries L, Cozzari C & Hartman BK (1994) Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *J Comp Neurol*. **348** (3) : 351-373.

Vale AL & Green S (1996) Effects of chlordiazepoxide, nicotine and d-amphetamine in the rat potentiated startle model of anxiety. *Behav Pharmacol*. **7** (2) : 138-143.

van Brederode JF, Helliesen MK & Hendrickson AE (1991) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k in the sensorimotor cortex of the rat. *Neuroscience*. **44** (1) : 157-171.

van der Zee EA & Luiten PG (1999) Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*. **58** (5) : 409-471.

- van Hooft JA, Spier AD, Yakel JL, Lummis SC & Vijverberg HP (1998)** Promiscuous coassembly of serotonin 5-HT₃ and nicotinic alpha₄ receptor subunits into Ca²⁺-permeable ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95** (19) : 11456-11461.
- van Megen HJ, Westenberg HG, den Boer JA & Kahn RS (1996)** Cholecystokinin in anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol*. **6** (4) : 263-280.
- Vaughan DW (1984)** The structure of neuroglial cells. Dans : Cerebral Cortex. Volume 2 : Functional Properties of Cortical Cells. Chapitre 10 : pp 285-298 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Venance L, Rozov A, Blatow M, Burnashev N, Feldmeyer D & Monyer H (2000)** Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97** (18) : 10260-10265.
- Vidal C & Changeux JP (1993)** Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience*. **56** (1) : 23-32.
- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J & Swanson LW (1989)** Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*. **284** (2) : 314-335.
- Wada E, McKinnon D, Heinemann S, Patrick J & Swanson LW (1990)** The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (alpha 5) in the rat central nervous system. *Brain Research*. **526** (1) : 45-53.
- Wahle P (1993)** Differential regulation of substance P and somatostatin in Martinotti cells of the developing cat visual cortex. *J Comp Neurol*. **329** (4) : 519-538.
- Wainer BH, Bolam JP, Freund TF, Henderson Z, Totterdell S & Smith AD (1984)** Cholinergic synapses in the rat brain: a correlated light and electron microscopic immunohistochemical study employing a monoclonal antibody against choline acetyltransferase. *Brain Research*. **308** (1) : 69-76.
- Ward JH (1963)** Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*. **58** : 236-244.
- Wevers A, Schmidt P, Cserpan E, Cserpan I, Maderspach K, Staak M & Schroder H (1995)** Cellular distribution of the mRNA for the kappa-opioid receptor in the human neocortex: a non-isotopic in situ hybridization study. *Neurosci Lett*. **195** (2) : 125-128.
- Wewers ME, Dhatt RK, Snively TA & Tejwani GA (1999)** The effect of chronic administration of nicotine on antinociception, opioid receptor binding and met-enkephalin levels in rats. *Brain Research*. **822** (1-2) : 107-113.

- White EL & Rock MP (1980)** Three-dimensional aspects and synaptic relationships of a Golgi-impregnated spiny stellate cell reconstructed from serial thin sections. *J Neurocytol.* **9** (5) : 615-636.
- White EL (1986)** Termination of thalamic afferents in the cerebral cortex. Dans : *Cerebral Cortex. Volume 5 : Sensory-motor areas and aspects of cortical connectivity. Chapitre 8* : pp 271-290 (Jones & Peters, eds). Plenum Press, New York & London.
- Xiang Z, Huguenard JR & Prince DA (1998)** Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science* **281** (5379) : 985-988.
- Xiang Z & Prince DA (2003)** Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *J Neurophysiol.* **89** (3) : 1278-1287.
- Yasuda RP, Ciesla W, Flores LR, Wall SJ, Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spagnola BV & Wolfe BB (1993)** Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* **43** (2) : 149-157.
- Zhou FM & Hablitz JJ (1999)** Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* **82** (6) : 2989-2999.
- Zieglgansberger W, French ED, Siggins GR & Bloom FE (1979)** Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science.* **205** (4404) : 415-417.
- Zupanc GK (1996)** Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron.* **27** (1) : 35-91.

RÉSUMÉ

Ce travail avait pour objectif l'étude fonctionnelle d'une population d'interneurones GABAergiques du néocortex. La combinaison des techniques d'électrophysiologie, de biologie moléculaire et d'histochimie nous a permis de montrer que les interneurones sensibles aux agonistes nicotiques, qui expriment le peptide vasoactif intestinal et la cholecystokinine, peuvent être activés de manière synaptique par les fibres sérotoninergiques afférentes originaires des noyaux du raphé, via le récepteur à la sérotonine de type 3. La mise en évidence de l'expression sélective du récepteur opioïde de type μ et de la préproenképhaline dans cette population neuronale nous a conduit à démontrer l'existence d'une boucle d'autorégulation enképhalinergique, spécifique de ces interneurones. L'identification de mécanismes contrôlant la mise en jeu d'une population neuronale restreinte dans l'activité du réseau néocortical nous a permis de mieux cerner la place qu'elle occupe dans la physiologie du néocortex.

Mots clés : néocortex, cortex cérébral, patch-clamp, RT-PCR sur cellule unique, interneurones, peptide vasoactif intestinal, cholecystokinine, sérotonine, récepteur 5-HT₃, récepteur nicotinique, enképhaline, récepteur opioïde de type μ .

SUMMARY

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A NEOCORTICAL GABAERGIC INTERNEURON POPULATION

The aim of this work was to carry out a functional study of a population of neocortical GABAergic interneurons. The combination of electrophysiological, molecular biology and histochemical techniques enabled us to demonstrate that interneurons sensitive to nicotinic agonists expressing vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin can be synaptically activated by afferent serotonergic fibers originating from the raphé nucleus via the type 3 serotonergic receptor. Evidence of the selective expression of the μ -opioid receptor together with preproenkephalin in this neuronal population led us to demonstrate the existence of an enkephalinergic autoregulatory loop specific to these interneurons. The identification of such mechanisms controlling the activity of a neuronal population enables us to propose a specific role for these interneurons in the physiology of the neocortical network.

Key words : neocortex, cerebral cortex, patch-clamp, single cell RT-PCR, interneurons, vasoactive intestinal peptide, cholecystokinin, serotonin, 5-HT₃ receptor, nicotinic receptor, enkephalin, μ -opioid receptor.

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire CNRS UMR 7637
École Supérieure De Physique et de Chimie Industrielles
10 rue Vauquelin, 75005 Paris.