HAL
open science

Neuromodulation des réseaux neuronaux : contrôle sérotoninergique de la balance excitation-inhibition dans le cortex visuel de rat.

Alexandre Moreau

To cite this version:

Alexandre Moreau. Neuromodulation des réseaux neuronaux : contrôle sérotoninergique de la balance excitation-inhibition dans le cortex visuel de rat.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT : . tel-00441514v2

HAL Id: tel-00441514

https://theses.hal.science/tel-00441514v2

Submitted on 16 Dec 2009

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.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

Année 2008-2009 N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

spécialité : Neuroscience

présentée et soutenue publiquement

par

Alexandre MOREAU

le 11 décembre 2009

Titre :

Neuromodulation des réseaux neuronaux : contrôle sérotoninergique de la balance excitation-inhibition dans le cortex visuel de rat.

Directeur de thèse : **Dr. Philippe FOSSIER**

JURY

Pr. Hervé DANIEL	Président
Dr. Michel HAMON	Rapporteur
Dr. Jean-Marc EDELINE	Rapporteur
Dr. Isabelle FÉRÉZOU	Examinatrice
Pr. Jean-Pierre HORNUNG	Examinateur
Dr. Philippe FOSSIER	Directeur de thèse

« Quand l'âme raisonnable sera en cette machine [le corps de l'Homme],
elle y aura son siège principal dans le cerveau, et sera là comme le fontenier,
qui doit être dans les regards où se vont rendre tous les tuyaux de ces machines,
quand il veut exciter, ou empêcher, ou changer en quelque façon leurs mouvements. »

René Descartes, Traité de l'Homme (1648)

Remerciements,

En premier lieu, je souhaite remercier les membres de mon Jury de thèse :
Monsieur le Pr. Hervé Daniel pour avoir accepté la présidence du Jury,
Messieurs les Dr. Michel Hamon et Jean-Marc Edeline qui ont accepté d'être rapporteurs,
Madame le Dr. Isabelle Férézou et Monsieur le Pr. Jean-Pierre Hornung pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire (CNRS, Gif-sur-Yvette) dirigé par le Dr. Gérard Baux, que je remercie pour son accueil chaleureux et sa bonhomie.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Philippe Fossier pour m'avoir accueilli au sein de son équipe « Efficacité synaptique » depuis mon stage de Master 2. Je le remercie pour sa gentillesse, pour sa disponibilité, pour son écoute, pour ses conseils et pour avoir eu confiance dans mes orientations scientifiques. Je le remercie tout particulièrement pour sa lecture minutieuse et critique de ce manuscrit et pour toutes nos discussions scientifiques passionnées, ou non scientifiques. J'ai conscience que tu as souvent dû faire preuve de beaucoup de persuasion pour convaincre mon esprit têtu !
Je te remercie enfin de m'avoir permis de travailler dans des conditions matérielles et humaines optimales.

Je remercie également le Dr. Muriel Amar pour m'avoir initié à la mesure et à l'analyse de la balance excitation-inhibition, pour son aide technique et pour ses nombreuses spécialités culinaires.

Un grand merci à mon ami Nicolas, ancien membre de l'équipe, auprès de qui j'ai beaucoup appris et avec qui j'ai joyeusement partagé mes deux premières années de thèse. Je n'oublierai jamais ton humour, tes séances de pompes dissimulées, les rillettes de Missillac, ta tarte au carambar, « notre » réveil à Montpellier, le papier peint d'une certaine photo, ton bonnet de Père Noël clignotant fièrement assumé et... notre, comment dire, surprenante rencontre avec Galopin ! Merci pour ta sincérité, pour ta simplicité, pour ton aide expérimentale précieuse et ta rigueur exemplaire. Malgré tous mes efforts, je n'aurai jamais réussi, à part peut être une fois, à arriver avant toi le matin ! Je ne me fais aucun souci pour ton avenir scientifique et souhaite beaucoup de bonheur au futur Papa...

L'association n'aurait pas été si parfaite sans notre ami, notre complice, mon « popol préféré », Pierre. Ta gentillesse, ta modestie et ta culture sont exemplaires. Bien que souvent rivés derrière nos postes respectifs, partager ces trois années en ta compagnie a été un réel plaisir. Nos pauses goûters et nos pauses apéro/saucisson ont fait partie, entres autres, des moments de détente savoureux après une longue journée de manip. Ton déhanché « bowlingnien » et ton fondant au chocolat glacé à l'orange resteront également dans les annales. Je n'aurai pas eu la chance d'être à la place de Nicolas, là où tu sais ! Mais ce n'est que partie remise... peut être à Chicago :) Une pensée émue, enfin, pour le Caliméro que tu m'as offert. Sans lui, je n'aurai pas survécu à ma thèse (j'y reviendrai...).

Et pour compléter ce duo de joyeux trublions, j'ai eu la joie de rencontrer Emmanuelle. Un grand merci pour ton énergie sociale et fédérative, pour ton sourire et ta bonne humeur, pour avoir illuminé notre couloir d'électrophysiologistes, et pour ta joie de vivre. Merci de m'avoir fait découvrir Grans (la « capitale » de la Provence !), Galopin, le mistral et la fameuse soupe de supions. Merci à toi de m'avoir initié à la littérature provençale : « moulegas », « caganis », « esquicher », « péguer », « ensuquer », « chicoulon », « cascailler », et mon préféré, « ensuquer » ! Je te souhaite, ainsi qu'à ta moitié, beaucoup de bonheur.

Je remercie également toute « l'équipe Molgo » (Jordi, Evelyne, Sabine, Roland, Romulo, Patricia, Sébastien, et Agnese dont le passage parmi nous a été fort apprécié) avec qui j'ai partagé nombre de repas tard le midi. Un merci particulier à Evelyne pour ses succulents « gâteaux-maison», pour sa bonne humeur constante et pour l'animation qu'elle a su mettre dans « notre » couloir, même tard le soir. Merci aussi à Sébastien pour son humour, pour ses talents de sculpteur sur pâte à modeler, et pour les courses de diable à roulette !

Merci également à mes compères de couloir François et Gilles, pour leur présence bien sympathique et nos nombreuses discussions.

Parce qu'il n'y en a pas qu'un au NBCM, je remercie chaleureusement tous les membres de « l'autre couloir » et en particulier les occupants de la fourmilière « 34 ». La liste est longue :

Merci tout d'abord à Jean-Vianney Barnier pour son dynamisme et pour m'avoir offert l'opportunité de collaborer avec son équipe et d'en apprendre beaucoup sur PAK3. Merci

aussi pour ta compagnie lors de nos nombreux footings du midi. Ne désespère pas de me dépasser un jour ! :)

Merci à Nicolas Morel d'avoir levé « mon » voile obscure sur la biologie moléculaire et de m'avoir appris à dessiner des « primers » de PCR. Merci pour tes nombreux conseils concernant les RT PCR sur cellule unique, et pour m'avoir patiemment initié aux différentes étapes expérimentales. Merci également de m'avoir fait confiance dans le cadre de notre collaboration et pour ton savoir passionné sur la vATPase.

Merci au duo de choc « Véro et Sandrine » pour toute leur sympathie et leur amitié. Merci également pour vos conseils techniques et votre disponibilité lorsque je tentais désespérément d'obtenir de belles images avec mes immunomarquages. Un grand merci pour tous les moments fraternels que vous avez organisés : les barbecues, les raclettes, la sacro-sainte cueillette des framboises, les apéros improvisés et les mémorables soirées « potins » ! Je pense que l'on rencontre rarement des personnes comme vous dans un labo, je ne vous oublierai pas.

Merci à Yvette pour son extrême gentillesse, à Seana pour son rire « sonore » bien agréable (je me demande toujours comment je peux l'entendre depuis ma pièce !) et à François pour son humour provocateur.

Merci aux formidables thésards de l'équipe 34, avec qui j'ai partagé de nombreux moments mémorables :

Gaëlle, merci pour ta spontanéité, ton esprit taquin, ta sincérité et ta « Bretagne attitude ». J'espère que ta réussite scientifique sera à la hauteur de ta mousse au chocolat ! Un conseil, si tu as l'occasion de faire un postdoc à McGill, n'hésite pas, c'est « super le Canada » ! Quant à ton D.D.S.C.… j'aurai tout fait pour… en vain !

Vincent, malgré tous mes efforts, je n'aurais jamais atteint ton niveau de blagues pas drôles ! Tu seras à jamais mon maître ! Merci à toi pour ta sympathie, ta gentillesse et ton flegme. Je te souhaite bien du courage pour « affronter», seul, ta troisième année avec Gaëlle et les nouvelles recrues... :)

Manu, le caractère officiel de ces remerciements m'oblige à la retenue. Je ne parlerai donc pas du camembert, du seau et du balai de Nouan, ni des frasques de ton sosie. Ta compagnie au labo et en dehors a vraiment été un grand plaisir. Avec tous mes passages dans ton bureau, j'aurai mieux fait d'échanger ma place contre celle laissée vacante à tes côtés.

J'espère que tu sauras exporter tes talents de P.A.L.M. à tes futurs collègues. Ne t'inquiète pas pour Gif, la relève semble assurée ! Je te dis à très vite au pays des Caribous…

Merci aussi aux autres membres de ce couloir, à l'équipe de l'administration/gestion : Nadine, Martine, Dominique et Véronique pour leur sympathie, leur disponibilité et leur aide bien utile, à Michelle pour avoir obtenu les publications qui m'étaient inaccessibles, et à Bernadette pour sa gentillesse et tout le soin que tu as apporté à notre matériel expérimental.

Un immense merci au fantastique et unique Pascal ! Je me suis régalé de notre complicité, de nos pitreries, et de nos gentilles fourberies respectives. Merci pour ta jovialité, ton humour décapant et ta simplicité. Tu m'as formidablement bien formé au métier de vaguemestre. Grâce à toi, mon éventuelle reconversion est assurée ! Parmi tant d'autres, je sais que ton rêve le plus fou est que je devienne ton directeur… alors je te dis, peut-être, à dans « quelques » années ! Tu me manqueras d'ici là…

Toute ma considération sportive à la fine équipe des coureurs des mardis, jeudis et/ou vendredis (Véro, Gaëlle, Sandrine, Kei, Pierre P, Pierre A, JVB, Michel ; sans oublier les anciens du labo Stéphane et Pat, et les autres collègues du campus) et surtout à notre fraternel – et presque national – saint « Bernard ». Merci à toi de m'avoir fait découvrir cette magnifique région et de nous avoir guidés inlassablement, dans la joie et la bonne humeur, sous le soleil, sous la pluie et dans la gadoue ! J'espère que vous continuerez longtemps à entretenir cet esprit athlétique qui m'est cher. Les forêts et les côtes de Gif me manqueront cruellement mais j'espère bien revenir de temps en temps pour le cross du CNRS ! Une pensée également pour les coureurs du PSUC d'Orsay et nos séances de piste du mercredi midi. Malgré mon assiduité limitée, ce fut un véritable exutoire !

Merci à Patrick et Jean-Yves de l'atelier mécanique pour leur disponibilité et leur savoir faire, si précieux pour un électrophysiologiste. Merci également à Jean-Paul, Alain et Lydie pour leurs services respectifs.

Merci, bien évidemment, à tous les membres de l'Animalerie, et en particulier à Morgane, pour s'être occupé de mes petits ratons et de leurs parents.

Une petite pensée pour mon Caliméro en plastique qui a stocké, fidèlement et sans rechigner, un nombre incalculable d'encas savoureux. Merci à toi de m'avoir sustenté à peu près toutes les trois heures, et ce chaque jour de ma thèse ! C'est décidé, je t'emmène en postdoc !

Je remercie chaleureusement toute l'équipe d'enseignants de Physiologie Animale de l'Université d'Orsay, et notre « chef » Hervé Daniel pour sa confiance. Merci à mes collègues de choc, Heather, Laurence et Micaela (je crois qu'on ne peut pas être mieux entouré !) ainsi qu'à mes acolytes monitrices, Samia, Cathy, Caroline, Gaëlle et à l'irremplaçable et regrettée Karine. Grâce à vous, les TPs du mercredi et du vendredi ont toujours été un plaisir. Je penserai bien à vous l'année prochaine. Karine, je n'oublierai jamais notre « fabrication » de sujets d'examen… et tout le reste !

Une pensée très personnelle va à mon prof d'anglais particulier, Patricia. Merci pour ton soutien et pour tout ce que tu m'as apporté depuis la fameuse « promenade du mercredi soir ». Je n'oublierai, jamais, la crampe (du mollet) et les moustiques de Gif ! See you (very soon) in London… xxx

Je remercie évidement tous mes amis : mes amis de toujours, mes amis sportifs, mes amis de fac avec qui nous avons essuyé des semaines d'examens interminables depuis le DEUG (dire qu'on s'apprête presque tous à devenir docteur !), mes amis de cité-U, et mes amis VIP avec qui je partage le même sort de thésard. Merci à tous pour ce que vous êtes et pour tous les moments passés ensemble. Des moments qui font du bien et qui ont compté énormément pendant ma thèse.

Enfin, un merci du fond du cœur à mes parents et mes grands-parents pour leur aide, leur soutien, leur écoute, et pour m'avoir toujours encouragé dans mes choix. Merci à toute la petite famille, en espérant qu'elle s'agrandisse encore. Merci à vous tous pour m'avoir offert ces moments uniques qui nous rappellent qui on est et d'où l'on vient.

SOMMAIRE

Liste des figures 15

INTRODUCTION 18

Préambule 18

I. Les réseaux neuronaux corticaux 21

1) Le cortex visuel : de la rétine à la colonne corticale 21

1.1) Le système visuel 21

1.2) Organisation laminaire du cortex visuel 23

1.3) La colonne corticale : l'exemple type de réseau neuronal intégré 24

1.3.1) Une boucle de traitement récurrente 24

1.3.2) Connexions excitatrices intrinsèques 26

1.3.3) Connexions inhibitrices intrinsèques 28

1.3.4) Influences extrinsèques 29

1.4) Dominance oculaire et période critique 29

2) Les réseaux corticaux excitateurs 30

2.1) Les cellules étoilées ou « spiny stellate cell » 31

2.2) Diversité des neurones pyramidaux 31

2.3) Les neurones pyramidaux de couche 5 33

3) Les réseaux corticaux inhibiteurs 34

3.1) Généralités 34

3.2) Interneurones ciblant le soma et les dendrites proximales dendrites 37

3.3) Interneurones ciblant l'axone 39

3.4) Interneurones ciblant les dendrites 39

3.5) Couplage électrique 39

3.6) Pourquoi une telle diversité ? 41

4) Plasticité des réseaux corticaux 42

4.1) Pendant la période postnatale 42

4.2) Chez l'adulte 42

5) Chez l'homme : vers un « connectome » humain ? 45

6) Réseaux neuronaux et pathologies 46

II. Le système sérotoninergique 49

1) Généralités 50

1.1) Métabolisme 50

1.2) Organisation anatomique 50

1.2.1) Noyaux du raphé 50

1.2.2) Projections sérotoninergiques 51

1.3) Physiologie des noyaux du raphé 53

1.3.1) Activité rythmique et rôle fonctionnel 53

1.3.2) Mécanismes de régulation 54

1.3.3) La « transmission » sérotoninergique 55

2) Le transporteur membranaire de sérotonine 56

2.1. Caractéristiques anatomofonctionnelles 56

2.2. Aspects génétiques, polymorphisme fonctionnel et physiopathologie 57

2.3. Une cible thérapeutique multiple 59

3) Sérotonine et développement des systèmes sensoriels 59

4) La superfamille des récepteurs sérotoninergiques 62

4.1) Classification 62

4.2) Plusieurs niveaux de diversité 63

4.3) Distribution des récepteurs sérotoninergiques 66

4.3.1) Récepteurs 5-HT_{1A} 66

4.3.2) Récepteurs 5-HT_{2A} 66

4.3.2) Récepteurs 5-HT_3 67

4.3.3) Récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_7 68

4.3.4) Ségrégation morpho-anatomique 69

4.4) Pharmacologie des récepteurs sérotoninergique 69

5) Modulations sérotoninergiques du fonctionnement cortical 69

5.1) Modulation de la transmission synaptique 69

5.2) Modulation de la plasticité synaptique corticale 72

5.2.1) Dans le cortex visuel de rat 72

5.2.2) Chez le chat et dans les autres régions cérébrales 72

5.2.3) Limites expérimentales..... 72

5.3) Modulation des réseaux corticaux..... 73

6) Rôles physiopathologiques multiples des récepteurs sérotoninergiques 74

7) Sérotonine et dépression 76

III. Traitement dendritique de l'information 79

1) Intégration dendritique 79

1.1) Nature des signaux reçus 79

1.1.1) Signaux excitateurs 79

1.1.2) Signaux inhibiteurs..... 80

1.2) Les domaines d'intégration 81

1.2.1) Arborisations distale, apicale et basale..... 81

1.2.2) Compartimentalisation fonctionnelle 81

1.3) Les processus d'intégration..... 83

1.3.1) Atténuation des potentiels synaptiques 83

1.3.1.1) Théorie de câble et dendrite apicale 83

1.3.1.2) Inhibition shuntante 85

1.3.1.3) Canaux ioniques hyperpolarisants 85

1.3.2) Amplification des potentiels synaptiques..... 87

1.3.2.1) Les conductances dendritiques sensibles au potentiel..... 87

1.3.2.2) Potentiels d'action dendritiques locaux..... 88

1.3.2.3) Potentiels d'action somatiques rétropropagés et STDP..... 90

1.3.3) Sommation des entrées synaptiques 94

1.3.3.1) Dépendance à l'espace 94

1.3.3.2) Dépendance au « timing » 96

1.3.3.3) Dépendance au potentiel membranaire 98

1.3.4) Modulation de l'intégration dendritique..... 98

2) Intégration dendritique, computation et cognition 99

2.1) Dendrites : des unités de traitement spécialisés ? 99

2.2) De la dendrite apicale à la cognition ? 101

3) La boucle d'intégration sensorielle 102

IV. La balance excitation-inhibition (E-I) **..... 104**

1) Des épines dendritiques aux réseaux neuronaux..... 104

1.1) A l'échelle moléculaire et synaptique 104

1.2) A l'échelle dendritique..... 105

1.2) A l'échelle de la population neuronale..... 105

1.4) A l'échelle d'un réseau cortical actif 106

2) Importance fonctionnelle de la balance E-I 106

2.1) Dans l'intégration sensorielle..... 106

2.2) Dans les autres processus neuronaux 107

3) Balance E-I et pathologies..... 107

4) Régulation homéostatique de la balance E-I..... 108

4.1) Définition d'un système homéostatique..... 108

4.2) Mise en évidence de la plasticité homéostatique 108

4.3) Régulation homéostatique de la balance E-I dans le cortex visuel 110

MÉTHODE 111

1) Identification des neurones et enregistrements électrophysiologiques..... 111

2) Protocoles de stimulation 112

2.1) Positionnement..... 112

2.2) Protocole pour la détermination la balance E-I..... 113

2.3) Protocole pour l'étude de la régulation homéostatique de la balance E-I..... 113

3) Analyse des réponses synaptiques..... 114

3.1) Paramètres intrinsèques à la technique et au neurone enregistré 114

3.1.1 Le potentiel de jonction 114

3.1.2 La dérive du potentiel de l'électrode 114

3.1.3) La résistance série 115

3.1.4) La relation courant-potentiel (courbe I/V) 117

3.2) Décomposition des réponses composites évoquées 117

3.3) Reconstruction des réponses composites en potentiel et facteur 121

RESULTATS 123

Préambule 123

(i) "Roles of nitric oxide in the homeostatic control of the excitation-inhibition balance in rat visual cortical networks"

(ii) "Involvement of NR2A- or NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage"

(iii) "Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks"

I. Etude des rôles de la sérotonine et des récepteurs 5-HT corticaux dans la modulation de la balance E-I dans le cortex visuel de rat..... 127

1) Position du problème..... 127

2) Résultats 128

2.1) "Serotoninergic Fine-Tuning of the Excitation-Inhibition Balance in Rat Visual Cortical Networks"..... 129

2.2) Rôle modulateur du récepteur 5-HT_4 sur la balance E-I 149

II. Implication du système sérotoninergique dans le contrôle homéostatique de la balance E-I 152

1) Position du problème **152**

2) Résultats **153**

III. Rôle de l'interaction Nck2/PAK3 dans la modulation de la transmission synaptique excitatrice **157**

1) Position du problème **157**

2/ Résultats/Conclusions **158**

"p21-activated kinase 3 regulates AMPA receptor-dependent synaptic transmission through interaction with the Nck2/Grb4 Adaptor" 161

IV. Rôle de la sous-unité a1 de la v-H^+ATPase dans la libération de neurotransmetteur : hypothèse du pore de fusion protéique **181**

1) Position du problème **181**

2) Résultats/Conclusions **184**

DISCUSSION & Perspectives **189**

I. Discussion Générale **189**

1) Interactions entre systèmes neuromodulateurs **189**

2) Déplétion sérotoninergique et connectivité corticale **190**

3) Sérotonine et intégration dendritique **191**

3.1) Modulation sérotoninergique de l'inhibition silencieuse 191

3.2) Sérotonine et potentiels d'action rétropropagés 192

4) Sérotonine, « set-point », et contrôle homéostatique de la balance E/I **193**

5) Topographie sérotoninergique corticale **195**

6) Modulations fines et « set point » physiologique **196**

II. Perspectives **198**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **203**

ANNEXES **240**

Liste des figures

INTRODUCTION

Préambule

Figure 1. De Cajal à Markram

Première partie : *Les réseaux neuronaux corticaux*

Figure 2. Le cortex visuel primaire et le système visuel

Figure 3. La colonne corticale à travers différentes représentations

Figure 4. Connexions intrinsèques de la colonne corticale

Figure 5. Projections corticales des systèmes cholinergique et sérotoninergique

Figure 6. Diversité morphologique des neurones pyramidaux du néocortex

Figure 7. Diversité des interneurones GABAergiques corticaux

Figure 8. Morphologie anatomique des principaux interneurones corticaux

Figure 9. Couplage électrique et réseaux d'interneurones corticaux

Figure 10. Exemples de plasticité des réseaux neuronaux

Figure 11. Vers un connectome humain

Figure 12. Différents niveaux d'altérations pathologiques des réseaux neuronaux

Deuxième partie : *Le système sérotoninergique*

Figure 13. Organisation anatomiques des voies sérotoninergiques ascendantes

Figure 14. Mise en place du système sérotoninergique dans le cortex visuel

Figure 15. Fonctionnement du transporteur sérotoninergique « SERT »

Figure 16. Polymorphisme fonctionnel associé au transporteur SERT

Figure 17. Sérotonine et développement des structures sensorielles

Figure 18. Récepteurs 5-HT métabotropiques et signalisation intracellulaire

Figure 19. Architecture des signalisations sérotoninergiques

Figure 20. Implications des récepteurs sérotoninergiques dans les fonctions comportementales et physiologiques, et dans la pathophysiologie

Figure 21. Autorécepteurs 5-HT_{1A} et SSRIs

Tableau 1. Actions modulatrices des récepteurs sérotoninergiques

Troisième partie : *Traitement dendritique de l'information*

Figure 22. Compartimentation fonctionnelle des neurones pyramidaux

Figure 23. Propriétés de câble et atténuation dendritique des potentiels synaptiques

Figure 24. Principe de l'inhibition shuntante

Figure 25. Potentiels d'action dendritiques locaux et compartimentation

Figure 26. Potentiels d'action rétropropagés et STDP dans les neurones pyramidaux de couche 5

Figure 27. Détecteur de coïncidence et potentiels d'action rétropropagés

Figure 28. Importance de la localisation dans l'intégration dendritique

Figure 29. Importance du « timing » dans l'intégration dendritique

Figure 30. L'intégration dendritique comme boîte à outils computationnelle

Figure 31. La boucle d'intégration corticale

Quatrième partie : *La balance Excitation-Inhibition*

Figure 32. Régulation homéostatique de l'activité des réseaux neuronaux

MÉTHODE

Figure 33. Enregistrement des réponses composites somatiques

Figure 34. Profil de décharge et détermination des résistances série et membranaire du neurone pyramidal de couche 5

Figure 35. Décomposition des réponses composites

Figure 36. Courbes I/V et potentiels d'inversion

Figure 37. Reconstitution de la réponse composite en voltage

RÉSULTATS

Figure 38. 5-HT_4 receptors are expressed in both pyramidal neurons and GABAergic interneurons and their blockade decreases the E-I balance

Figure 39. Protocole expérimental de plasticité homéostatique

Figure 40. Homeostatic potentiation in layer 5 pyramidal neurons depends on the activation of local cortical networks

Figure 41. Serotonin depletion disrupts the E-I balance homeostatic regulation

Figure 42. The 5-HT_{1A}R is required for the E-I balance homeostatic regulation

Figure 43. Structure et fonction de la v-H^+ATPase et motif tétra-cystéine

Figure 44. Dual recording of GABAergic currents in neuronal culture

Figure 45. Blocakde of the H^+-pump function of the vATPase has no fast effect on synaptic transmission

Figure 46. Photoinactivation of the a1-I subunit in the presynaptic neuron decreases action potentiel-evoked synaptic transmission

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Figure 47. Ségrégation morpho-fonctionnelle des récepteurs sérotoninergiques

Figure 48. La technologie channelrhodopsin-2 dans le cortex

Figure 49. Quadruple *patch clamp* sur tranches corticales

INTRODUCTION

Préambule

Comprendre comment les interactions précises entre les neurones permettent des fonctions cérébrales complexes, diversifiées et harmonieuses telle la perception sensorielle, reste l'une des grandes préoccupations des chercheurs même après un siècle de neurosciences. Différents axes de recherche se sont imposés : la cartographie physique des connexions à la base des réseaux neuronaux, la cartographie fonctionnelle de la propagation des signaux électriques au sein de ces réseaux, les modifications (plasticité) des circuits neuronaux et des signaux qu'ils génèrent et, plus récemment, la visualisation et la manipulation de réseaux neuronaux *in vivo* chez l'animal vigil.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à un axe jusqu'alors peu exploré : la neuromodulation fonctionnelle des réseaux neuronaux.

L'idée même de circuit neuronal remonte aux travaux initiaux de Ramón y Cajal (1852-1934) qui tranchèrent alors avec la théorie réticulariste. Ramón y Cajal suggéra en effet l'existence de circuits neuronaux constitués d'unités cellulaires individuelles (les « neurones ») interagissant par des contacts contigus (Cajal, 1909). Il fut également le premier à prédire, sur des critères morphologiques, le sens de circulation de l'information électrique dans les circuits neuronaux : les dendrites et le soma constituant les sites d'entrées et l'axone véhiculant les signaux de sortie (figure 1a).

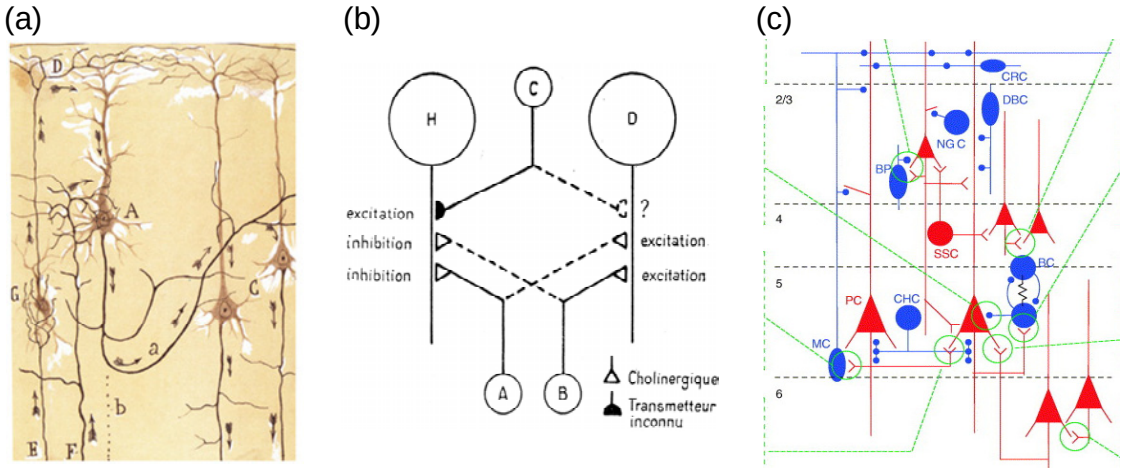


Figure 1. De Cajal à Markram

(**a**) Illustration de Ramon y Cajal décrivant la morphologie neuronale et le sens de circulation de l'« information électrique » (flèches) dans le cortex. (**b**) Représentation schématique d'un réseau de 5 neurones du ganglion abdominal d'Aplysie, proposé par Ladislav Tauc. Y sont figurées les connexions excitatrices et inhibitrices avérées ou supposées entre ces neurones. (**c**) Compilation des données récentes concernant la connectivité entre les neurones excitateurs (bleu) et inhibiteurs (rouge) du néocortex.

Un demi siècle plus tard, les travaux électrophysiologiques de Ladislav Tauc chez le mollusque *Aplysia*, permirent de raffiner le concept de réseau neuronal fonctionnel (figure 1b), avec les premières notions de circuits excitateurs et inhibiteurs (Tauc et Gerschenfeld, 1962). Plus de dix ans après, le groupe de Sidney Brenner fut le premier à décrire l'architecture complète d'un système nerveux central, celui du vers *C. elegans* avec environ 300 neurones (White et al., 1976).

L'arsenal technologique développé depuis (microscopie électronique, sondes fluorescentes et imagerie confocale et biphotonique rapide, enregistrements électrophysiologiques multiples *in vitro* ou *in vivo*, traçage neuronal, imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle) a permis (i) de cartographier précisément des réseaux neuronaux de plus en plus complexes comme c'est le cas pour le cortex cérébral (figure 1c), l'hippocampe ou le cervelet chez le rongeur (pour revue : Silberberg et al., 2005) ou pour le cerveau humain (pour revue : Sporns et al., 2005) et, ces toutes dernières années, (ii) d'en extraire la fonctionnalité sensorielle.

En voici trois exemples :

• Une étude remarquable, récemment publiée dans la revue *Nature*, a révélé que l'activation d'une petite population de neurones corticaux *in vivo* (*i.e.* une soixantaine de neurones dans le cortex somatosensoriel primaire) pouvait soutenir, à elle seule, un comportement d'apprentissage chez la souris (Huber et al., 2008).

• Toujours chez la souris, la brève stimulation d'une seule vibrisse se traduit par l'activation localisée d'une petite assemblée neuronale dans le cortex somatosensoriel primaire (correspondant à la représentation corticale de la vibrisse stimulée), qui se propage ensuite jusqu'au cortex moteur associé aux vibrisses (en une trentaine de millisecondes) par une vague d'excitation d'un plus grand nombre de neurones (Férézou et al., 2007).

• Enfin, d'autres travaux ont caractérisé plus finement le fonctionnement des réseaux corticaux lors des vagues d'activité spontanée, typiquement observées pendant le sommeil, les éveils légers, ou chez l'animal anesthésié. Les auteurs ont pu montrer que pendant ces phases, seuls 10 % de la population neuronale sont actifs dans le cortex moteur ou somatosensoriel, que la fraction de neurones actifs change constamment, et que l'activité électrique au sein de cette fraction n'est pas synchronisée (Kerr et al., 2005).

Intérêt de l'étude de la neuromodulation de la balance excitation-inhibition et objectif de ma thèse.

Les microcircuits neuronaux sont fascinants de part la diversité des fonctions qu'ils génèrent (rythmes autonomes dans la moelle épinière ou le tronc cérébral, cartes d'association dans l'hippocampe, corrections d'erreurs dans le cervelet, perception et processus cognitifs dans le néocortex) et la simplicité contradictoire de leur organisation : une association de neurones excitateurs et inhibiteurs interconnectés de façon récurrente par des synapses dynamiques (*i.e.* capables de modifier leur « poids » respectif), et ceci, des invertébrés aux mammifères supérieurs. Dès lors, comment expliquer l'incroyable étendue des fonctions prises en charge par les réseaux neuronaux spécialisés retrouvés dans les différentes espèces ? La complexification des réseaux est un des éléments de réponse, l'organisation faisant alors la fonction. Mais, et ceci est au centre du problème posé dans ma thèse, la neuromodulation apparaît être un autre déterminant du polymorphisme fonctionnel des réseaux neuronaux (Briggman and Kristan, 2008).

L'étude de la balance entre excitation (E) et inhibition (I) au sein d'un réseau neuronal stéréotypé, constitue alors un bon moyen de saisir les bases fonctionnelles des microcircuits neuronaux (voir en Introduction, la partie I « *Les réseaux neuronaux corticaux* » et la partie III « *Traitement dendritique de l'information* ») et leurs neuromodulations (voir la partie II « *Le système sérotoninergique* »). En effet, il est maintenant évident que la balance E-I a, en tant que grandeur physiologique, un rôle important dans le fonctionnement harmonieux des réseaux neuronaux et dans les grandes fonctions cérébrales (voir la partie IV « *La balance excitation-inhibition* »). D'un point de vue expérimental, la mesure précise de la balance E-I permet d'obtenir, à un instant donné, une « image résultante » du fonctionnement intégré d'un réseau neuronal d'intérêt et d'en déterminer les éventuelles modulations.

C'est pourquoi mon travail de thèse a eu pour principal objectif de caractériser les modulations de la balance E-I corticale par la sérotonine et ses principaux récepteurs, modulations jusqu'alors inexplorées. Ce travail a été réalisé grâce à la combinaison de techniques d'électrophysiologie, de pharmacologie, d'immunohistochimie et de biologie moléculaire sur cellule unique. L'approche électrophysiologique utilisée (*voir la section Méthode*) a notamment permis d'extraire les spécificités de la neuromodulation sérotoninergique, propres aux différents microcircuits excitateurs et inhibiteurs constitutifs du cortex visuel.

I. Les réseaux neuronaux corticaux

1) Le cortex visuel : de la rétine à la colonne corticale

En tant qu'aire sensorielle largement caractérisée d'un point de vue anatomo-fonctionnel et en tant que cible privilégiée des afférences neuromodulatrices, le cortex visuel primaire (figure 2a) a été choisi pour l'étude de la neuromodulation sérotoninergique de la balance E-I, jusqu'alors inexplorée.

1.1) Le système visuel

Les différentes aires sensorielles comptent aujourd'hui parmi les régions corticales les plus énergiquement étudiées. Parmi elles, les aires visuelles, et tout particulièrement le cortex visuel, sont les mieux connues.

Les raisons de cet engouement trouvent certainement leur origine dans l'organisation relativement rigide et directe des projections anatomiques entre la rétine et le cortex. Par ailleurs, l'utilisation de stimuli visuels simples ou complexes chez l'animal vigile a permis de caractériser efficacement les propriétés fonctionnelles des neurones du cortex visuel.

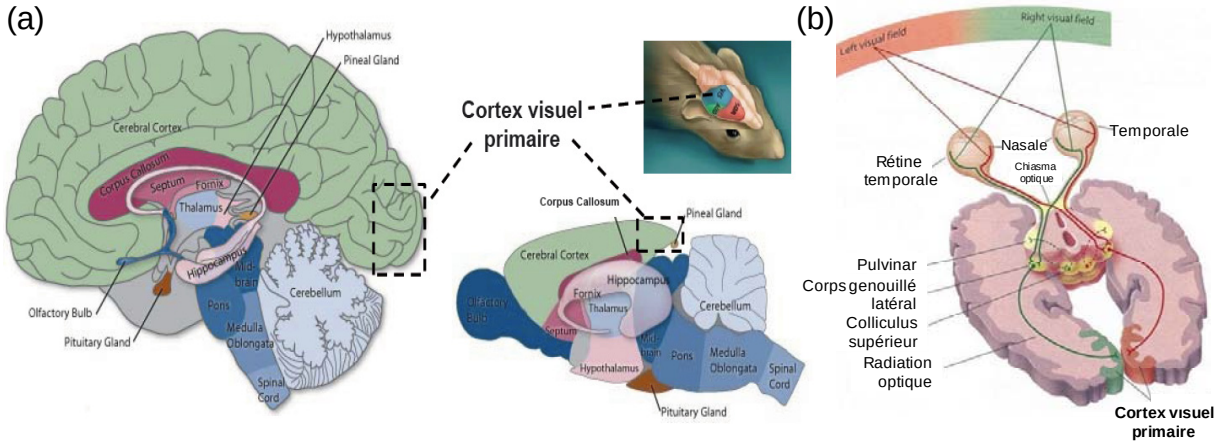


Figure 2. Le cortex visuel primaire et le système visuel

(**a**) Coupe sagittale et localisation des principales structures cérébrales et du cortex visuel primaire chez l'homme et le rongeur.

(**b**) Principales voies visuelles assurant le transit des informations sensorielles reçues par la rétine.

Le codage de l'information visuelle commence dans la rétine par l'activation de photorécepteurs spécifiques traitant le stimulus visuel en termes de forme et de couleur (cônes) ou en termes de luminosité et de mouvement (bâtonnets). Ce message visuel est alors véhiculé par le nerf optique jusqu'à un premier relais thalamique : le corps genouillé latéral

(figure 2b). Finalement, l'information est relayée au niveau du cortex visuel primaire d'où de nombreuses connexions sont établies avec les autres aires visuelles (secondaire, associative) et avec les régions sous-corticales (*e.g.* boucle de rétrocontrôle cortex-thalamus, pour revue : Cudeiro et Sillito, 2006 ; Sillito et al., 2006). Cette voie principale permet un décodage simple des formes, des couleurs et du relief dans un premier temps, puis une intégration cognitive de l'objet (ou de la scène) observé, menant à la perception. Une voie extracorticale impliquant une connexion directe de la rétine avec le colliculus supérieur, permet quant à elle le décodage des mouvements simples et le suivi oculaire des objets.

Tout au long de ces relais, les neurones sont « programmés » pour répondre à des aspects spécifiques du stimulus visuel, en vertu du « pattern » de connexions synaptiques qu'ils reçoivent. Au niveau du cortex visuel primaire, des microcircuits neuronaux spécifiques sont organisés pour fournir différents niveaux de décodage des stimuli : cartes rétinotopiques, bandes de dominance oculaire, cartes de préférence à l'orientation, cartes de préférence à la direction du mouvement (pour revue : Huberman et al., 2008). Ces petites assemblées de neurones répondent préférentiellement à une position particulière du stimulus sur la rétine, à une orientation angulaire donnée du stimulus (*e.g.* une barre noire à 90° par rapport à l'horizon, sur fond blanc), ou à un déplacement spécifique de l'objet (*e.g.* translation verticale d'une barre). Cette notion de microcircuits spécifiques a été confirmée par plusieurs travaux montrant, par exemple, que les neurones codant pour une même orientation du stimulus étaient connectés les uns avec les autres (Weliky et al., 1995 ; Sincich et Blasdel, 2001).

Bien que la description de ces mécanismes complexes ne soit pas réalisée dans cette introduction, il est nécessaire d'en aborder un détail important. En effet, l'essentiel des travaux réalisés sur ces différents modes de décodage – depuis la découverte initiale de Hubel et Wiesel sur les champs récepteurs (Hubel et Wiesel, 1962) – a impliqué des neurones de la couche 4, qui correspond à la principale couche d'entrée des afférences thalamiques dans le cortex (l'organisation laminaire sera abordée dans le prochain paragraphe). Les modalités de ces processus, relativement simples et stéréotypés dans le premier relais cortical, diffèrent et se complexifient au fur et à mesure que l'information est relayée vers les autres couches corticales (Berman et al., 1982 ; Alonso, 2002 ; Hirsch et al., 2002 ; Martinez et al., 2005), avec une spécification laminaire du décodage des stimuli (Martinez et al., 2002 et pour revue : Hirsch et Martinez, 2006a,b). Il est donc essentiel de décrire les propriétés morpho-fonctionnelles des différentes couches corticales afin de comprendre comment les

informations de la couche 4 sont ensuite traitées par la « colonne corticale » qui fourni les signaux de sortie du cortex visuel primaire.

1.2) Organisation laminaire du cortex visuel

La description des différentes couches corticales fut initialement réalisée grâce à différentes techniques de marquage cellulaire dont les principales sont celles de Golgi et de Nissl (Parnavelas et al., 1977a,b). Le cortex visuel de rat est divisé en 6 couches, chaque couche présentant une organisation cellulaire particulière (figure 3b, Peters et Kara, 1985a,b,c) :

• La couche 1, « couche moléculaire » contient essentiellement des projections axoniques horizontales et les arborisations dendrites terminales des neurones pyramidaux des couches inférieures. Quelques petites cellules non pyramidales peuvent s'y trouver. Cette couche est aussi le lieu de passage de nombreuses fibres neuromodulatrices provenant de centres neuromodulateurs sous corticaux.

• La couche 2 « couche granulaire externe » contient surtout des petites cellules pyramidales et des neurones non pyramidaux présentant des dendrites à faible densité d'épines dendritiques.

• La couche 3, « couche pyramidale externe » contient les mêmes petites cellules pyramidales que la couche 2 mais également des neurones pyramidaux de taille intermédiaire présentant des dendrites plus épaisses avec davantage d'épines. Les cellules non pyramidales de cette couche sont petites, avec de courtes dendrites.

• La couche 4, « couche granulaire interne », contient en abondance des neuronaux pyramidaux et non-pyramidaux. Les neurones pyramidaux sont ici de petite ou moyenne taille avec des dendrites relativement fines remontant jusqu'en couche 1. Les cellules non pyramidales présentent, quant à elles, des tailles et morphologies variées.

• La couche 5, « couche pyramidale interne » contient les cellules pyramidales classiques appelées « neurones pyramidaux de couche 5 » dont l'épaisse dendrite apicale remonte en couche 1. Ce sont les cellules les plus grosses du cortex visuel (leur description précise sera effectuée plus tard). Cette couche contient également de petites cellules pyramidales ou non.

• La couche 6, « couche polymorphe » contient une variété de cellules pyramidales plus ou moins grosses ainsi que des cellules non pyramidales.

Cette description brute met en évidence l'hétérogénéité des populations neuronales présentes dans les différentes couches corticales, mais ne révèle pas encore la spécificité fonctionnelle de cette organisation laminaire ni l'existence de microcircuits spécifiques. En particulier, ces travaux mésestiment la grande diversité des cellules « non pyramidales », caractérisées depuis – pour la plupart – comme les interneurones inhibiteurs du cortex. L'apport de la biologie moléculaire, de l'électrophysiologie, des enregistrements de paires ou triplets de neurones et leur reconstruction morphologique a permis, ces dernières années, de dessiner un portrait détaillé, mais non exhaustif, de la connectivité neuronale (excitatrice et inhibitrice) mise en jeu lors de l'activation sensorielle (Thomson et al., 2002 ; Kampa et al., 2006).

1.3) La colonne corticale : l'exemple type de réseau neuronal intégré

1.3.1) Une boucle de traitement récurrente

La colonne corticale (figure 3a, Mountcastle, 1978 et pour revue : Gilbert, 1993 ; Mountcastle, 1997 ; Rockland, 1998) est un niveau d'organisation fondamental du néocortex de mammifère permettant d'orchestrer le fonctionnement d'une assemblée de neurones (entre 100 et 200 neurones chez le primate), nécessaire à la production d'un signal de sortie cortical. Arrangement vertical formé par un ensemble récurent de connexions neuronales spécifiques (et non lié au hasard) entre les différents neurones excitateurs et inhibiteurs des 6 couches corticales (figure 3b), la colonne corticale assure l'intégration des informations thalamiques (en provenance de la rétine, par exemple) et l'émission de signaux de sortie des aires sensorielles primaires (Thomson et Morris, 2002). Chaque colonne correspond alors à une unité fonctionnelle comme c'est le cas, par exemple, pour les colonnes d'orientation. Le fonctionnement de la colonne corticale est assuré par des boucles de projections et de rétroprojections, chaque étage de la boucle (*i.e.* chaque couche) ayant un « pattern » unique d'entrées synaptiques, de connectivité intrinsèque et de sorties, et jouant un rôle unique dans le traitement de l'information sensorielle (figure 3c). Il est intéressant de noter que les différentes aires corticales présentent des stratégies de traitement communes mais avec des mécanismes adaptés aux spécificités des stimuli (Silberberg et al., 2002). De façon surprenante, le diamètre estimé d'une colonne (~30µm) est similaire entre les différentes aires corticales et même entre différentes espèces.

Néanmoins, bien que la circuiterie présentée ci-après soit stéréotypée pour une espèce, une région corticale, et un âge donné, l'existence d'une colonne corticale canonique divise la communauté scientifique (voir la revue de Silberberg et al., 2002 *vs* celle de Douglas et Martin, 2004), notamment si l'on prend en compte les critères de connectivité intrinsèque (*e.g.* diversité des neurones inhibiteurs) ou extrinsèque (*e.g.* diversité des projections thalamiques). Enfin, avant d'établir un état des lieux de sa connectivité intrinsèque, la comparaison de résultats obtenus *in vitro*, *in vivo* et *in silico* montre qu'un effort expérimental substantiel doit encore être fourni avant de parvenir à une réelle compréhension physiologique de la colonne corticale (Sarid et al., 2007 ; voir aussi pour revue Helmstaedter et al., 2007). D'autres travaux récents ont également nuancé la « rigidité » de l'organisation verticale des colonnes corticales, en montrant que le niveau de connectivité entre neurones pyramidaux de couche 5 d'une même colonne ne différait pas de celui observé entre neurones de colonnes voisines (Krieger et al., 2007, étude réalisée dans le cortex somatosensoriel de souris où les microcolonnes corticales sont facilement repérables).

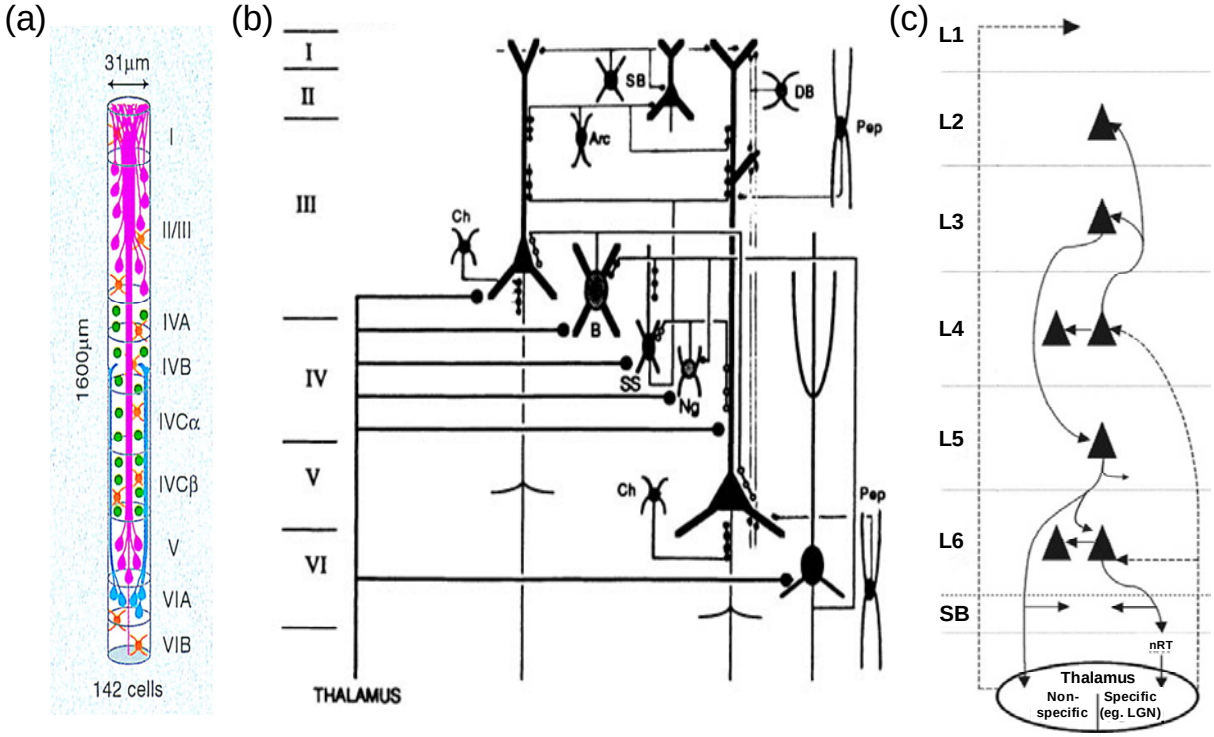


Figure 3. La colonne corticale à travers différentes représentations

(**a**) Vue schématique et dimensions de la colonne corticale chez le primate.

(**b**) Organisation laminaire du cortex montrant la morphologie et les connexions établies entre les neurones pyramidaux et les principaux interneurones.

(**c**) Schéma simplifié de la connectivité neuronale rencontrée dans les différents étages de la colonne corticale (SB : substance blanche).

D'après Jones 2000, PNAS ; Mountcastle 1997, Brain ; Bannister 2005, Neurosci Res.

1.3.2) Connexions excitatrices intrinsèques (*résumé sur la figure 4a*)

Le premier étage de traitement de l'information sensorielle (figure 4a, zone rouge) met en jeu des connexions excitatrices glutamatergiques entre les projections thalamiques (issues du corps genouillé médian) et des cellules excitatrices de la couche 4 appelées « cellules étoilées » ou « spiny stellate cells », qui excitent à leur tour des neurones pyramidaux de cette même couche 4 (Ahmed et al., 1994 ; Stratford et al., 1996 ; Feldmeyer et al., 2002). Ces synapses excitatrices se caractérisent par une adaptation négative (diminution de l'amplitude des réponses postsynaptiques en réponse à un train de potentiel d'action soutenu). La couche 6 est également une couche d'entrée bien qu'elle reçoive une quantité moindre d'afférences thalamiques (Thomson et Bannister, 2003).

L'information est ensuite transmise par les cellules étoilées vers les neurones pyramidaux de la couche 2/3 (deuxième étage de traitement, figure 4a, zone verte) par des synapses à adaptation négative (Anderson et al., 1994). De nombreuses connexions sont établies au niveau de la couche 2/3 (notamment pour amplifier le signal reçu, Feldmeyer et al., 2006) avant que l'information soit transmise aux neurones pyramidaux de couche 5 (troisième étage de traitement, figure 4a, zone bleue) qui réalisent une intégration dendritique complexe de ces différentes entrées (Thomson et Bannister, 2003) et élaborent les principaux signaux de sortie de la colonne corticale. Notons, par ailleurs, que les cellules étoilées de couche 4 peuvent être connectées de façon monosynaptique avec les neurones pyramidaux de couche 5, assurant ainsi un couplage direct entre les signaux d'entrés thalamiques et les signaux de sortie (Feldmeyer et al., 2005).

De façon très intéressante, deux neurones pyramidaux de couche 2/3 connectés entre eux reçoivent des informations d'une même assemblée de neurones de la couche 4, ceci n'étant pas le cas si les deux neurones ne sont pas connectés (Yoshimura et al., 2005). De même, une paire de neurones pyramidaux de couche 5 connectés, a une probabilité très importante de recevoir l'information d'un même neurone de couche 2/3 (et inversement, une paire de neurones pyramidaux de la couche 2/3 a une très faible probabilité de cibler un même neurone pyramidal de couche 5) (Kampa et al., 2006). Ce schéma d'intégration convergente de l'information, à partir de différents sous-circuits de couche 2/3, suggère qu'un ensemble de quelques neurones pyramidaux de couche 5 peut générer un message de sortie associant différents paramètres d'un même stimulus sensoriel.

Depuis la couche 5, l'information est transmise aux neurones pyramidaux de couche 6 (quatrième étage de traitement) et est dirigée en dehors de la colonne stimulée vers des neurones pyramidaux de couche 5 des colonnes adjacentes, vers les régions sous corticales et vers l'hémisphère contralatéral. (Thomson et Bannister, 2003).

Les neurones pyramidaux de couche 6 relayent enfin l'information latéralement vers les autres aires corticales du même hémisphère ou établissent des boucles de rétroprojection excitatrices avec le thalamus (afin d'amplifier les entrées de couche 4) (pour revue : Cudeiro et Sillito, 2006) ou, au sein de la colonne, avec la couche 4 (par des synapses facilitatrices).

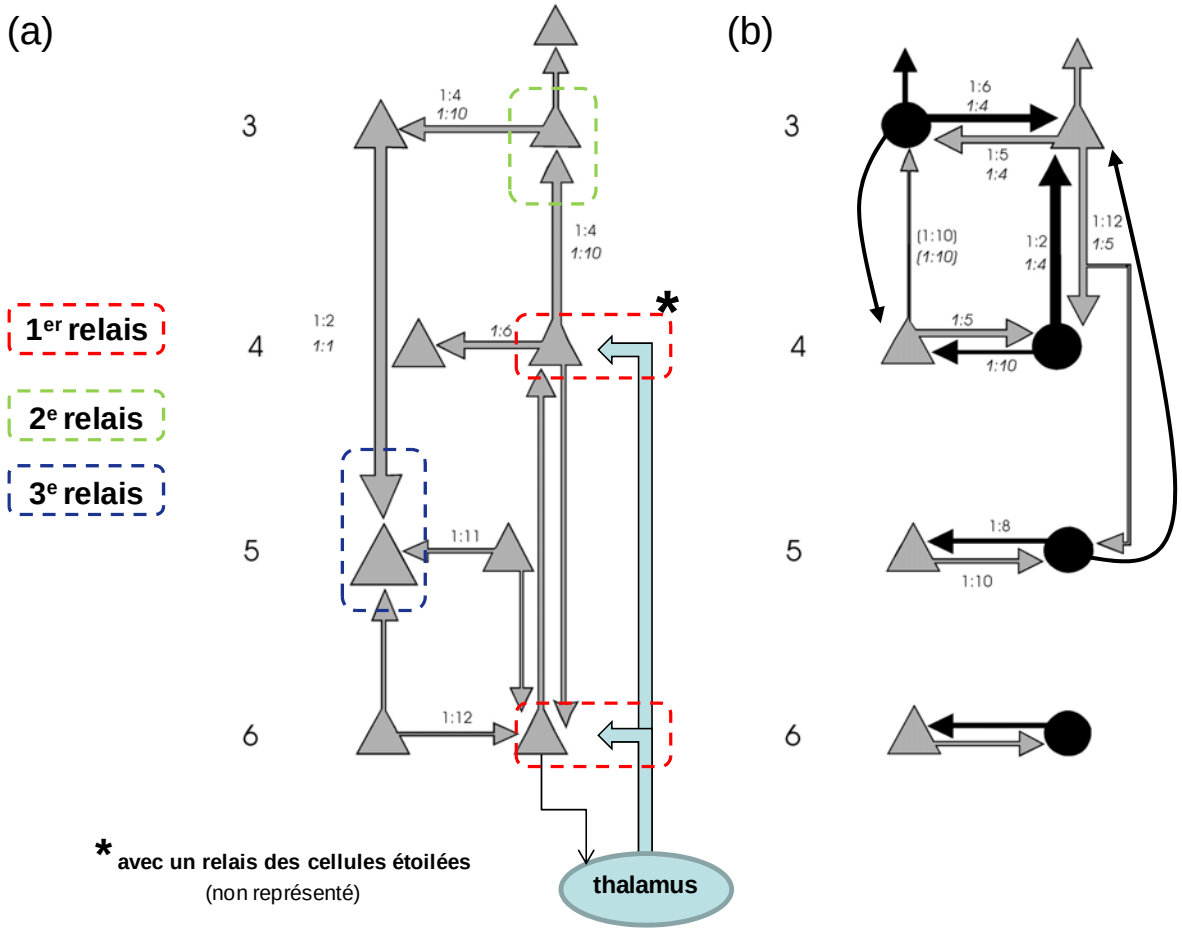


Figure 4. Connexions intrinsèques de la colonne corticale

(**a**) Schéma résumant les connexions entre neurones pyramidaux excitateurs (triangles gris) rencontrés dans les couches 3 à 6. Les cadres de couleurs surlignent les 3 premiers relais du traitement de l'information sensorielle.

(**b**) Principales connexions entre interneurones inhibiteurs (cercles noirs) et neurones pyramidaux. Les flèches courbées représentent les rétroprojections inhibitrices majeures.

Les rapports indiquent la probabilité d'enregistrement pour chaque type de connexion (nombre de connexions enregistrées divisé par le nombre de paires de neurones testés) sur tranches de cortex de rat (plein) et de chat (italique). *Adapté d'après Thomson et Bannister 2003, Cerebral Cortex.*

1.3.3) Connexions inhibitrices intrinsèques (*voir la figure 4b*)

De par leur nature, les connexions inhibitrices ne peuvent être organisées en projections successives comme c'est le cas pour les connexions excitatrices. Néanmoins, la colonne corticale reçoit une vaste gamme d'entrées inhibitrices (de localisations très variées), majoritairement centrées sur le neurone pyramidal de couche 5, qui trouve son origine dans la diversité des interneurones inhibiteurs du néocortex (Xiang et al., 2002). Ce point important fera l'objet d'un chapitre dédié (*voir le chapitre 3 p.34 : « Les réseaux inhibiteurs »*), mais certaines règles générales de connectivité peuvent d'ores et déjà être décrites.

La principale règle est l'établissement d'une inhibition disynaptique rapide pour limiter, de façon spatio-temporelle, la propagation de l'excitation dans la colonne corticale stimulée et les colonnes adjacentes (Porter et al., 2001 ; Tan et al., 2008). Cette vague inhibitrice est principalement assurée par des interneurones GABAergiques inhibiteurs, localisés dans la couche 2/3 et la couche 5, qui sont recrutés par les projections excitatrices issues des neurones pyramidaux de couche 4 et de couche 2/3, respectivement (Dantzker et Callaway, 2000 ; Thomson et Morris, 2002). Les interneurones des couches corticales profondes peuvent aussi être recrutés par les projections excitatrices en provenance des neurones pyramidaux de la couche 6 (West et al., 2006). Ces différentes populations d'interneurones assurent ensuite différents modes d'inhibition : locale, translaminaire (*e.g.* rétroprojections inhibitrices des couches 5 et 2/3 vers les couches 2/3 et 4) et latérale assurant alors l'inhibition des colonnes voisines (Dantzker et Callaway, 2000 ; Thomson et Bannister, 2003 ; Helmstaedter et al., 2008, 2009a). Enfin, une vague d'inhibition directe peut être déclenchée par l'activation monosynaptique, *via* les terminaisons thalamiques, d'interneurones inhibiteurs de couche 4 (Cruikshank, 2007), avant même la genèse des signaux excitateurs.

Pour conclure, la colonne corticale présente une organisation tri-directionnelle associant projections locales, translaminaires (projections « en avant » et rétroprojections) et latérales. Organisation à laquelle une quatrième composante peut être ajoutée, la nature excitatrice ou inhibitrice des synapses mises en jeu. Ainsi, la nature tri-directionnelle de l'inhibition a récemment été confirmée dans le cortex somatosensoriel de rat (Helmstaedter et al., 2009b).

Pour revue sur la circuiterie de la colonne corticale : Bannister, 2005 ; Silberberg et al., 2005 ; Markram, 2008. Pour une description détaillée de la connectivité dans le cortex visuel de rat : Domenici L et al., 1995 ; Thomson et Bannister, 2003.

1.3.4) Influences extrinsèques

Le fonctionnement de la colonne corticale peut être modulé à différents niveaux. Par exemple, la couche 2/3 est un site d'entrée (mais aussi de sortie directe) d'afférences excitatrices provenant des aires sensorielles associatives. L'extrémité distale (située en couche 1) de la dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5 peut aussi recevoir des rétroprojections excitatrices de l'aire visuelle associative (Rockland et Drash, 1996) ou même d'autres aires sensorielles (Cauller et al., 1998). Des projections du thalamus non-spécifiques sont également reçues en couche 1 (Jones, 1975).

Dans un autre registre, les différentes couches de la colonne corticale reçoivent des projections des différents systèmes neuromodulateurs (Gu, 2002) comme, par exemple, les fibres sérotoninergiques provenant du raphé ou les fibres cholinergiques provenant du noyau basal magnocellulaire (figure 5).

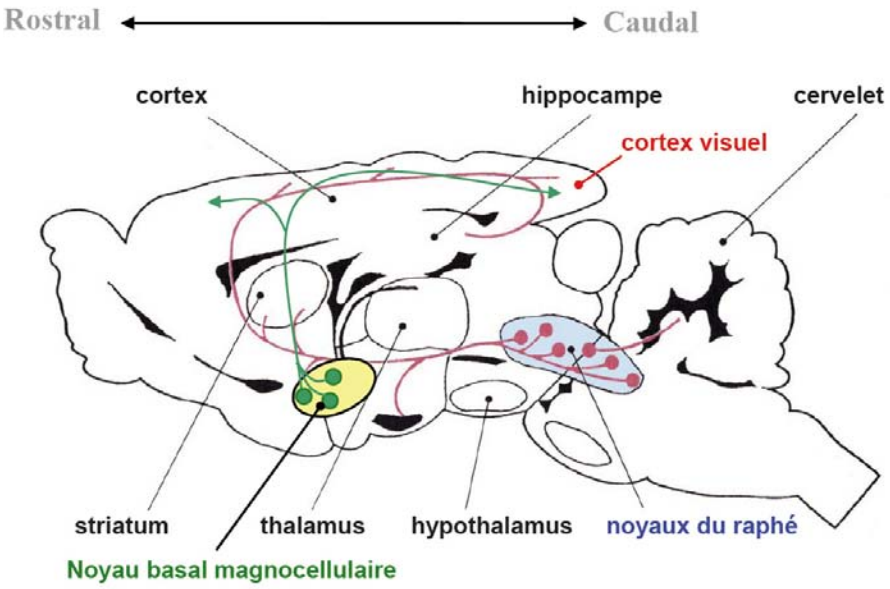


Figure 5. Projections corticales des systèmes cholinergique et sérotoninergique

Les noyaux et les fibres cholinergiques sont représentés en vert. Les noyaux et les fibres sérotoninergiques sont représentés en rouge.

Adapté d'après Bears, Connors et Paradiso, Neurosciences, à la découverte du cerveau – 2e édition. (Ed. Pradel)

1.4) Dominance oculaire et période critique

Hubel et Wiesel ont décrit les colonnes de dominance oculaire au début des années soixante (Hubel et Wiesel, 1962, 1963 et pour revue : Hensch, 2005). En réalisant des enregistrements électrophysiologiques dans le cortex visuel primaire de chat, ils observèrent que les deux yeux activent différemment les mêmes neurones corticaux.

Ainsi, les cellules ayant la même préférence oculaire étaient regroupées ensemble en « colonne » de dominance oculaire. Notons toutefois que le terme « colonne » peut être confus étant donné que la dominance oculaire se traduit expérimentalement par une alternance de bandes claires et foncées à la surface du cortex (les bandes foncées correspondant aux projections issues de l'œil injecté avec un traceur radioactif). Dans le même temps, ils démontrèrent que la formation de ces colonnes était dépendante de l'expérience (Wiesel et Hubel, 1963, 1965). En effet, la fermeture d'un œil pendant la période critique (période postnatale pendant laquelle l'expérience sensorielle fournit au cerveau des informations essentielles au développement normal de la structure cible) entraîne une diminution du nombre de cellules activées par l'œil préalablement fermé, et de la colonne correspondante. Sur la base de données plus récentes, il semble que l'expérience visuelle acquise pendant la période critique permette de raffiner et de renforcer les connexions pré-existantes plutôt que d'en instruire la formation *de novo* (pour revue : Katz et Crowley, 2002). Encore plus récemment, le groupe de Takao Hensch a publié dans la revue *Science* une étude basée sur la dominance oculaire montrant que l'expression de la période critique est contrôlée par un type de circuit inhibiteur spécifique (Fagiolini et al., 2004). Toujours dans la revue *Science*, en 2008, le groupe de Lamberto Maffei révéla que l'administration d'un antidépresseur classique (la fluoxetine) permet, par une action sur l'inhibition corticale, de ré-induire une plasticité de la dominance oculaire et de restaurer une vision normale chez l'animal amblyope adulte (Maya Vetencourt et al., 2008).

Ces quelques exemples, en particulier le dernier, illustrent parfaitement l'extraordinaire complexité des interrelations qui existent entre les réseaux neuronaux interconnectés du cortex visuel, les systèmes inhibiteurs et, enfin, les systèmes neuromodulateurs tel le système sérotoninergique.

C'est pourquoi, avant d'aborder la description du système sérotoninergique, la suite de ce chapitre sera consacrée aux réseaux corticaux excitateurs d'une part et inhibiteurs d'autre part, avant d'en aborder la plasticité et les aspects pathologiques, puis d'élargir sur les connaissances actuelles chez l'homme.

2) Les réseaux corticaux excitateurs

Les neurones excitateurs représentent environ 70 à 80 % des neurones corticaux, parmi lesquelles plus de 90 % sont des cellules pyramidales et moins de 10 % des cellules étoilées (Peters et al., 1985 ; DeFelipe et Farinas, 1992).

2.1) Les cellules étoilées ou « spiny stellate cell »

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules étoilées sont exclusivement localisées dans la couche 4 (figure 6a), principal site d'entrée des projections thalamo-corticales. Elles sont de petite taille et, contrairement aux cellules pyramidales, ne possèdent pas de dendrite apicale (Stratford et al., 1996 ; Bannister 2005). Elles assurent la majorité de la transmission excitatrice intracolonne et latérale en établissant de nombreux contacts synaptiques avec les dendrites apicales des neurones pyramidaux (Okhotin, 2006).

2.2) Diversité des neurones pyramidaux

Les neurones pyramidaux sont présents dans la plupart des structures du cerveau antérieur (cortex, hippocampe, amygdale) mais absents dans le bulbe olfactif, le striatum ou les structures plus profondes du cerveau comme le rhombencéphale, le mésencéphale ou la moelle épinière (Cajal, 1909), ce qui suggère fortement leur implication dans des fonctions cognitives avancées.

Les neurones pyramidaux sont distribués dans les couches 2 à 6 (figure 6a). Ils sont caractérisés par un corps cellulaire de forme pyramidale dont la taille varie selon leur localisation, par des dendrites proximales courtes mais très ramifiées, et par une longue dendrite apicale qui projette le plus souvent verticalement en direction de la couche 1. Ils présentent une organisation laminaire stéréotypée et un « pattern » de connectivité récurrent (*voir le chapitre 1.3.2 p.26*) qui sous-tendent les processus de traitement de l'information dans les cortex sensoriels. Néanmoins, bien que dans un souci de simplification, il soit attrayant de considérer les neurones pyramidaux comme constituant une population homogène, ce n'est pas le cas.

Ramon y Cajal observa déjà, il y a plus d'un siècle, des différences inter-espèces :

« *En los ratones las prolongaciones basilares son cortas y poco ramificadas, en el hombre se hacen mas numerosas, largas y ramificadas*. »

« *Chez la souris, les dendrites basales [des cellules pyramidales] sont courtes avec peu de ramifications, chez l'homme elles [les dendrites basales] sont nombreuses, étendues et fortement ramifiées* ».

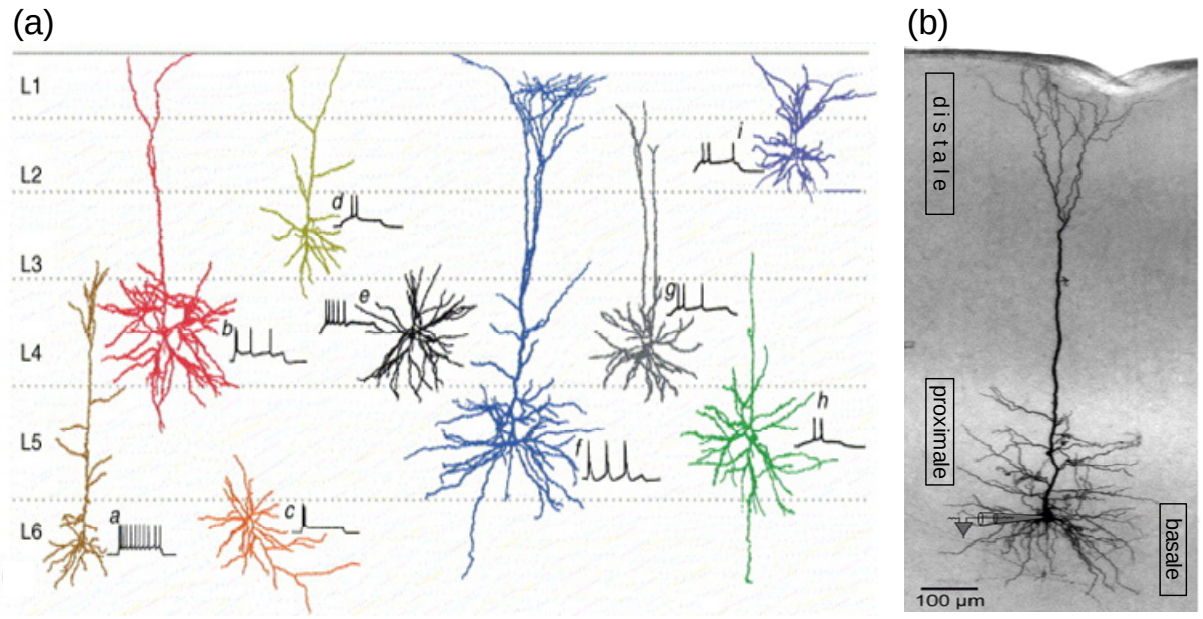


Figure 6. Diversité morphologique des neurones pyramidaux du néocortex

(**a**) Arborisation dendritique des neurones excitateurs des couches 2 à 6 et profils de décharge associés. Notons que les cellules étoilées (noir, "e") ne possèdent pas de dendrite apicale et sont exclusivement présentes en couche 4. *D'après Bannister 2005, Neuroscience research.*

(**b**) Morphologie d'un neurone pyramidal de couche 5 après reconstruction à la biocytin qui illustre les différentes arborisations dendritiques (basale, proximale et distale) ainsi que la dendrite apicale proéminente s'étendant du soma à la couche 2/3. *Adapté d'après Larkum et Nevian 2008, Curr Opin Neurobiol.*

Chez le macaque, les neurones pyramidaux du cortex préfrontal ont 16 fois plus d'épines dendritiques que ceux du cortex visuel primaire (Elston et al., 2001), alors qu'aucune différence de densité des épines n'est observée entre les différents cortex de souris (Ballesteros-Yáñez et al, 2006).

Les neurones pyramidaux peuvent donc présenter des différences morphologiques portant sur la densité de répartition des épines dendritiques, mais aussi des variations de taille, de position de leur corps cellulaire, de ramifications dendritiques ou encore d'arborisation de leur axone, notamment en fonction des couches corticales (figure 6a et pour revue ; Elston 2001 ; Elston 2003 ; Spruston 2008). Ceci reflète une diversification à la fois de leurs entrées synaptiques et de leurs cibles neuronales, aboutissant à la constitution de microcircuits spécifiques aux propriétés de plasticité synaptique distinctes (Silberberg, 2008). D'un point de vue moléculaire, les neurones pyramidaux présentent une grande diversité d'expression et de répartition des canaux ioniques sensibles au potentiel (Lai et Jan, 2006 ; Nusser, 2009) et des récepteurs/récepteur-canaux aux neuromodulateurs, ce qui peut conduire à des différences fonctionnelles marquées. C'est par exemple le cas, dans le cortex auditif de souris, où les

neurones pyramidaux des couches supérieures (2/3 et 4) ont un comportement électrophysiologique différent de ceux des couches profondes (seuil de déclenchement des potentiels d'action notamment, Huggenberger, 2009). D'autres travaux menés dans le cortex préfrontal ont suggéré que les neurones pyramidaux de couche 5 avaient, en fonction de leur activité neuronale de base, un niveau d'activité de la protéine kinase A (PKA) faible ou élevé (Cai, 2002). Ces deux populations de neurones répondant alors de façon différente à l'activation du récepteur 5-HT_4. Les différences fonctionnelles intrinsèques entre neurones pyramidaux pourraient alors expliquer comment ces assemblées de neurones remplissent des fonctions variées et spécifiques dans les différentes couches corticales.

2.3) Les neurones pyramidaux de couche 5

Dans le cortex visuel, les neurones pyramidaux de couche 5 ont une dendrite apicale particulièrement large dans sa partie proximale au soma et qui se termine dans la couche 1 en ramifications « touffues » (Larkman et Mason 1990 ; Mason et Larkman 1990). Leur profil d'excitabilité montre une décharge de potentiels d'action régulière avec adaptation (McCormick et al., 1985). Une deuxième population de neurones pyramidaux de couche 5 est également présente ; elle se caractérise par une dendrite apicale fine qui n'atteint pas la couche 1 (Larkman et Mason 1990) et est impliquée dans les connexions avec le cortex visuel contralatéral (Hallman et al, 1988). Ces deux populations peuvent aussi être distinguées sur des critères moléculaires par les marqueurs neurochimiques qu'elles expriment (Molnár et Cheung, 2006). Dans une classification morphologique quantitative basée sur la reconstruction en trois dimensions d'un grand nombre de cellules et la quantification d'une trentaine de variables (nombre, longueur, diamètre des dendrites basales, apicale et distales, primaires et secondaires, aire du soma…), cinq sous-groupes de neurones pyramidaux de couche 5 ont pu être identifiés, ce qui renforce encore l'idée de leur hétérogénéité (Tsiola et al., 2003).

La dendrite apicale proéminente des neurones pyramidaux de couche 5 traverse l'ensemble des couches corticales et constitue un site d'intégration privilégié de l'ensemble des informations transmises dans la colonne corticale (figure 6b). Les dendrites basales et l'arborisation apicale distale constituent également des sites d'intégration dendritique, mais avec des propriétés différentes (Larkum et al., 2001 ; Nevian et al., 2007 ; Spruston 2008). *Voir également la partie III de cette Introduction : « Traitement dendritique de l'information » (page 79).*

A un échelon supérieur, les neurones pyramidaux de couche 5 peuvent s'organiser localement en réseaux (Frick et al., 2007, 2008 ; Brown et Hestrin, 2009), avec un haut niveau de connectivité (Song et al., 2005), afin de remplir des fonctions particulières. C'est par exemple le cas dans le cortex préfrontal, où une sous population de neurones pyramidaux des couches profondes projetant sur les neurones de couche 5 est sélectivement activée par le récepteur 5-HT_{2A} (Béique et al., 2007). Un couplage électrique entre neurones pyramidaux de couche 5 a également été reporté (Mercer et al., 2006) suggérant d'intéressantes possibilités de synchronisation d'activité au sein d'assemblées de neurones pyramidaux contigus.

Enfin, en combinant plusieurs niveaux d'analyses (cellulaire, synaptique et réseau), le groupe de Goldman-Rakic a très bien mis en évidence l'hétérogénéité des réseaux de neurones pyramidaux de couche 5 dans le cortex préfrontal de furet (Wang et al., 2006). Deux types de réseaux ont été décrits, l'un est semblable au cortex visuel et l'autre, nouvellement caractérisé, est composé de neurones pyramidaux aux dendrites apicales doubles. Chacun de ces réseaux présente des propriétés morphologiques, de transmission synaptique, de plasticité et de connectivité qui lui sont propres. Dans le même ordre d'idée, un type donné de neurone pyramidal de couche 5 (à large tronc dendritique par exemple) peut présenter des variations morphologiques et fonctionnelles entre deux cortex sensoriels : visuel et somatosensoriel (Groh A et al., 2009). Ce résultat récent suggère l'existence d'un certain niveau de spécialisation des neurones pyramidaux de couche 5, en fonction de la nature du stimulus à traiter, et pourrait expliquer pourquoi des microcircuits relativement stéréotypés dans leur structure (*i.e.* colonne corticale) peuvent traiter une large variété de stimuli sensoriels.

3) Les réseaux corticaux inhibiteurs

3.1) Généralités

Les interneurones GABAergiques forment la principale source d'inhibition dans le néocortex *via* la libération de leur neurotransmetteur spécifique le GABA (acide gamma aminobutyrique) et l'activation des récepteurs $GABA_A$ associés à une conductance entrante d'ions chlorures (le GABA peut également ouvrir des conductances potassiques sortantes *via* l'activation du récepteur métabotropique $GABA_B$). Notons toutefois que le GABA est excitateur dans le cerveau immature en raison d'un potentiel d'inversion des ions chlorures différent (Ben-Ari et al., 1989 ; Zhang et al., 1991 ; et pour revue : Ben-Ari, 2002 ; Blaesse et al., 2009). C'est également le cas, chez l'adulte, au niveau de synapses axo-axoniques particulières entre interneurones et neurones pyramidaux de couche 2/3 (Szabadics, 2006).

Ceci en raison de l'absence du cotransporteur K^+/Cl^- de type 2 dans le segment initial de l'axone (entrainant alors un potentiel d'inversion des ions chlorures dépolarisé par rapport au potentiel de repos des cellules pyramidales). Un mécanisme similaire de dépolarisation GABAergique a été reporté, au niveau dendritique cette fois, dans un type particulier d'interneurone rétinien (Gavrikov et al., 2006).

Bien que ne constituant qu'une faible fraction des neurones corticaux (15 à 30 % de la population neuronale) et établissant un nombre réduit de synapses (10 à 15 % du nombre total de synapses) (Peters et Kara, 1985 ; Ren et al., 1992 ; Beaulieu, 1993 ; DeFelipe et al., 2002a,b), les interneurones inhibiteurs ont des fonctions variées et cruciales dans le système nerveux central, que ce soit lors de la mise en place des réseaux neuronaux (Hensch et Stryker, 2004 et pour revue : Akerman et Cline, 2007) ou bien chez l'adulte (Ge et al., 2006 et pour revue : McBain et Fisahn, 2001 ; Ge et al., 2007) ; fonctions qui vont bien au-delà du simple fait de pourvoir à l'hyperpolarisation des cellules. L'inhibition GABAergique est enfin essentielle dans la plasticité du cortex visuel lors de la période critique (Kirkwood et Bear, 1995 ; Hensch et al., 1998 ; Huang et al., 1999 ; Jiang et al., 2005 ; et pour revue : Hensch, 2005) et dans la synchronisation rythmique de l'activité des réseaux corticaux (Wang et Buzsaki, 1996 ; Berger et al., 2006 et pour revue : Freund, 2003 ; Bartos et al., 2007).

L'incroyable richesse fonctionnelle des interneurones GABAergiques ne trouve pas son origine dans leur nombre, mais plutôt dans leur diversité (Gupta et al., 2000 ; Markram et al., 2004). Les nombreuses classifications tentées ces dernières années (DeFelipe, 1997 ; Cauli et al., 1997 ; Cauli et al., 2000 ; McBain et Fisahn, 2001 ; Kawaguchi et Kondo, 2002 ; Markram et al., 2004 ; Flames et Marin, 2005) ont en effet abouti à la description d'une douzaine de types d'interneurones corticaux (dont les principaux sont répertoriés sur la figure 7a, *voir aussi la figure 3B p.25*). De ces classifications ont émergé les principes de leur diversité : les interneurones corticaux représentent des groupes de cellules hétérogènes pouvant être classés en fonction de leur origine développementale, de leur morphologie (orientations et ramifications de l'arbre dendritique et de l'axone, figure 7a), de leur activité électrophysiologique (« regular spiking », « irregular spiking », « fast-spinking », « stuttering » et « bursting », figure 7b), de leurs cibles synaptiques, et en fonction de l'expression de marqueurs neurochimiques (neuropeptides et/ou protéines liant le calcium cytosolique ; voir notamment les travaux de Gonchar et Burkhalter (1997, 2003) dans le cortex visuel).

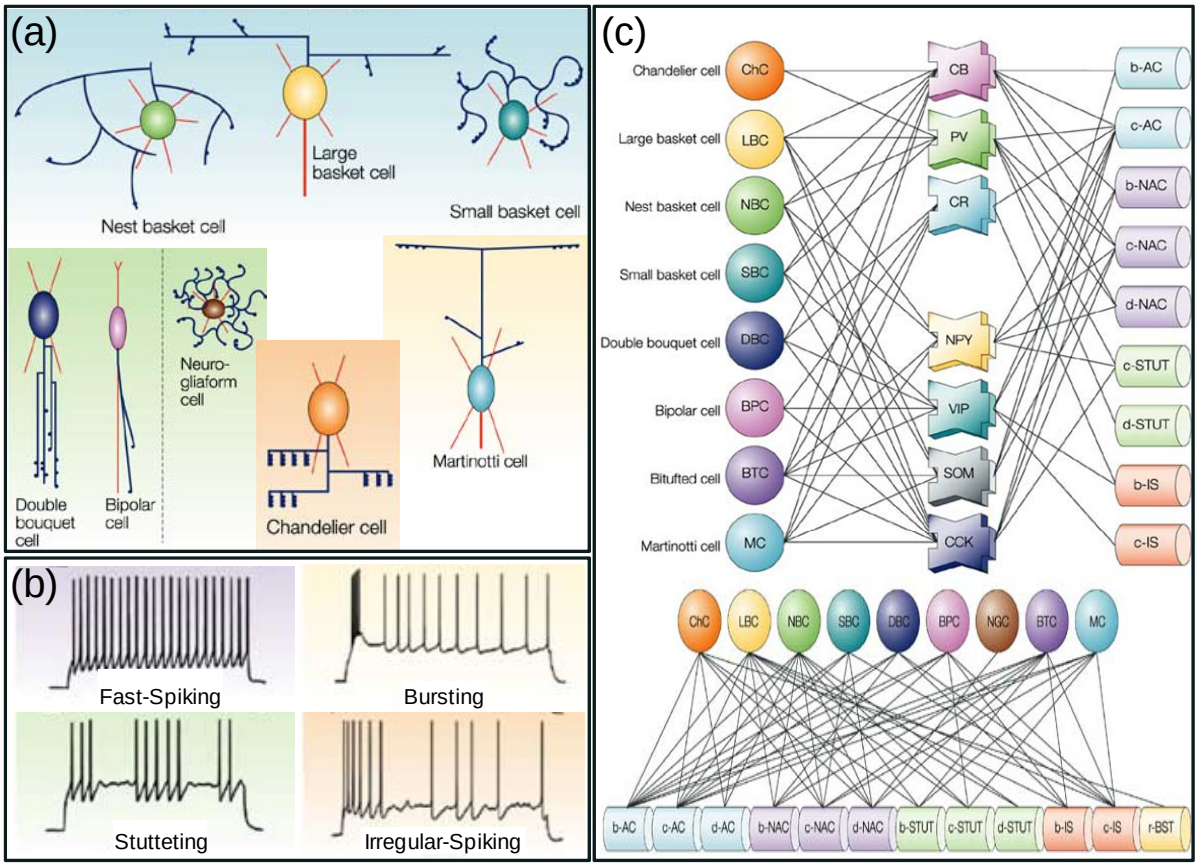


Figure 7. Diversité des interneurones GABAergiques corticaux
(**a**) Principaux types morphofonctionnels : ciblant le soma et les dendrites proximales (fonds bleu et jaune), les dendrites (fonds vert et jaune) et l'axone (fond orange). Les dendrites des interneurones sont dessinées en orange et leur axone en bleu.
(**b**) Principaux profils électrophysiologiques des interneurones. Chaque profil peut être subdivisé sur des critères temporels (délai entre le début de la réponse et le saut dépolarisant) ou d'adaptation de la fréquence de décharge (lors d'une stimulation continue).
(**c**) Illustration de la combinatoire possible entre les différents critères de diversité répertoriés (cercle : morphologie, pièce de puzzle : marqueur biochimique, cylindre : profil de décharge).
Adapté d'après Markram et al. 2004, Nature Rev Neurosci.

Malheureusement, l'ensemble de ces critères de classification devient rapidement confus dans la mesure où un type morphologique donné peut présenter certains critères électrophysiologiques ou biochimiques, et en exclure tout autant. De même, deux interneurones au profil de décharge similaire peuvent présenter différentes associations de caractéristiques morphologiques et biochimiques (Markram et al., 2004). Ainsi, cette mosaïque de critères tend davantage à générer une combinatoire immense, plutôt qu'à dégager une classification claire (figure 7c).

Ceci n'empêche toutefois pas les interneurones de partager quelques caractéristiques communes :

(i) ils n'ont pas ou peu d'épines dendritiques et reçoivent à la fois des synapses excitatrices et inhibitrices sur leur soma, (Douglas et Martin, 2004) ; (ii) ils forment des circuits inhibiteurs locaux (leurs axones s'arborisant dans la colonne corticale et non dans des régions distantes) (Letinic et al., 2002) ; (iii) ils sont hautement interconnectés (Thomson et Bannister, 2002) ; et (iv) ils sont capables de cibler des domaines spécifiques des neurones pyramidaux tels le soma, les dendrites basales ou apicales ou l'axone (DeFelipe, 1997 ; Markram et al., 2004).

Cette dernière propriété, corolaire de la grande diversité des arborisations axoniques, peut être reliée à l'expression spécifique de différentes sous-unités constitutives des récepteurs GABA dans les différentes régions des neurones pyramidaux (Cherubini et Conti, 2001). De façon très intéressante, cette observation permet d'expliquer comment la diversité des interneurones inhibiteurs est à l'origine d'un contrôle précis des différents étages de traitement de l'information sensorielle (*i.e.* de la colonne corticale), et en particulier de l'activité des neurones pyramidaux de couche 5 (*voir la figure 22b p.82*). C'est pourquoi, je vais maintenant présenter les principaux types d'interneurones en terme de spécialisation fonctionnelle, et non au travers de l'ensemble des critères de diversité énoncés ci-dessus, en précisant leurs cibles et leurs rôles au sein de la colonne corticale précédemment décrite.

3.2) Interneurones ciblant le soma et les dendrites proximales

Les cellules en panier (« basket cells ») qui représentent environ 50 % des interneurones et qui sont retrouvées dans toutes les couches corticales (couche 1 exceptée) possèdent des morphologies très différentes (figure 7a et figure 8). Les plus nombreuses sont de grandes cellules avec de longs axones, les autres sont des cellules de très petite taille avec de courtes arborisations dendritiques et de courtes ramifications axonales (Gupta et al., 2000 et pour revue : Markram et al., 2004). Ces deux types de cellules en panier innervent préférentiellement le soma et les dendrites proximales des neurones pyramidaux des différentes couches et en particulier ceux de couche 5 (Somogyi et al., 1998). La principale fonction de ces interneurones est la synchronisation de l'activité neuronale en ondes rythmiques (pour revue : Freund et Katona, 2007) de type gamma (*i.e.* 30 à 100 Hz, Cobb et al., 1995 ; Tarczy-Hornoch et al., 1998, Doischer et al., 2008) ou thêta (*i.e.* 4-7 Hz, Hartwich et al., 2009). Du point de vue de l'intégration des signaux, ils contrôlent le gain (modulation de l'amplitude de la réponse neuronale pour un stimulus donné) et par conséquent la fréquence de décharge du neurone cible (Buhl et al., 1995 ; Miles et al., 1996 ; Wang et al., 2002).

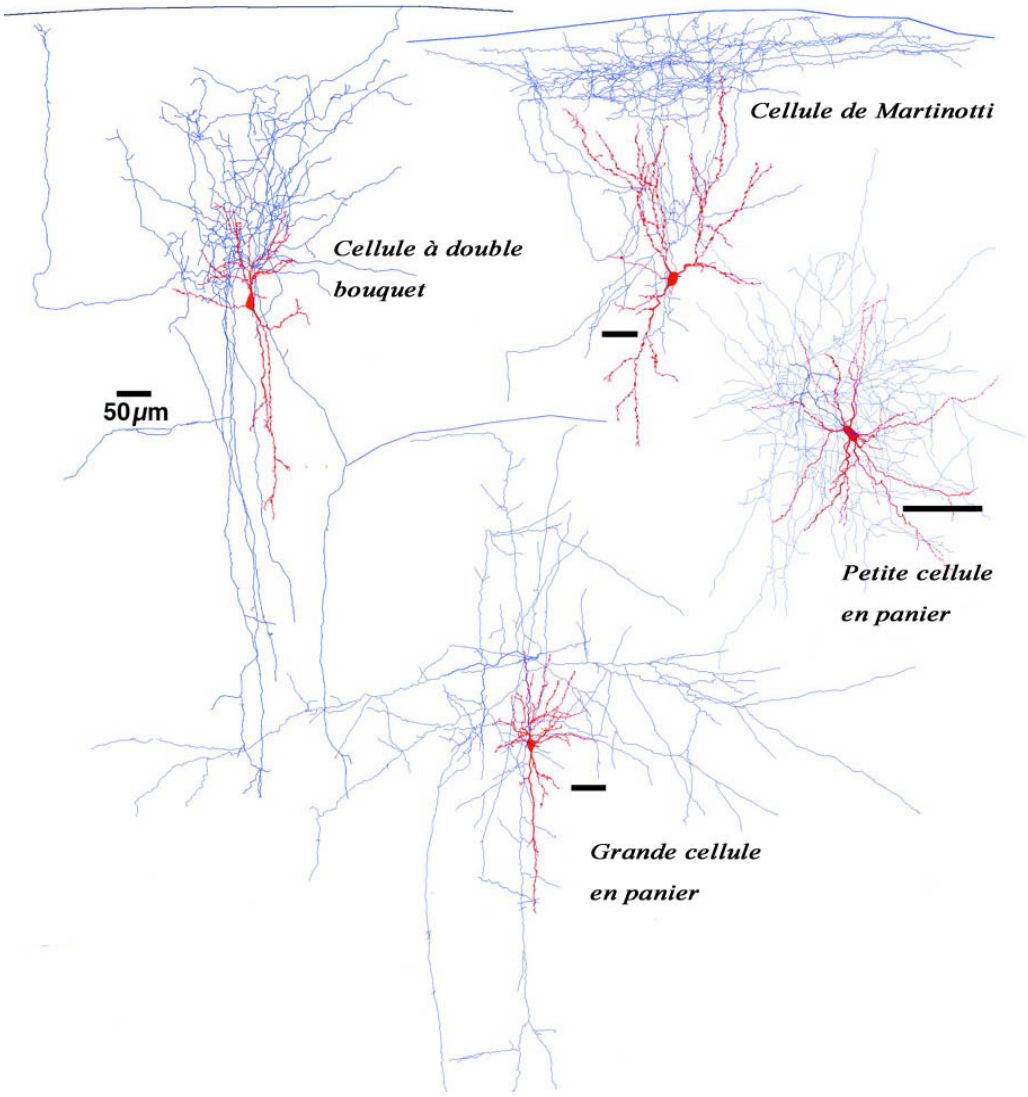


Figure 8. Morphologie anatomique des principaux interneurones corticaux

Les arborisations dendritique et axonale sont respectivement représentées en rouge et bleu. *Modifié d'après Gupta et al. 2000, Science.*

Les cellules de Martinotti (« Martinotti cells », figure 7a et figure 8) – petits neurones multipolaires ou bipolaires qui sont définis par une arborisation axonique proximale horizontale et distale ascendante (jusqu'en couche 1 notamment) – ciblent également le soma et les dendrites proximales (Kawaguchi Y et Kubota, 1997 ; Wang Y et al., 2004). Les cellules de Martinotti sont pour la plupart situées dans les couches profondes (elles représentent environ 50 % des interneurones de la couche 6) bien que certaines aient été répertoriées en couche 2/3.

3.3) Interneurones ciblant l'axone

Les cellules en chandelier, ou « chandelier cell » (figure 7a), se caractérisent par un axone court et extrêmement ramifié autour de son soma (avec une grande densité de boutons présynaptiques). Bien que présent en faible quantité dans les couches 2 à 6, ce type d'interneurone est considéré comme le plus puissant. En effet, ces interneurones ciblent, *via* leurs ramifications axonales courtes, le segment initial de l'axone des neurones pyramidaux et ont par conséquent une position préférentielle dans le contrôle de l'édition des signaux de sortie, ainsi que dans la synchronisation de ces signaux (Zhu et al., 2004 ; Szabadics, 2006).

3.4) Interneurones ciblant les dendrites

Les interneurones « neurogliaform » (ou cellules en toile d'araignée, très minoritaires, qui sont caractérisées par des arbres dendritiques très petits et très denses ainsi que par des ramifications axonales), les cellules à double bouquet (situées au niveau des couches 2 à 4 uniquement et possédant des axones collatéraux ascendants et descendants, figure 7a et 8), les cellules bipolaires (de morphologie similaire aux cellules à double bouquet mais présentent dans toutes les couches) et les cellules de Martinotti des couches profondes (*via* la longue ramification ascendante de leur axone, Wang Y et al., 2004), ciblent toutes les quatre, la dendrite apicale des neurones pyramidaux à différents niveaux (du plus proximal aux plus distal, pour revue : Markram et al., 2004). Grâce à leurs projections spécifiques, ces différents interneurones peuvent modifier efficacement les processus d'intégration des entrées synaptiques (pour revue : Cottam et al., 2009) notamment par la filtration des entrées excitatrices par un mécanisme d'inhibition shuntante (Tamas et al., 2000 ; Xiang et al., 2002 ; Monier et al., 2003 ; *et voir le paragraphe 1.3.1.2 p.85: « Inhibition shuntante »*). Enfin, des expériences électrophysiologiques récentes ont clairement montré que l'activation des cellules de Martinotti dans une colonne corticale (par un neurone pyramidal de couche 5) permet d'inhiber l'arborisation dendritique apicale distale (en couche 1) d'un neurone pyramidal de couche 5 adjacent (Silberberg et Markram, 2007). Ce type d'interneurone assure ainsi une boucle de rétrocontrôle inhibiteur puissant.

3.5) Couplage électrique

Comme c'est le cas pour les neurones pyramidaux, les interneurones corticaux présentent des propriétés de couplage électrique. Ces synapses électriques (formées par des jonctions

communicantes de type « connexon », figure 9a et pour revue : Cruikshank et al., 2005) semblent beaucoup plus répandues dans les réseaux inhibiteurs que dans les réseaux excitateurs et s'établissent préférentiellement entre interneurones de même type (Galarreta et Hestrin, 1999, 2001a ; Gibson et al., 1999 ; Chu et al., 2003) mais aussi entre sous-types différents (Caputi et al., 2009). Depuis leur découverte chez les mammifères (Bennett, 1997), de nombreuses synapses électriques ont été identifiées dans toutes les couches corticales (Galarreta et Hestrin, 2001b). Jusqu'à cinq types de microcircuits d'interneurones, couplés électriquement et ciblant les neurones pyramidaux de couche 5, ont été décrits dans la colonne corticale (figure 9b et pour revue : Hestrin et Galarreta, 2005).

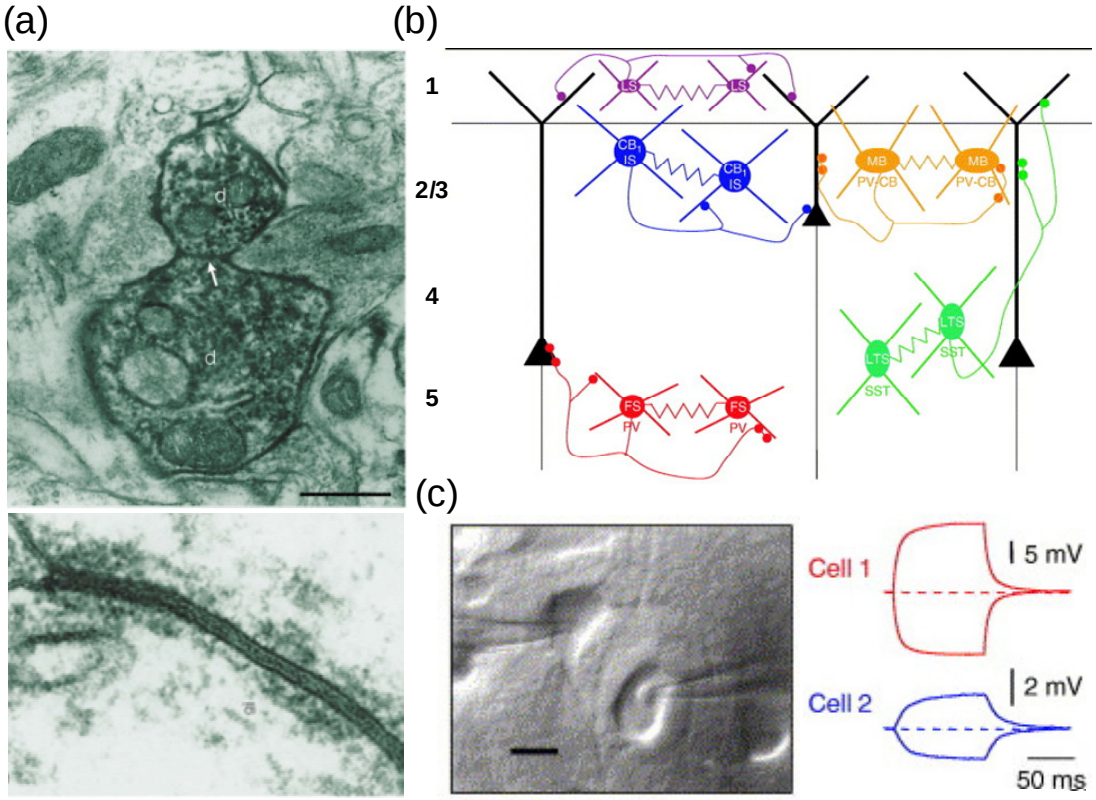


Figure 9. Couplage électrique et réseaux d'interneurones corticaux

(**a**) *Haut* : photographie en microscopie électronique montrant une jonction communicante de type "gap junction" entre deux dendrites (d) de cellules en panier de la couche 4 du cortex moteur primaire adulte de primate (x 25 000). *Bas* : observation à plus fort grossissement d'une synapse électrique (x 180 000, épaisseur de la jonction ~ 3nm).

(**b**) Représentation schématique des réseaux d'interneurones couplés électriquement et de leurs cibles postsynaptiques sur les neurones pyramidaux du cortex.

(**c**) *Gauche* : Image en microscopie optique infrarouge illustrant l'enregistrement en patch clamp d'une paire d'interneurones "fast spiking" couplés électriquement (barre d'échelle : 10 µm). *Droite* : l'injection d'un courant positif ou négatif dans la cellule 1 provoque une dépolarisation ou une hyperpolarisation synchrone dans la 2e cellule.

Adapté d'après Galaretta et Hestrin 2001, Nat Rev Neurosci et Hestrin et Galarreta 2005, TINS.

Le couplage électrique peut se faire en de nombreux points de l'arborisation dendritique des interneurones (proximale ou distale), formant ainsi des réseaux de connexons denses qui s'étendent sur différentes colonnes corticales (Fukuda et al., 2007) et permettent la synchronisation efficace de l'activité de ces différents microcircuits inhibiteurs (figure 9c et Tamas et al., 2000 ; Szabadics et al., 2001 ; Bartos et al., 2002 ; Blatow et al., 2003 ; Fanselow et al., 2008 ; et pour revue : Bennett et Zukin, 2004). Notons enfin que les astrocytes peuvent également être couplés électriquement (Fróes et al., 1999) et former des réseaux interconnectés dans les cortex sensoriels (Houades et al., 2008).

3.6) Pourquoi une telle diversité ?

De façon générale, des résultats obtenus sur tranches corticales de souris supportent l'idée d'un rôle majeur de l'inhibition, dans l'intégration somatodendritique réalisée par les neurones pyramidaux de couche 5 (Neubauer et Berger, 2008). La diversité morpho-fonctionnelle des interneurones inhibiteurs peut donc être essentielle pour adapter l'inhibition somatodendritique (mais aussi axonale) à la complexité des stimuli, en fournissant une gamme de sensibilité étendue et une dynamique spatiotemporelle à large spectre (Silberberg, 2008). C'est par exemple le cas chez le chat, *in vivo*, où le recrutement d'une inhibition disynaptique, adaptée au stimulus visuel, est essentiel à l'établissement de la préférence à l'orientation des neurones du cortex visuel primaire (Marino et al., 2005).

Le cortex aurait alors le « choix » dans le type d'inhibition à recruter en fonction du type de stimulus et de l'architecture des signaux excitateurs générés lors des différentes étapes de l'intégration sensorielle (Gabernet et al., 2005), renforçant ainsi l'efficacité de l'intégration (Pouille et Scanziani, 2001). Dans ce sens, des travaux électrophysiologiques récents ont montré que plusieurs sous-types d'interneurones corticaux (*e.g.* cellule en panier, cellule bipolaire, cellule de Martinotti) pouvaient être différemment recrutés par des afférences excitatrices distinctes (*i.e.* originaires de couches corticales différentes, Xu et Callaway, 2009). *In vivo*, le recrutement d'une inhibition corticale particulière (interneurones « fast-spiking ») permettrait de discriminer les différents paramètres d'un stimulus sensoriel multiple (*e.g.* stimulation de plusieurs vibrisses chez la souris, Hirata et Castro-Alamancos, 2008). Encore plus récemment, des travaux publiés dans la revue *Nature* (Murayama et al., 2009) ont démontré le rôle clé de microcircuits inhibiteurs spécifiques (*i.e.* cellules de Martinotti) dans l'encodage de l'information sensorielle par les neurones pyramidaux de couche 5 *in vivo*.

La diversité des interneurones corticaux permettrait *in fine* d'appliquer, au bon moment et au bon endroit, la bonne quantité d'inhibition avec le bon « timing », afin de contrôler le plus finement possible (avec seulement 16 % de synapses inhibitrices sur un neurone pyramidal, Markram et al., 2004) l'excitabilité des réseaux neuronaux excitateurs. Dans ce but, un échelon supplémentaire de régulation de l'activité des interneurones peut être mis en place, grâce notamment aux actions multiples des neuromodulateurs et aux différences de sensibilité de chaque type d'interneurone à ces derniers (Freund et Katona, 2007).

4) Plasticité des réseaux corticaux

4.1) Pendant la période postnatale

Du développement embryonnaire à l'adulte, en passant par la période critique, les réseaux corticaux et leurs principaux éléments constitutifs subissent des modifications morpho-fonctionelles marquées, qui dépendent notamment de l'expérience sensorielle. C'est par exemple le cas des neurones pyramidaux du cortex visuel qui établissent des connexions synaptiques de plus en plus distantes (par rapport à leur soma) au cours du développement postnatal (Dalva et Katz, 1994). Au contraire, la privation sensorielle pendant la période critique entraîne une réduction de la longueur des axones des neurones pyramidaux de couche 2/3, et du nombre de leurs ramifications (Bruno et al., 2009). Plus précisément, l'élimination de certaine vibrisses chez la souris, entraîne une diminution des ramifications axonales vers les colonnes corticales « déprimées » (*i.e.* représentation corticale des vibrisses éliminées) et une augmentation des ramifications vers les colonnes « non déprimées » (Broser et al., 2008), révélant ainsi de puissants mécanismes de compensation fonctionnelle.

La mise en place des colonnes de préférence oculaire lors de la période critique (détaillée précédemment) est un des meilleurs exemples de plasticité fonctionnelle des réseaux neuronaux du cortex visuel (figure 10a), que ce soit chez l'animal ou chez l'Homme (Lewis et Maurer, 2005). La privation visuelle entraîne une reconfiguration des réseaux excitateurs et inhibiteurs dans la couche 4 du cortex visuel de l'hémisphère « déprimé » (Maffei et al., 2004), avec une augmentation de l'efficacité des connexions excitatrices entre cellules étoilées et une augmentation ou une diminution (dépendante du type d'interneurone), de l'efficacité des connexions inhibitrices. Les capacités d'intégration des stimuli visuels par les neurones des aires multi-intégratives sont également affectées (baisse de l'efficacité à discriminer des stimuli distincts) par la privation visuelle (Carriere et al., 2007).

Par ailleurs, et dans la continuité de ce qui a été exposé dans le chapitre précédent, il est intéressant de noter l'existence d'une plasticité du nombre de récepteurs $GABA_A$, spécifique des régions somatique et dendritique proximale, et jouant un rôle critique dans la mise en place de la période critique (Katagiri et al. 2007).

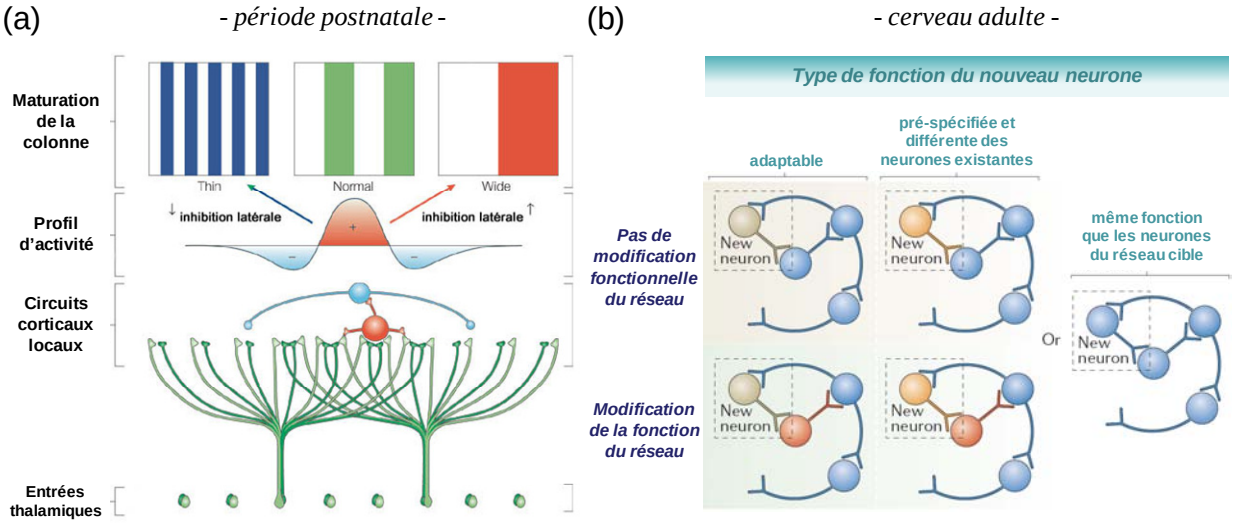


Figure 10. Exemples de plasticité des réseaux neuronaux

(**a**) Illustration de l'influence de l'activité d'un réseau neuronal simplifié à l'extrême, sur la maturation des colonnes de dominance oculaire du cortex visuel primaire. Les projections thalamo-corticales (vertes) activent des microcircuits excitateurs (rouge) et inhibiteurs (bleu) interconnectés. Le fonctionnement coordonné de ces derniers lors de la période postnatale, assure la mise en place de colonnes de dominance oculaire distinctes et stéréotypées (centre, « normal »). Une diminution (gauche) ou une augmentation (droite) de l'activité des réseaux inhibiteurs a ici une conséquence directe sur la largeur des colonnes de dominance (plus fine ou plus large, respectivement). *Adapté d'après Hensch 2005, Nat Rev Neurosci.*

(**b**) Rôles possibles de la neurogenèse dans la maintenance et la plasticité fonctionnelle des réseaux neuronaux adultes. Le neurone néosynthétisé (cadre pointillé) peut avoir divers devenirs au sein du réseau neuronal (bleu) où il s'insert, avec (rouge) ou sans (pas de changement de couleur) modification de la fonction du réseau cible. *Adapté d'après Lledo et al. 2006, Nat Rev Neurosci.*

Les réseaux neuronaux à la base des cartes de sélectivité à l'orientation et à la direction connaissent aussi une période de grande plasticité, légèrement plus précoce que celle des colonnes de dominance oculaire (Fagiolini et Hensch, 2000 ; Fagiolini et al., 2003). En fin de période critique, l'activité corticale rythmique delta (caractéristique du sommeil à ondes lentes et mettant en jeu des réseaux cortico-thalamiques bouclés, Stériade et al., 1993) est aussi assujettie à des phénomènes de plasticité dépendants de l'expérience, observés au niveau du cortex visuel (Miyamoto et al., 2003).

Enfin, des modifications d'activité de réseaux spécifiquement interconnectés entre différentes aires auditives ont également été reportées après une période de privation auditive (*i.e.* ablation de la cochlée) (Hishida et al., 2007). Ceci montre que de tels processus de remodelage, dépendant de l'expérience sensorielle, ne sont pas restreints au cortex visuel.

4.2) Chez l'adulte

Contrairement aux connaissances acquises au niveau cellulaire (voir par exemple la publication récente du groupe de Mark Hübener, sur la modulation du nombre d'épines dendritiques des neurones pyramidaux de couche 5 par l'expérience visuelle, Hofer et al., 2009), la plasticité cérébrale chez l'individu adulte reste peu décrite à l'échelle des réseaux neuronaux. En voici quelques exemples.

L'entrainement à reconnaitre un objet spécifique (comme un objet orienté de façon particulière) se traduit par une augmentation spécifique des signaux générés par les réseaux neuronaux du cortex visuel primaire lors de la présentation de l'objet, en comparaison aux signaux générés avant l'entrainement (Furmanski et al., 2004 ; Maertens et Pollmann, 2005). Par ailleurs, des lésions corticale ou rétinienne chez l'adulte entraînent une reconfiguration locales des circuits excitateurs et inhibiteurs dans le cortex visuel (Eysel et al., 1999 ; Arckens et al., 2000). Des reconfigurations fonctionnelles des réseaux inhibiteurs du cortex visuel sont également observées chez l'animal adulte amblyope, dans certaines conditions expérimentales. Elles tendent à restaurer une acuité visuelle normale (Sale et al., 2007 ; Maya Vetencourt et al., 2008).

En dehors du cortex visuel, il a été montré récemment chez l'homme adulte que l'entrainement intense à un instrument de musique entrainait des changements structurels au niveau des réseaux neuronaux des cortex auditif et moteur (Hyde et al., 2009). Dans certaines conditions pathologiques, telle l'ischémie cérébrale, le cerveau adulte présenterait également d'étonnantes possibilités de remaniement de ses circuits corticaux et sous-corticaux afin de préserver les signaux de sortie des structures atteintes (Di Filippo et al., 2008). De tels événements de réorganisation fonctionnelle des réseaux neuronaux ont déjà été reportés chez l'homme au niveau du cortex prémoteur (O'Shea et al., 2007). Par ailleurs, une sur-activation du cortex préfrontal chez la personne âgée au détriment des autres aires corticales déclinantes, constitue une autre évidence de la capacité d'adaptation des réseaux neuronaux au sein du cerveau adulte (Park et Reuter-Lorenz, 2009).

Enfin, la neurogenèse chez l'adulte aurait différents rôles fonctionnels dans la « maintenance » et la plasticité des réseaux neuronaux existants (figure 10b). En effet, les neurones nouvellement synthétisés pourraient s'intégrer à un réseau préexistant avec une fonction non définie à la base mais adaptable au réseau de destination, ou avec une fonction prédéfinie et spécifique du réseau cible. Ils pourraient également remplacer une cellule mourante avec une fonction identique à cette dernière (Lledo et al., 2006).

5) Chez l'homme : vers un « connectome » humain ?

La généralisation des connaissances acquises à partir des différents modèles expérimentaux (rongeurs, chats, primates) au cerveau humain est une question essentielle, que ce soit dans un but purement fondamental ou appliqué. Bien que l'anatomie du cerveau humain ait été largement étudiée aux niveaux macroscopique (*e.g.* description des lobes cérébraux) et microscopique, peu de choses sont connues du point de vue des réseaux neuronaux (« pattern » de connectivité, densité des connexions, carte des projections laminaires...). Avec environ 10^{11} neurones établissant environ 10^{15} connexions (dont approximativement 10^{10} neurones et 10^{13} connexions pour le seul cortex) (Murre et Sturdy, 1995), il parait impossible d'établir une cartographie complète des connexions à l'échelle du neurone individuel. L'essor de l'imagerie fonctionnelle et de la bioinformatique a cependant permis de grandes avancées. Des premières cartes de connectivité structurelle ont été établies à partir de l'étude des interactions entre plusieurs centaines de microrégions cérébrales (Hagmann et al., 2008), faisant apparaître des nœuds de connectivité et des « voies » de projections cortico-corticales privilégiées (figure 11a). En parallèle de ces cartes structurelles, ont émergé des cartes fonctionnelles (Bassett et al., 2006) qui confirment l'existence de microcircuits organisés en noyaux (actif à l'état de repos ou bien lorsque une tâche est effectuée), dispersés dans les différentes régions cérébrales, et interconnectés les uns avec les autres (figure 11b). Ces cartes nous ont appris, par exemple, que les réseaux neuronaux fonctionnels s'organisent localement chez l'enfant et tendent vers une organisation plus distribuée chez l'adulte (*i.e.* établissement de connexions de plus en plus distantes avec intégration de nouveaux réseaux, Fair et al., 2009). Chez l'animal vigil, des changements de la connectivité fonctionnelle entre groupes de neurones semblent avoir lieu lors d'un comportement d'orientation spatiale (Fujisawa et al., 2008 ; Haider et McCormick, 2009). Enfin, l'établissement d'un « connectome » humain permettrait enfin de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de lésions cérébrales locales, sur les régions cérébrales non touchées par la lésion, et d'en prévoir les éventuelles compensations fonctionnelles (Sporns et al., 2005).

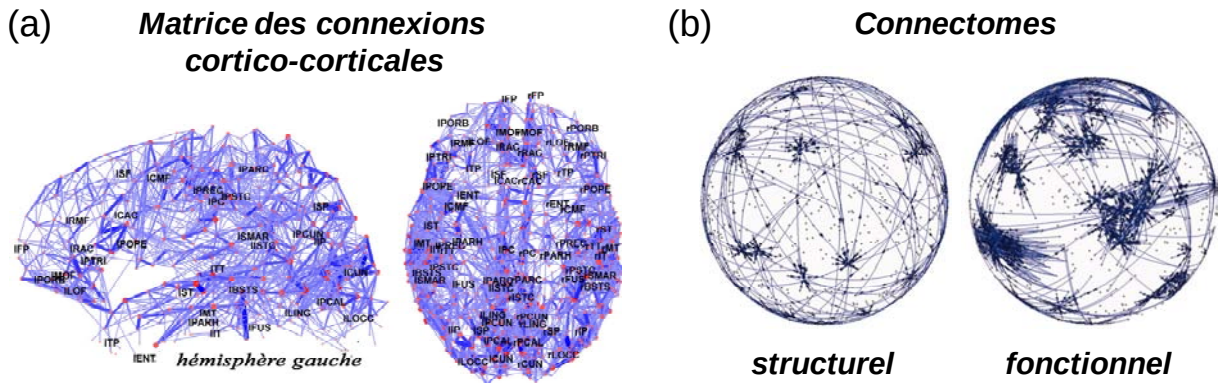


Figure 11. Vers un connectome humain

(**a**) Connectivité corticale structurelle chez l'individu adulte. 66 régions anatomiques subdivisées en 998 régions d'intérêts ont été analysées, au repos, par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (fMRI). Les nœuds de connectivité sont représentés en rouge et les voies de connexion sont représentées en violet, l'épaisseur du trait étant proportionnelle au poids de ces dernières. (**b**) Relation entre la connectivité structurelle (à gauche) et fonctionnelle (à droite) des réseaux cérébraux obtenue dans un régime d'activité spontané. Cette représentation sphérique du connectome humain entrevoit l'existence de réseaux locaux et indépendants dispersés (appelés « small-world ») et interconnectés par un maillage de connexions plus étendues.

D'après Sporns et Honney 2006, PNAS & Hagman et al. 2008, Plos Biol.

6) Réseaux neuronaux et pathologies

Comme nous venons de le voir, le cerveau est organisé anatomiquement et fonctionnellement en réseaux neuronaux hautement interconnectés, et selon différents niveaux hiérarchiques (des systèmes sensoriels vers les aires associatives en passant par les aires sensorielles primaires et secondaires). Par conséquent, la perception d'un stimulus et l'élaboration d'une réponse motrice et/ou cognitive nécessitent le fonctionnement coordonné dans le temps et dans l'espace (et souvent synchronisé) d'un certain nombre de neurones interconnectés (Férézou, 2008). Il apparaît donc logique qu'une infime perturbation d'un élément du réseau, même à l'échelle subcellulaire (*e.g.* altération de la morphologie des épines dendritiques des neurones pyramidaux), puisse conduire à un dysfonctionnement plus large du fonctionnement cérébral et à l'émergence d'une physiopathologie (He et al., 2007). C'est par exemple le cas dans le retard mental (ou syndrome du « X-fragile »), où de sévères altérations de la morphologie normale des épines dendritiques entraînent de graves troubles cognitifs (figure 12a et Purpura, 1974). Une réduction drastique du nombre de ces épines est aussi observée dans le cortex préfrontal (en couche 3) des individus schizophrènes (figure 12b et Garey et al., 1998 ; Kolluri et al., 2005) ainsi que dans des territoires sensoriels (*e.g.* cortex auditif, Sweet et al., 2009). De façon très intéressante, une diminution de la synthèse de GABA par un type

d'interneurone spécifique (cellules en chandelier exprimant la parvalbumine) a aussi été observée chez l'individu schizophrène (figure 12c, Lewis et al., 2000 et pour revue : Gonzalez-Burgos et Lewis, 2008 ; Lewis et al., 2008). Ceci entraînerait une diminution de l'inhibition du segment initial de l'axone des neurones pyramidaux et altérerait leur fonctionnement cortical synchronisé en ondes gamma, nécessaire à de nombreux processus corticaux comme la mémoire de travail (Goldman-Rakic, 1995 ; Lewis et al., 2005). A une échelle plus large, une étude menée sur 200 individus schizophrènes (Bassett et al., 2008) a révélé une « déhiérarchisation » de la connectivité fonctionnelle des réseaux corticaux (*voir le chapitre précédent et la figure 11 p.46*) avec, en particulier, une diminution d'activité des noyaux de connectivité préfrontaux. Une perte, ou une diminution, des cellules en chandelier a aussi été mise en cause dans les attaques épileptiques (DeFelipe, 1999). De façon plus générale, l'inhibition corticale apparaît légèrement diminuée dans un modèle murin d'une forme juvénile d'épilepsie, obtenue par mutation (initialement caractérisée chez l'Homme) de la sous-unité gamma2 des récepteurs $GABA_A$ (Tan HO et al., 2007). Dans ce sens, une dérégulation des réseaux inhibiteurs interconnectés par des synapses chimiques ou électriques est au cœur de l'hypothèse GABAergique de l'épilepsie (pour revue : Cossart et al., 2005).

Dans la maladie d'Alzheimer, la dégradation de réseaux neuronaux excitateurs par l'accumulation des dépôts amyloïdes pourrait être compensée par la régulation homéostatique de l'excitabilité de réseaux excitateurs « sains », interconnectés avec les réseaux de neurones altérés (Small, 2007). Ceci pourrait ainsi contribuer à des mécanismes de compensation fonctionnelle qui restaureraient une activité corticale normale.

Des anomalies dans le nombre, l'espacement et la structure propre des colonnes corticales ont été reportées chez les individus souffrant du syndrome de Rett (Casanova et al., 2003) ou d'autisme (Casanova et al., 2002). Dans le même ordre d'idée, l'exposition prénatale à l'acide valproïque (connu pour ses effets tératogènes dans l'autisme) provoque une réduction de la connectivité entre les neurones pyramidaux de couche 5 (Rinaldi et al., 2007).

Enfin, le niveau d'activité basale de certains réseaux neuronaux des centres émotionnels (*e.g.* dans le cortex cingulé antérieur) peut être anormalement élevé, ou anormalement bas, chez les individus dépressifs, comparé aux individus sains (Greicius et al., 2007 ; Cullen et al., 2009 et pour revue sur la « circuiterie » de la dépression : Price et Drevets, 2009). Ceci pourrait contribuer à expliquer la nature soutenue des manifestations psychiques (*e.g.* omniprésence de la culpabilité ou de tristesse) de cette pathologie sérotoninergique.

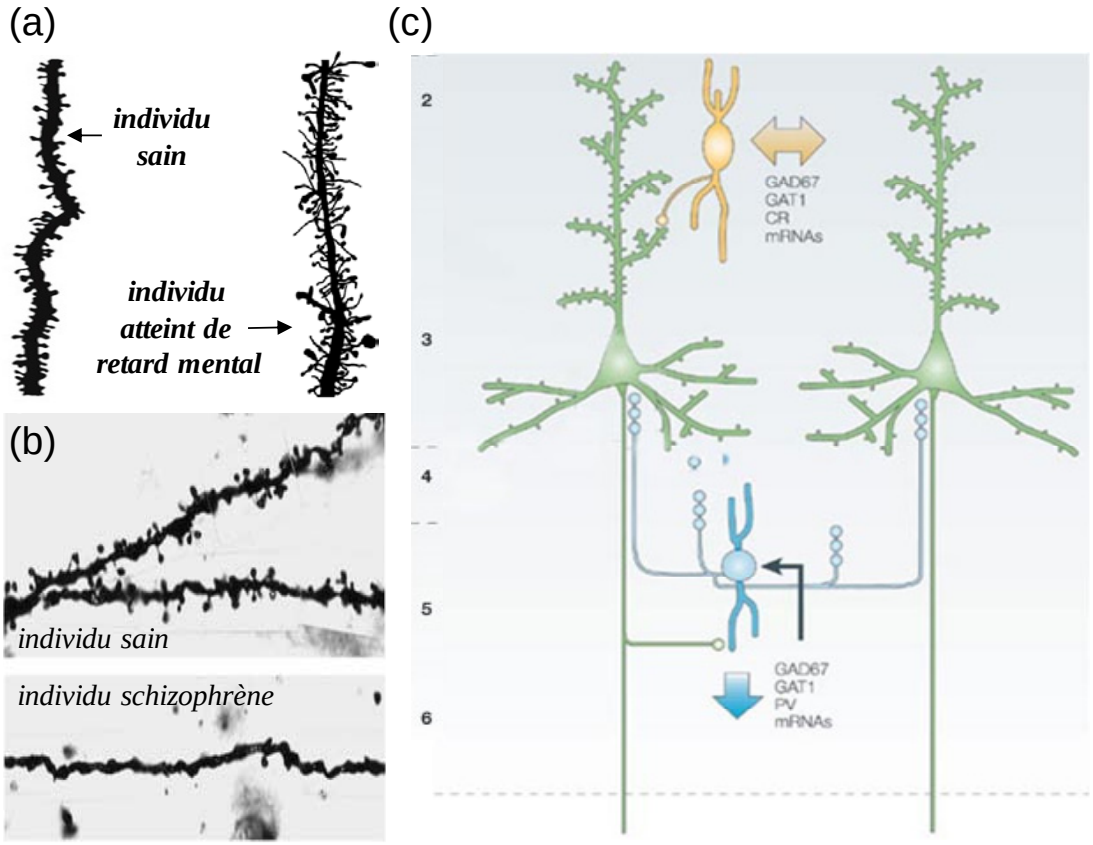


Figure 12. Différents niveaux d'altérations pathologiques des réseaux neuronaux

(**a**) Morphologie des épines dendritiques du cortex moteur d'individus sain (répartition homogène d'épines ayant des cous relativement courts et des têtes rondes) et atteint de retard mental (organisation anarchique, cous allongés et parfois sans têtes, têtes disproportionnées). Marquages réalisés par la technique de Golgi. Adapté d'*après Purpura 1974, Science.*

(**b**) Diminution drastique du nombre d'épine dendritique sur les neurones du cortex préfrontal d'un individu schizophrène. *Adapté d'après Lewis et González-Burgos 2008, Neuropsychopharmaco.*

(**c**) Illustration de l'hypothèse GABAergique de la schizophrénie. Une diminution de l'expression et/ou de l'activité des interneurones GABAergiques de type chandelier (bleu) entraîne une moindre inhibition du segment initial des neurones pyramidaux (vert) et perturberait leur fonctionnement synchrone. *Adapté d'après Lewis et al. 2008, Nature Rev Neurosci.*

II. Le système sérotoninergique

Parmi les neurotransmetteurs du système nerveux central, la sérotonine (5-Hydroxytryptamine ou 5-HT) joue un rôle majeur dans le développement cérébral et est certainement, chez l'adulte, le neuromodulateur dont les fonctionnements sont les plus complexes à élucider. Ceci n'est pas surprenant étant donné (i) le nombre et la diversité des ramifications sérotoninergiques en provenance des noyaux du raphé et ciblant quasiment toutes les régions cérébrales et (ii), les quatorze sous-types de récepteurs dédiés à l'action de la sérotonine dans le système nerveux central. Il apparaît d'emblée qu'il est impossible d'attribuer une seule et unique grande fonction à la sérotonine. L'objectif de cette partie n'est pas pour autant de décrire l'ensemble des fonctions sérotoninergiques dans le cerveau, tellement celles-ci sont vastes.

La constitution, par la communauté scientifique, d'un large catalogue de souris invalidées pour les différents récepteurs à la sérotonine ainsi que pour son transporteur membranaire (pour revue Gingrich et al., 2003 ; et voir la Table 1 dans Gaspar et al., 2003 pour une liste des phénotypes développementaux et adultes, observés dans les différents lignées de souris invalidées pour les récepteurs 5-HT) souligne l'engouement actuel pour l'étude des divers rôles fonctionnels de la 5-HT. En lien avec les grandes pathologies associées à un dysfonctionnement du système sérotoninergique (dépression notamment), nombre de ces études s'intéressent au versant comportemental et émotionnel de la fonction sérotoninergique, que ce soit chez l'Homme ou le rongeur, sans pour autant déterminer les mécanismes sous-jacents de modulation des processus corticaux (*e.g.* modulation des entrées sensorielles et des signaux de sortie moteurs). La littérature abondante sur les aspects comportementaux et psychopathologiques (pour revue : Jones et Blackburn, 2002 ; Hensler, 2006 ; Cools et al., 2007) ne sera pas décrite en détail dans cette partie. Les diverses interrelations entre le transporteur -ou les récepteurs- 5-HT et les grandes pathologies sérotoninergiques seront toutefois mentionnées le cas échéant. En ligne avec mon travail de thèse, une description des rôles modulateurs de la sérotonine sur la transmission et la plasticité synaptique corticale sera réalisée.

1) Généralités

1.1) Métabolisme

La sérotonine est synthétisée directement dans les neurones sérotoninergiques à partir du tryptophane (obtenu par apport alimentaire) par deux réactions enzymatiques successives. La tryptophane hydroxylase de type 2 (TPH2) hydroxyle, dans une première étape limitante, le L-tryptophane en 5-hydroxy-L-tryptophane (Walther et. al, 2003), qui est à son tour décarboxylé en sérotonine par la décarboxylase des acides aminés aromatiques. Après libération, la 5-HT est dégradée par la monoamine oxydase de type A (MAO-A) ou « recapturée » dans les terminaisons sérotoninergiques par les transporteurs 5-HT (SERT, *voir le chapitre 2 p.56*). Notons que moins de 10 % de la sérotonine de l'organisme est synthétisée dans le cerveau. Les autres 90 % correspondent à la 5-HT des plaquettes et des cellules entérochromaffines de l'intestin dans lequel la 5-HT intervient pour moduler la motricité intestinale (Erspamer et Asero, 1952 ; et pour revue générale : Berger et al., 2009).

1.2) Organisation anatomique

1.2.1) Noyaux du raphé

Chez le rongeur, les neurones sérotoninergiques sont regroupés dans les noyaux du raphé (ligne médiane du rhombencéphale) où ils s'organisent en neuf groupes de cellules (B1-B9). Les groupes B1 à B5, présents dans la partie caudale du raphé, projettent vers le tronc cérébral et la moelle épinière ; alors que les neurones des groupes B6 à B9, en position rostrale (précisément localisés dans le raphé dorsal et le raphé médian), émettent des projections ascendantes vers le diencéphale et le télencéphale (figure 13a). Des connexions entres les noyaux dorsaux et médians, ainsi que des contacts synaptiques dendro-dendritiques locaux au sein du raphé dorsal, suggèrent les possibilités d'autorégulation de l'activité des neurones sérotoninergiques. Les noyaux du raphé reçoivent aussi des afférences modulatrices connexes de la *substancia nigra* et de l'aire tegmentale ventrale (dopamine), des noyaux vestibulaires supérieurs (acétylcholine) et du *locus coeruleus* (norépinephrine) (Taber et al., 1960 ; Dahlström et Fuxe, 1964 ; Azmitia et Segal, 1978 ; Descarries et al., 1982 ; Molliver, 1987 ; Tork, 1990 ; Jacobs et Azmitia, 1992 ; et pour revue sur les noyaux du raphé chez l'homme : Hornung, 2003).

Enfin, il convient de souligner que tous les neurones du raphé ne sont pas sérotoninergiques et qu'une petite fraction de neurones sérotoninergiques a été localisée en dehors des noyaux du raphé (*e.g.* noyaux dorsomédian de l'hypothalamus, Jacobs et Azmitia, 1992).

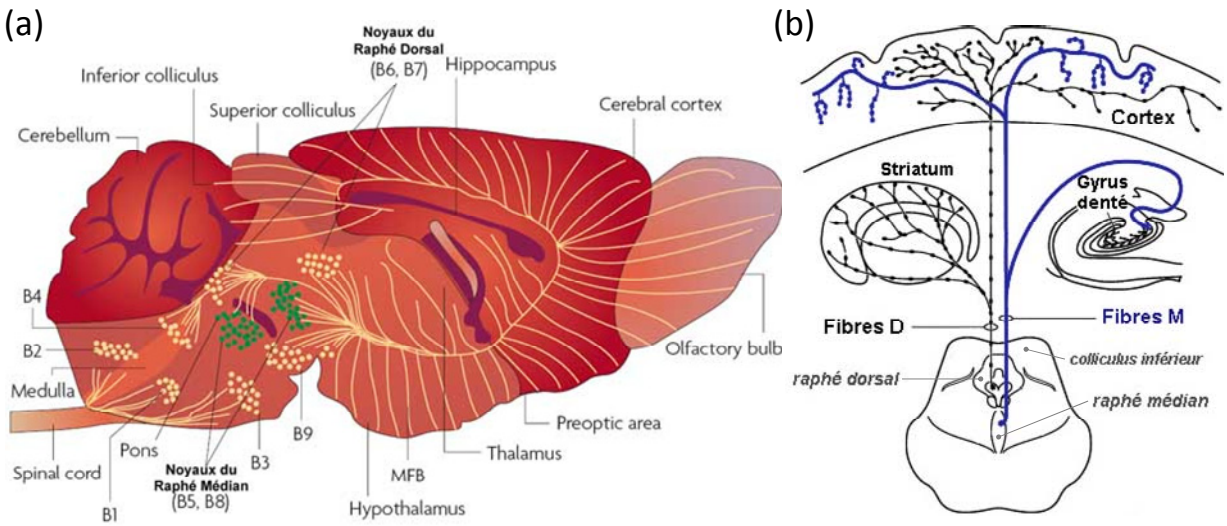


Figure 13. Organisation anatomiques des voies sérotoninergiques ascendantes

(**a**) llustration des neuf noyaux sérotoninergiques et de leurs projections dans le diencéphale et le télencéphale de rongeur. *Modifié d'après Murphy et Lesch 2008, Nat Rev Neurosci.*

(**b**) Représentation schématique des deux types de fibres sérotoninergiques (« D », noir et « M », bleu). Les varicosités sont schématisées par des points plus épais. *Modifié d'après Hensler 2006, Neurosci Biobehav.*

1.2.2) Projections sérotoninergiques

Bien que ne comptant qu'environ 20 000 neurones chez le rat (Jacobs et Azmitia, 1992), l'innervation sérotoninergique du néocortex est très importante avec une densité de fibres relativement homogène entre les différentes couches corticales chez l'adulte (Lidov et al., 1980). Pendant le développement postnatal, les fibres sérotoninergiques montrent au contraire des profils de maturation hétérogènes et transitoires en fonction des couches corticales et de l'âge (Dori et al., 1996) (figure 14). A dix jours postnatal (P10), se forme par exemple un plexus très dense de fibres dans la couche 4 du cortex visuel, qui disparaît par la suite. L'innervation définitive apparaît après le servage (*i.e.* P21). Ce plexus de fibres, observé dans l'ensemble des cortex sensoriels, n'est pas retrouvé dans les autres régions du cerveau (D'Amato et al., 1987). En corrélation avec le rôle majeur de la couche 4 dans l'intégration des entrées thalamiques (*voir le chapitre 1.3 p.24, dans la partie I de cette Introduction*),

cette dernière observation supporte fortement le rôle de la sérotonine corticale dans la mise en place des réseaux neuronaux sensoriels lors de la période critique (*voir également le chapitre 3 p.59*). Plus généralement, l'ontogénie du système sérotoninergique – et des autres systèmes neuromodulateurs (acétylcholine, noradrénaline, dopamine) – présente de nombreux points communs mais aussi de subtiles particularités entre les différentes espèces de mammifères (pour revue : Gu, 2002).

Les fibres sérotoninergiques sont caractérisées par de très longs axones extrêmement ramifiés et comportant de nombreuses varicosités. La morphologie de ces projections diffère en fonction de leur origine (Kosofsky et Molliver, 1987 ; Tork, 1990 ; Hornung et al., 1990 et pour revue Hensler, 2006). Les axones en provenance du raphé médian sont relativement épais et établissent des terminaisons en larges varicosités sphériques (fibres de type « M »), alors que les axones issus du raphé dorsal sont plus fins et comportent, tout du long, de nombreuses et fines varicosités fusiformes (fibre de type « D ») (figure 13b). L'étendue de ces ramifications permet au système sérotoninergique de cibler l'ensemble des neurones excitateurs et inhibiteurs présents dans les six couches corticales (Lidov et al., 1980 ; Papadopoulos et al., 1987a,b ; DeFelipe et al., 1991), avec une préférence pour des sous-types d'interneurones GABAergiques qui expriment certains marqueurs biochimiques, que ce soit chez le rongeur (Paspalas et Papadopoulos, 2001) ou chez l'Homme (Hornung, 2003). L'existence de deux systèmes de projections distincts ainsi que les propriétés électrophysiologiques spécifiques des différents noyaux du raphé (Kirby et al., 2003 ; Beck et al., 2004 ; Kocsis et al., 2006), permettent très probablement au système sérotoninergique d'assurer, simultanément ou alternativement, différentes modulations des processus corticaux (Puig et al., 2005).

Enfin, une étude comparative récente a révélé une plus grande innervation sérotoninergique des couches corticales profondes (5 et 6) chez l'Homme et le macaque (comparé aux rongeurs), ceci exclusivement dans les aires cognitives (Raghanti et al., 2007). Ces différences anatomiques suggèrent le rôle prépondérant du système sérotoninergique dans l'émergence d'aptitudes cognitives complexes chez les hominidés.

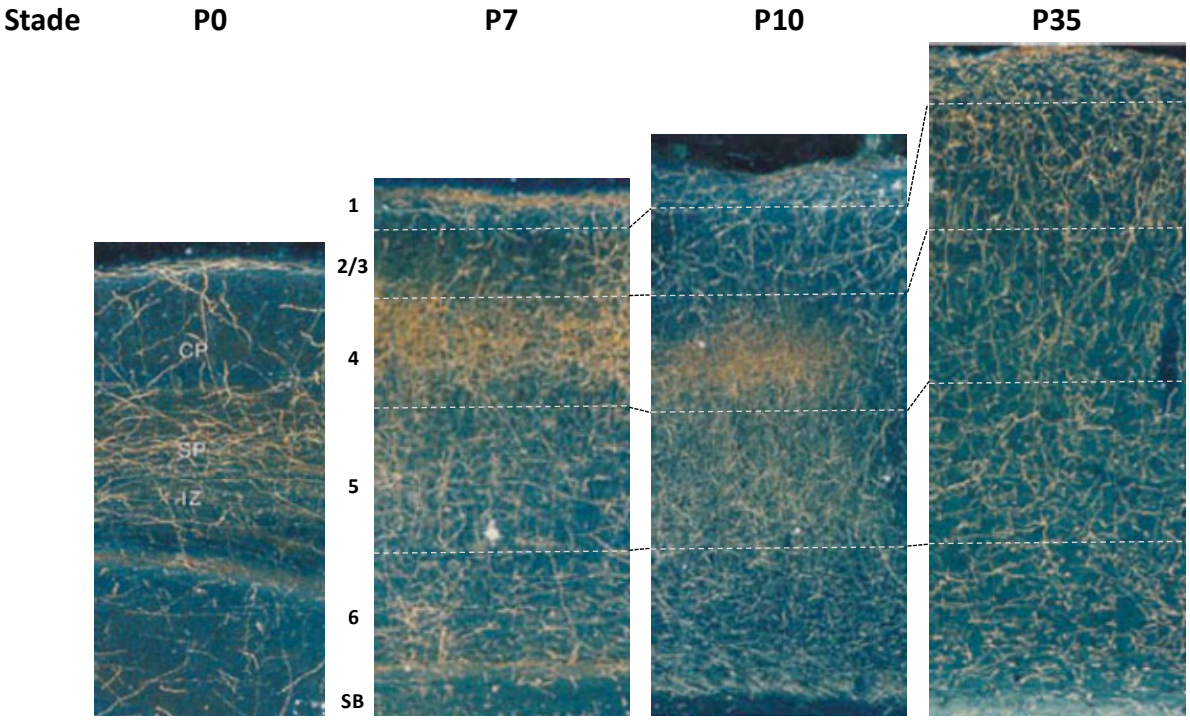


Figure 14. Mise en place du système sérotoninergique dans le cortex visuel
Marquage histochimique de la sérotonine (jaune) dans le cortex visuel de rat. Les stades indiquent le jour postnatal. Les numéros correspondent aux couches corticales pour les stades P7, P10 et P35 (SB, substance blanche). Pour le stade P0 : CP, plancher cortical ; SP : sous-plancher ; IZ, zone intermédiaire (correspondant à la future substance blanche). Noter le changement drastique du « pattern » de fibre en couche 4 entre les stades P7/P10 (plexus de fibre) et P35 (ramifications dispersées). Les images ont étés obtenues en microscopique optique avec un grossissement x72 (l'échelle est conservée entre les différents stades). *Adapté d'après Dori et al. 1996 , Experimental Neurology.*

1.3) Physiologie des noyaux du raphé

1.3.1) Activité rythmique et rôle fonctionnel

Les neurones sérotoninergiques du raphé présentent une activité rythmique lente durant l'éveil, qui peut être augmentée transitoirement lors de l'activation sensorielle. La fréquence de décharge est réduite à environ 1 Hz pendant le sommeil à ondes lentes et devient presque nulle lors du sommeil paradoxal. (McGinty et Harper, 1976 ; Jacobs et al., 1984 ; Levine et Jacobs, 1992a,b; Gervasoni et al. 2000). Néanmoins, ce schéma classique d'activité, jusqu'à présent généralisé au raphé dans son ensemble, ne semble pas être de mise lorsque l'on considère, plus finement, les différentes sous-populations de neurones au sein des divers noyaux du raphé, voir même au sein d'un même noyau (Urbain et al., 2006).

Une étude récente a montré qu'une majorité des neurones du raphé dorsal s'active, de façon transitoire, en réponse aux différents événements comportementaux requis pour effectuer une tâche d'orientation spatiale associée à un stimulus odorant (Ranade et Mainen, 2009). L'activation des neurones du raphé a, ici, été corrélée à des événements de nature sensorielle (reconnaissance de l'odeur), motrice (déplacement), et de récompense de la tâche effectuée. Ce résultat remarquable, obtenu chez l'animal éveillé, est un argument de poids pour un rôle majeur du système sérotoninergique dans le codage, à large échelle, de l'information sensorielle. De la même façon, la stimulation des neurones du raphé dorsal *in vivo*, diminue les réponses évoquées par une large gamme d'odeurs dans les neurones olfactifs des différents glomérules (Petzold et al., 2009). Enfin, les nombreuses pathologies associées au système sérotoninergique pourraient également trouver leur origine dans la diversité fonctionnelle des différents noyaux du raphé (Lowry et al., 2008).

1.3.2) Mécanismes de régulation

Outre les influences modulatrices des autres systèmes neuromodulateurs (Jacobs et Azmitia, 1992 ; Bortolozzi et Artigas, 2003 ; Di Giovanni et al., 2008), des mécanismes de régulations extrinsèques de l'activité des noyaux du raphé dorso-médian ont été reportés (Aghajanian, 1978 ; Celada et al., 2001 ; Varga et al., 2001 ; Bortolozzi et al., 2003 ; Amargós-Bosch et al., 2004 et pour revue Sharp et al, 2007). Ceux-ci impliquent principalement l'activation d'autorécepteurs inhibiteurs 5-HT_{1A} (exprimés sur le soma et les dendrites des neurones 5-HT et de type hyperpolarisant) par des collatérales des axones sérotoninergiques, et probablement l'activation d'autorécepteurs 5-HT_{1B} ou 5-HT_{5A} (Raymond et al., 2001 *; voir le chapitre 4 p.62 pour la description des récepteurs sérotoninergiques*). Les collatérales sérotoninergiques peuvent également activer des récepteurs 5-HT_{1A} inhibiteurs ou 5-$HT_{2A/2C}$ excitateurs exprimés sur les interneurones GABAergiques du raphé, ce qui réduit ou renforce le frein inhibiteur de ces derniers sur les neurones sérotoninergiques, réciproquement (Bagdy et al., 2000 ; Liu et al., 2000). Par ailleurs, les projections glutamatergiques descendantes, entre les neurones pyramidaux de couche 5 du cortex et les noyaux du raphé, sont à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle qui peut être excitatrice (activation des récepteurs AMPA/Kaïnate des neurones 5-HT, Martín-Ruiz et al., 2001) ou inhibitrice (activation des interneurones GABAergiques du raphé, Varga et al., 2001). Dans les deux cas, la modulation de l'excitabilité des neurones pyramidaux corticaux de sortie par l'activation des différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques, apparaît comme une possibilité intéressante de régulation de l'activité rythmique du raphé (Amargós-Bosch et al., 2004).

De façon similaire, les récepteurs 5-HT_4 du cortex préfrontal semblent impliqués dans une boucle de rétrocontrôle positif, leur activation (au niveau cortical) entrainant une augmentation de l'activité rythmique des neurones du raphé (Lucas G et al., 2005). De plus, l'élimination du récepteur 5-HT_4 chez la souris provoque une diminution de l'activité des neurones du raphé, ainsi qu'une augmentation de l'expression du transporteur sérotoninergique membranaire (*voir le chapitre 2 p.56)* et une diminution de la densité des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le raphé (Conductier et al., 2006). L'ensemble de ces observations révèle la complexité des interrelations fonctionnelles entre les différents récepteurs sérotoninergiques et l'activité des noyaux du raphé.

In fine, ces différents mécanismes de régulation tendent à inhiber ou favoriser l'activité des neurones sérotoninergiques et à provoquer une diminution ou une augmentation de la libération de 5-HT corticale (Amargós-Bosch et al., 2004).

1.3.3) La « transmission » sérotoninergique

La plupart des varicosités sérotoninergiques ne sont pas associées à une densité postynaptique. Le nombre de varicosités formant des synapses « jonctionelles » chez le rat est ainsi estimé à moins de 30 % dans le cortex moteur primaire, et à moins de 50 % dans le cortex somatosensoriel (Descarries et Mechawar, 2000). Ce taux est également inférieur à 30 % dans le cortex visuel de rat (Dori et al., 1996). De plus, les récepteurs sérotoninergiques postsynaptiques ne semblent pas être directement juxtaposés aux sites de libération (Jansson et al., 2001). La transmission sérotoninergique dans le cortex est majoritairement de type volumétrique (ou paracrine), ce qui permet de considérer la 5-HT comme un neuromodulateur à part entière, pouvant diffuser dans l'espace intercellulaire et agir sur des sites relativement distants des terminaisons sérotoninergiques (Descarries et al., 1975 ; Beaudet et Descarries, 1976 ; Bunin et Wightman, 1998, 1999). Dans les cas des synapses « jonctionelles » du cortex visuel, les terminaisons s'établissent majoritairement sur les dendrites et les épines dendritiques des neurones (de Lima et al., 1988), bien que des contacts somatiques aient également été répertoriés (Takeuchi et Sano, 1984).

2) Le transporteur membranaire de sérotonine

2.1. Caractéristiques anatomo-fonctionnelles

Le transporteur membranaire de sérotonine (SERT, figures 15 et 16) joue un rôle crucial dans le contrôle de la concentration extracellulaire de 5-HT et, de part la nature de la transmission sérotoninergique (voir le paragraphe précédent), dans l'action modulatrice de la sérotonine sur ses différentes cibles corticales (Bakely et al., 1994 ; Fabre et al., 2000). Sa délétion (souris invalidées) provoque une augmentation de la concentration de 5-HT extracellulaire d'un facteur six (Murphy et al., 1999). Le SERT appartient à la famille des transporteurs aux monoamines (comptant également les transporteurs de dopamine et noradrénaline). Bien que son fonctionnement ne soit pas complètement élucidé au niveau structurel, il assure la recapture, à haute affinité, de la sérotonine depuis l'espace « synaptique » vers les terminaisons présynaptiques, *via* un symport dépendant des ions sodiques et chlorures (figure 15, et pour revue, Torres et al., 2003).

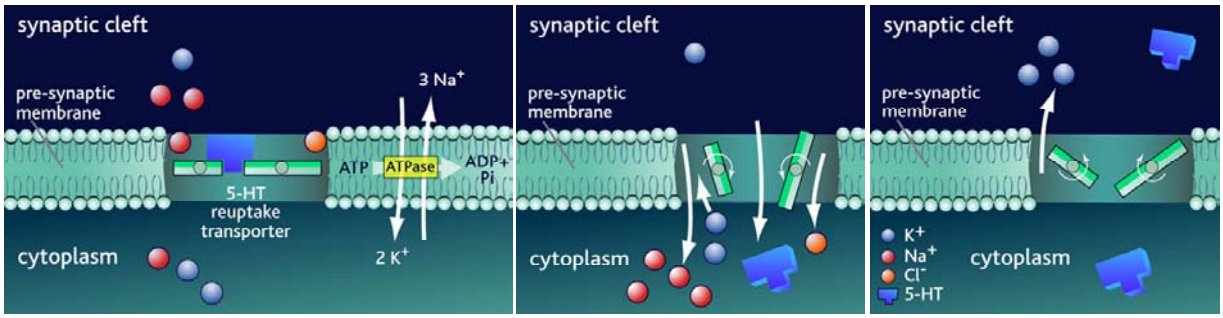


Figure 15. Fonctionnement du transporteur sérotoninergique « SERT »

Gauche : la fixation d'ions Na^+ (rouge) et Cl^- (orange) au niveau de la « face synatique » du SERT (barres vertes) provoque une modification conformation du transporteur (centre) qui permet le passage des molécules de 5-HT (pièce bleue) vers le cytoplasme de l'élément présynaptique. La sortie d'ion K^+ (bleu) est associée au « repositionnement » du transporteur (droite). *Adapté d'après la banque d'image CNSforum : http://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/*

Notons toutefois que le SERT peut également transporter la dopamine. Le SERT est fortement exprimé au niveau du corps cellulaire des neurones 5-HT du raphé (pour revue, Hoffman et al., 1998) ainsi que dans les terminaisons sérotoninergiques du néocortex de rat (Qian et al., 1995 ; Sur et al., 1996) où il est localisé au niveau de la membrane plasmique des axones (Tao-Cheng et Zhou, 1999). Comme cela a été décrit précédemment, la plupart des varicosités exprimant le SERT n'est pas associée à une densité postsynaptique (définie par l'expression de protéines spécifiques comme la PSD-95, Tau-Cheng et Zhou, 1999),

renforçant ainsi le dogme de transmission volumétrique pour ce neuromodulateur. Par ailleurs, la Protéine de la Densité Postsynaptique de 95 kDa (PSD-95) est essentielle à l'expression dendritique de certains récepteurs sérotoninergiques (Abbas et al., 2009). Dans les cas des terminaisons synaptiques « jonctionnelles », le SERT est localisé en position extra-synaptique, ce qui permet, encore une fois, une large diffusion de la sérotonine libérée (Zhou et al., 1998).

2.2. Aspects génétiques, polymorphisme fonctionnel et physiopathologie

Sur le plan génétique, le gène *Slc6a4* (codant la protéine SERT, chromosome 17) est fortement conservé chez les vertébrés (environ 90 % d'homologie avec l'Homme), de façon moins marquée chez les non-vertébrés (*e.g.* Dosophile, C. *elegans* : respectivement 51 et 43 % d'homologie) et étonnement conservé chez les procaryotes (21 %, Androutsellis-Theotokis et al., 2003). Son promoteur présente, chez l'Homme et les primates supérieurs uniquement, un polymorphisme de longueur tout à fait remarquable (appelé « 5-HTTLPR » ; voir la figure 15 et pour revue, Murphy et al, 2004, Canli et Lesch, 2007 ; Murphy et Lesch, 2008). Il existe en effet des formes plus ou moins longues du promoteur (« S », « L », « XL » ou « XXL », contenant chacune un nombre donné d'éléments répétés d'une vingtaine de paires de bases) qui affectent directement le niveau d'expression du transporteur, l'activité de recapture, le taux de recapture de sérotonine et par conséquent le niveau de 5-HT extracellulaire (Lesch et Mössner, 2006). Bien qu'il soit difficile d'associer une forme allèlique donnée à une pathologie particulière, ce polymorphisme (*i.e.* différentiel d'expression du SERT par rapport aux individus sains) est souvent en relation avec des troubles neuropsychiatriques tels la dépression, l'anxiété, l'autisme, les déficits d'attention, l'anorexie nerveuse, le syndrôme de Tourette (pour revue, Murphy et al, 2004 ; Canli et Lesch, 2007), les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Mössner et al., 2000), ou encore l'alcoolisme (Gorwood 2000 ; Gorwood et al., 2004). Ce polymorphisme conduit également à des troubles cognitifs d'ordres sociaux (pour revue : Canli et Lesch, 2007) et à des variations dans la structure cérébrale, avec notamment une diminution du volume cortical chez les individus possédant deux allèles de la forme courte du promoteur (Pezawas et al., 2005 ; Young et al., 2007).

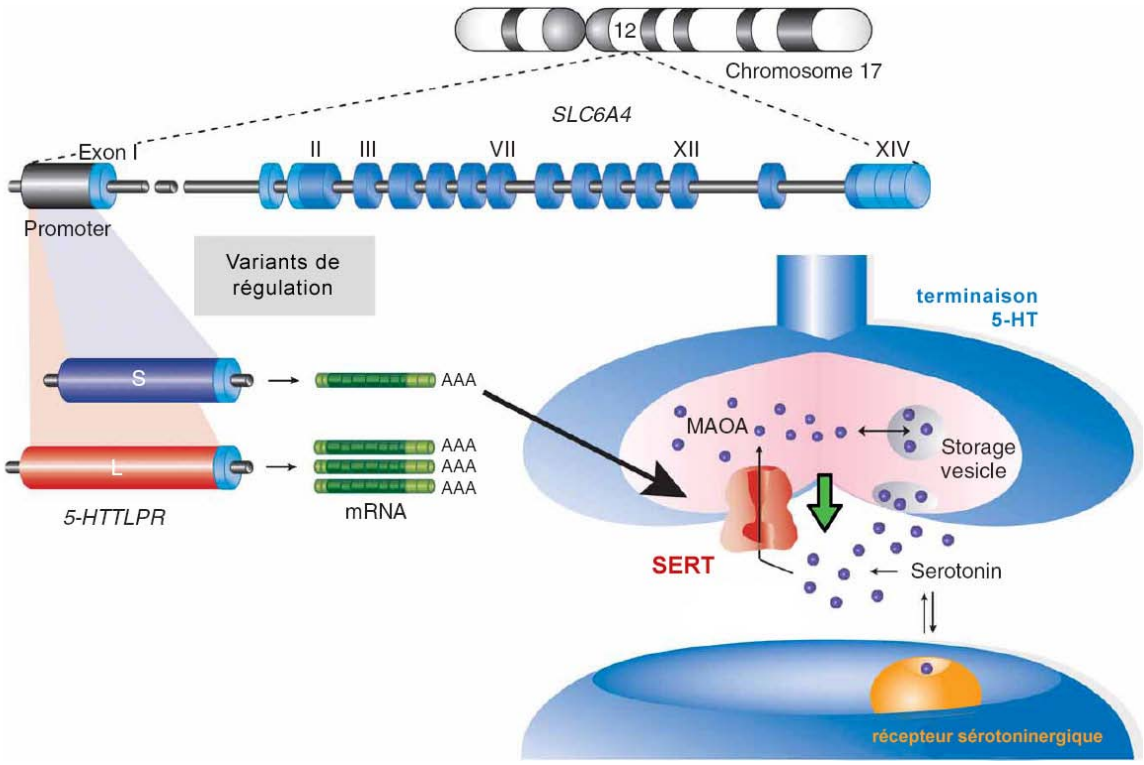


Figure 16. Polymorphisme fonctionnel associé au transporteur SERT

Représentation du gène *SLC6A4 (haut)* codant pour la protéine SERT (rouge) localisée au niveau des terminaisons sérotoninergiques. Le polymorphisme de longueur du promoteur du transporteur 5-HT (5-HTTLPR) est aussi schématisé. Comparé à la version courte du promoteur (S, bleu foncé), la version longue (L, rouge) permet un niveau de transcription du gène *SLC6A4* (et donc de protéine) plus élevé, aboutissant ainsi à un taux final de protéine plus important.

Modifié d'après Canli et Lesch 2007, Nature Neurosci.

De façon plus générale, les nombreuses expériences de mutations du gène *Slc6a4* réalisées chez la souris ont révélé plus d'une cinquantaine de phénotypes biochimiques, anatomiques (e.g. augmentation de la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux de l'amygdale), pharmacologiques, physiologiques ou comportementaux (pour revue, Murphy et Lesch, 2008). Les souris invalidées pour le gène *Slc6a4* (hétérozygotes ou homozygotes) montrent, par exemple, des déficits de formation des cartes corticales sensorielles (*e.g.* cortex en tonneaux, Persico et al., 2001 ; Salichon et al., 2001 ; *voir aussi la figure 17a p.61*) qui peuvent se traduire par des altérations fonctionnelles, notamment lors des réponses corticales à la stimulation des vibrisses (Esaki et al., 2005). La densité de neurones et l'épaisseur des couches corticales sont aussi modifiées chez ces souris, bien que ces phénotypes dépendent du fond génétique (Altamura et al., 2007).

Malgré la mise en évidence de ces nombreux phénotypes, associés à une réduction ou à une annulation de la fonction SERT, le rôle de ce transporteur dans les processus corticaux (e.g. intégration synaptique) du rongeur est peu connu.

2.3. Une cible thérapeutique multiple

A la vue du chapitre précédent, il n'est pas étonnant que le transporteur SERT soit une cible privilégiée de nombreux traitements cliniques. Le plus répandu est le traitement de la dépression avec l'utilisation d'Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de Sérotonine (SSRIs), qui visent à augmenter la concentration extracellulaire de 5-HT (Lesch et Gutknecht, 2005). Des antagonistes du SERT sont généralement utilisés dans le traitement des troubles obsessionnels compulsifs, de l'anxiété ou encore de la migraine et de l'alcoolisme (pour revue : Jones et Blackburn, 2002 ; Murphy et al., 2004). Paradoxalement, l'augmentation d'expression du SERT chez la souris (par manipulation génétique) entraîne une réduction du niveau d'anxiété qui est associée à une diminution de la libération de 5-HT dans les différentes régions du cerveau (Jennings et al., 2006). Enfin, différentes molécules psychotropes tels le MDMA (ecstasy), les dérivés d'amphétamines et la cocaïne sont connues pour leur action inhibitrice sur le SERT.

L'utilisation des SSRIs pour le traitement de la dépression, ses limites et ses alternatives seront discutées à la fin de cette partie sur le système sérotoninergique (*voir le chapitre 7 p.76 : « Sérotonine et dépression »*).

3) Sérotonine et développement des systèmes sensoriels

Les neurones sérotoninergiques sont parmi les premiers à être formés pendant le développement des mammifères, et apparaissent avant l'établissement des synapses excitatrices glutamatergiques (Gaspar et al., 2003). L'inhibition pharmacologique transitoire du SERT pendant les trois premières semaines postnatales chez le rongeur sauvage, a des conséquences marquées sur son comportement émotionnel (stress, anxiété) à l'âge adulte (Ansorge et al., 2004). L'élimination des neurones sérotoninergiques par manipulation génétique entraîne de graves troubles respiratoires néonataux (sous ventilation, apnée) chez la souris, qui se réduisent avec l'âge pour disparaitre chez l'adulte (Hodges et al., 2009). Ces deux exemples suggèrent l'importance de l'homéostasie sérotoninergique dans le développement cérébral et dans la mise en place de structures clés pour le fonctionnement des

processus vitaux et émotionnels (pour revue : Whitaker-Azmitia, 2001 ; Gaspar et al., 2003 ; Nakamura et Hasegawa, 2007).

Le rôle de la 5-HT dans le développement de l'architecture des systèmes sensoriels est tout autant essentiel. L'invalidation de la MAO-A chez la souris a des effets importants lors de la période postnatale mais est compensée, chez l'adulte, par l'activité de la MAO-B. L'accumulation de 5-HT chez ces souris (augmentation d'un facteur neuf pendant la première semaine postnatale, Cases et al., 1995) se traduit par des anomalies de formation des cartes de projections des vibrisses dans le cortex somatosensoriel (absence de la morphologie « en tonneaux », caractéristique de la couche 4, figure 17a) (Cases et al., 1996) et de la ségrégation des projections thalamiques associées à ces dernières (Rebsam et al., 2002). Des observations similaires (réduction des tonneaux en couche 4) ont été faites après la déplétion pharmacologique néonatale du système sérotoninergique (Bennett-Clarke et al., 1994). Une telle déplétion provoque également une modification permanente de la morphologie dendritique de certains interneurones GABAergiques corticaux (Durig et Hornung, 2000) et une diminution de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de couche 5 (Vitalis et al., 2007, déplétion embryonnaire dans ce cas).

Dans le système visuel, la ségrégation des axones de la rétine vers des domaines distincts (et œil-spécifique) du corps genouillé latéral (thalamus) est altérée chez les souris invalidées pour le MAO-A (Upton et al., 1999) ou pour le SERT (Salichon et al., 2001 ; Persico et al., 2001 ; et pour revue : Luo et al., 2003) (figure 17b). L'injection chronique d'une neurotoxine sérotoninergique (5,7-dihydroxytryptamine, destruction local des fibres) dans le cortex visuel de chat, annule la plasticité des colonnes de dominance oculaire classiquement observée après la déprivation monoculaire (Gu et Singer, 1995 ; *pour la déprivation monoculaire, voir le chapitre 1.4 p.29, dans la partie I de cette Introduction*). Cette forme de plasticité est également réduite suite à l'injection d'antagonistes non sélectifs des récepteurs sérotoninergiques (Wang et al., 1997). Pendant la période critique de plasticité corticale (premières semaines postnatales chez le rat), le nombre total de synapses du cortex visuel est diminué de 30 à 50 % après la déplétion pharmacologique du système sérotoninergique (Matsukawa et al., 2003). Ceci suggère un rôle majeur de la sérotonine dans les processus de surproduction et d'élimination synaptique chez le nouveau né (Rakic et al., 1986, De Felipe et al., 1997) et par conséquent, dans la formation des colonnes corticales (Riddle et al., 1992).

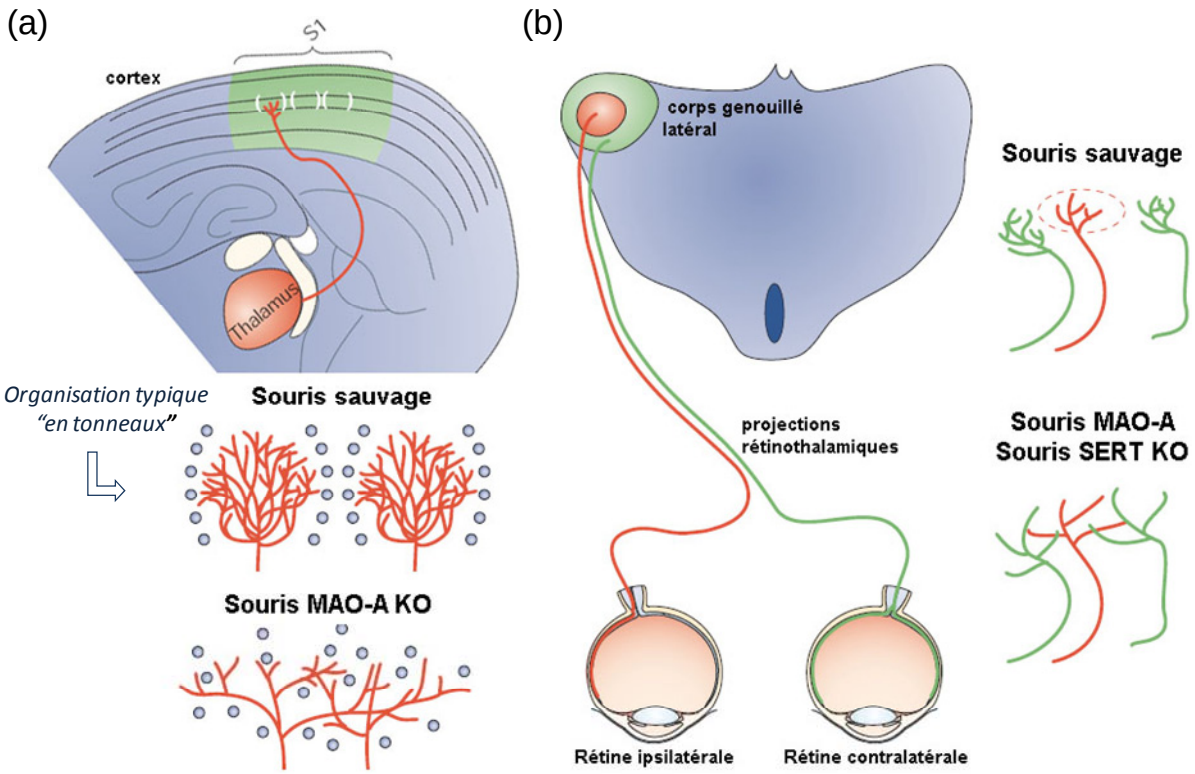


Figure 17. Sérotonine et développement des structures sensorielles

(**a**) L'inactivation de l'enzyme de dégradation de la sérotonine (MAO-A) provoque la perte du « pattern » d'organisation « en tonneaux » des terminaisons thalamiques (rouge), normalement observé dans le cortex somatosensoriel primaire (S1) de souris sauvage.

(**b**) Dans le corps genouillé latéral (bleu) de souris sauvages, les projections rétinothalamiques en provenance des rétines ipsi- (rouge) et contralatérale (vert) sont localisées dans des territoires anatomiquement distincts. Cette ségrégation spécifique est perdue chez les souris invalidées pour la MAO-A, ou le transporteur de sérotonine (SERT).

Modifié d'après Gaspar et al. 2003, Nat Rev Neurosci.

Bien que ce paragraphe soit centré sur la sérotonine et son transporteur membranaire, le rôle développemental déterminant de la sérotonine s'appuie, dans la majorité des cas, sur l'activation de récepteurs 5-HT spécifiques dans les tissus cibles (les deux exemples illustrés dans la figure 17 sont, par exemple, liés à une sur-activation du récepteur 5-HT_{1B} chez les souris invalidées MAO-A ou SERT ; pour revue : Gaspar et al., 2003). L'activité du récepteur 5-HT_{1A} pendant le développement embryonnaire et postnatal de la souris, est essentiel à l'établissement d'un comportement d'exploration normal chez l'adulte (Gross et al., 2002). De façon surprenante, l'amplitude des courants ioniques enregistrés suite à l'activation de ce même récepteur (dans les neurones pyramidaux des couches 2/3 du cortex préfrontal) est fortement augmentée lors d'un stress postnatal, alors qu'elle est fortement réduite par le stress chez l'animal adulte (Goodfellow et al., 2009).

Ainsi, la « pléiotropie » des effets développementaux (et non-développementaux : physiologiques, comportementaux et pathophysiologiques, *voir ci-après et la figure 20 p.75*) de la sérotonine, semble s'établir grâce à la diversité, tout à fait singulière, des récepteurs sérotoninergiques (Hoyer et al., 2002).

4) La superfamille des récepteurs sérotoninergiques

4.1) Classification

Entre deux classifications majeures (Bradley et al., 1986 ; Barnes et Sharp, 1999), et dix années de recherche supplémentaires, la famille des récepteurs sérotoninergiques s'est agrandie d'une dizaine de récepteurs. Avec quatorze sous-types décrits dans le système nerveux des mammifères (quinze en prenant en compte les deux sous-unités controversées du récepteur 5-HT_3 : 3A et 3B ; voir : Fletcher et Barnes, 1998 ; van Hooft et Yakel, 2003 ; Doucet al., 2007), le système sérotoninergique dispose d'une véritable « superfamille » de récepteurs ; chacun possédant ses propres propriétés structurelles, pharmacologiques (différences d'affinité pour la sérotonine endogène) et fonctionnelles.

Seul le récepteur 5-HT_3 est de type ionotropique (conductance cationique Na^+/K^+ dépolarisante), les autres sous-types étant de type métabotropique et appartenant tous à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, à sept domaines transmembranaires (Figure 18). Ces derniers peuvent être classés en quatre groupes, selon la nature de leur couplage et leur principal second messager intracellulaire : les récepteurs couplés (i) à $G_{i/0}$ (1A, 1B, 1D et probablement 1E et 1F) qui inhibent la synthèse d'AMP cyclique et qui sont hyperpolarisants ; (ii) à G_q (2A, 2B et 2C, globalement excitateurs) qui stimulent l'activité de la phospholipase C (production d'inositol-triphosphate et de diacylglycerol) ; (iii) à G_S (4, 6 et 7, globalement excitateurs) qui stimulent la synthèse d'AMP cyclique ; et (iv) un quatrième groupe (5A et 5B) semblable au précédent (G_S), dont la voie de signalisation n'est pas clairement définie (pour revue : Hoyer et al., 2002 ; Bockaert et al., 2006).

Les principaux effets électrophysiologiques associés à l'activation de ces récepteurs 5-HT corticaux seront décrits dans le chapitre 5).

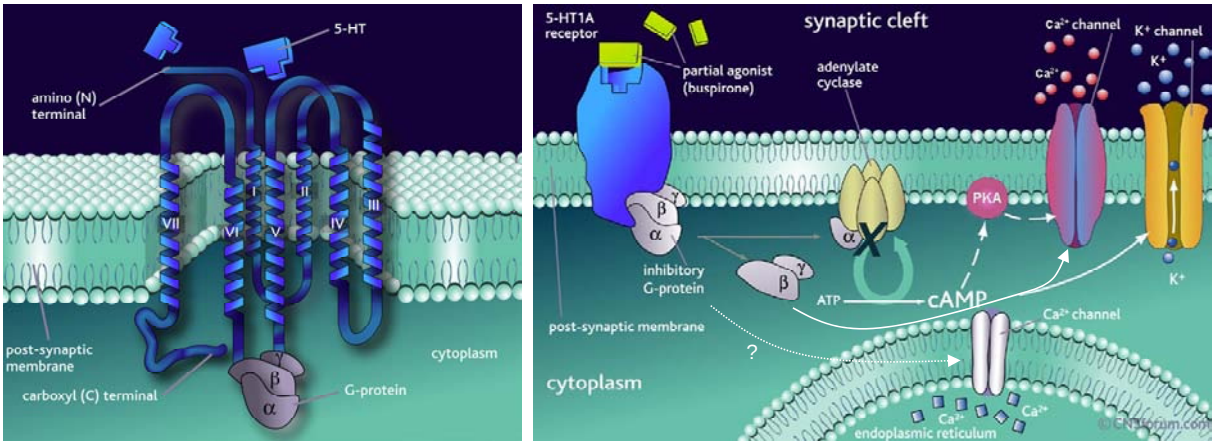


Figure 18. Récepteurs 5-HT métabotropiques et signalisation intracellulaire

A gauche, représentation générale de la structure des récepteurs métabotropiques sérotoninergiques et de leur sept passages transmembranaires.

A droite, illustration des effets intracellulaires multiples pouvant être associés à l'activation du récepteur 5-HT_{1A}. La sous unité α de la protéine G liée au récepteur provoque une inhibition de l'adénylyl cyclase et de la production d'AMP cyclique. Les sous-unités $\beta\gamma$ entraînent quant à elles l'activation de canaux K^+ postsynaptiques, et la fermeture de canaux Ca^{2+}. Ces effets ont été largement caractérisés au niveau neuronal et conduisent à une hyperpolarisation des cellules. Des effets modulateurs sur la concentration de calcium intracellulaire ont également été observés dans certains systèmes. Enfin, l'AMPc peut moduler indirectement le fonctionnement des canaux Ca^{2+} *via* la PKA.

4.2) Plusieurs niveaux de diversité

Malgré la description des voies sérotoninergiques associées aux récepteurs métabotropiques et la classification en quatre groupes distincts, il est quasi impossible lier la fonction d'un récepteur 5-HT métabotropique à un effet intracellulaire unique et à un seul type de modulation. Un même récepteur peut, par exemple, activer différentes cascades de signalisation et moduler l'excitabilité neuronale de plusieurs façons (figure 18, signalisation du récepteur 5-HT_{1A}). De plus, il n'est pas évident que tous les effets intracellulaires associés à un récepteur, initialement décrits dans des systèmes cellulaires *in vitro*, soient présents dans les tissus corticaux (Barnes et Sharp, 1999). Un même sous-type de récepteur peut aussi recruter différentes protéines G (*e.g.* le récepteur 5-$HT2_C$ semble activer $G_{i/0}$ en plus de G_q) ou bien être couplé à différentes sous-unités d'une même protéine G en fonction des tissus où il s'exprime (Mannoury la Cour, et al., 2006 et pour revue : Millan et al., 2008). Un sous-type donné peut encore avoir des propriétés spécifiques au tissu où il s'exprime, comme c'est par exemple le cas avec la désensibilisation (en réponse à une augmentation de la concentration extracellulaire de 5-HT) des récepteurs 5-HT_{1A} entre le raphé et l'hippocampe (Laaris et al., 1999 ; Le Poul et al., 2000).

De façon surprenante, enfin, les récepteurs 5-HT métabotropiques peuvent recruter des voies de signalisations indépendantes des protéine G avec lesquelles ils sont couplés (c'est par exemple le cas du récepteur 5-HT_4, Barthet et al., 2009).

A travers ses nombreux récepteurs, la sérotonine peut donc recruter une très large gamme de voies de signalisation intracellulaires dans les différentes régions du système nerveux central et activer autant d'effecteurs secondaires à large spectre d'action : kinases (PKA, PKC, ERK, MAP kinases, Akt), protéines liant le Ca^{2+} ou canaux ioniques (pour revue : Raymond et al., 2001 ; Bockaert et al., 2006). L'activation simultanée de différents récepteurs 5-HT peut alors conduire à de nombreuses combinatoires de signalisation (figure 19), et provoquer des effets intracellulaires complexes (Millan, et al., 2008).

Par ailleurs, la diversité de cette « superfamille » est exacerbée d'une part, par des modifications post-génomiques (épissage alternatif, édition des ARN messagers, pour revue : Bockaert et al., 2006) qui confèrent différentes propriétés de signalisation (Pindon et al., 2002) ou de spécificité pharmacologique (Vickery RG et al., 2007), et d'autre part par la présence de nombreuses protéines intracellulaires, connues pour interagir et moduler le fonctionnement des récepteurs couplés aux protéines G (pour revue : Bockaert et al., 2004). L'importance fonctionnelle de ces niveaux de diversité est suggérée par des travaux réalisés sur le récepteur 5-HT_4, qui ont révélé une interaction spécifique entre des variants d'épissage minoritaires (5-$HT_{4(a)}$ et 5-$HT_{4(a)}$) et certaines protéines intracellulaires impliquées dans l'adressage et le trafic cellulaire (Joubert et al., 2004). Dans le même ordre d'idée, l'interaction du récepteur 5-HT_{2A} avec la protéine β-arrestin-2 est à l'origine d'une « sélectivité fonctionnelle », particulière à ce récepteur (Abbas et Roth, 2008). En effet, contrairement à l'activation du récepteur 5-HT_{2A} par la 5-HT endogène, son activation par un agoniste de synthèse (le DOI, qui est par ailleurs utilisée dans le traitement de la Schizophrénie) provoque des hallucinations. Ceci s'explique par l'existence de deux cascades intracellulaires différentes, l'une dépendante de la β-arrestin-2 et l'autre indépendante, qui peuvent être sélectivement recrutées par l'une ou l'autre des molécules activatrices (Schmid et al., 2008). Une autre étude récente a enfin démontré que l'activation du récepteur 5-HT_{2A} par deux drogues hallucinogènes différentes (LSD et lisuride) conduit au recrutement de deux voies de signalisation distinctes (González-Maeso et al., 2007).

Les différentes localisations subcellulaires (axone, soma, dendrites…) ou cellulaires (neurones pyramidaux, interneurones GABAergiques…), et la ségrégation (aires cérébrales, couches corticales) des différents sous-types de récepteurs 5-HT (*voir le chapitre ci-après ainsi que la partie Résultats ;* pour revue, Bockaert et al., 2006) sont encore des facteurs qui vont renforcer la diversité des effets de la sérotonine.

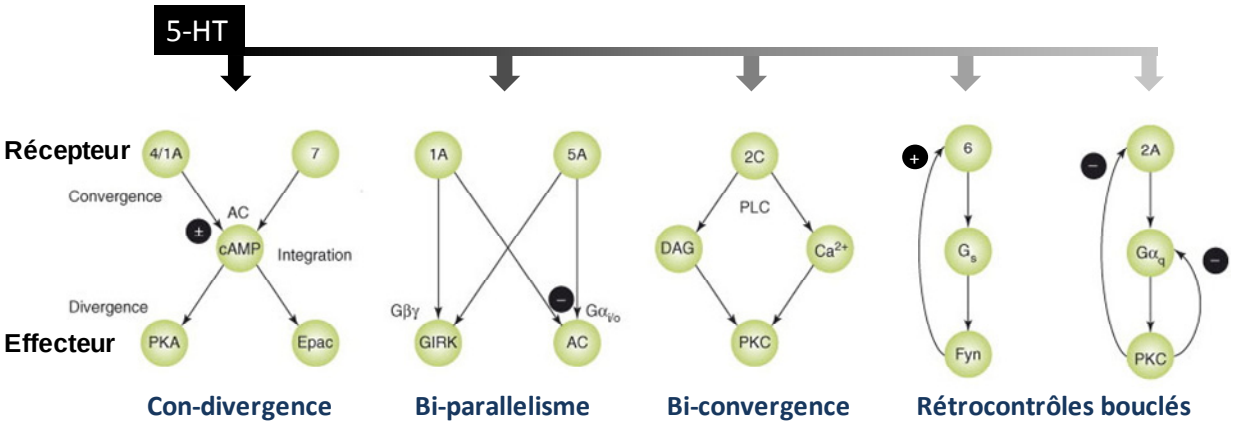


Figure 19. Architecture des signalisations sérotoninergiques

Représentation schématique et simplifiée des interactions (ou « crosstalk ») moléculaires possibles entres les récepteurs sérotoninergiques et leurs différents effecteurs. Chaque « motif » correspond ici à une unité fonctionnelle. Le fonctionnement de ces différentes unités peut alors aboutir à une dynamique de signaux intracellulaires très complexe. Par exemple, dans le motif de « con-divergence », les récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_7 peuvent tous deux stimuler la production d'AMP cyclique (= synergie), alors que l'association du même récepteur 5-HT_7 avec le récepteur 5-HT_{1A} (qui inhibe l'adénylyle cyclase) conduira à des effets antagonistes. La fonctionnalité de ces « réseaux de signalisation » peut être considérée, à une tout autre échelle et à l'image des réseaux neuronaux corticaux, comme une possibilité d'intégrer l'information et de fournir des signaux de sortie adaptés, tout en gardant une efficacité intrinsèque propre.

Adapté d'après Millan et al. 2008, Trends Pharmacol Sci.

L'ensemble de ces informations illustre bien la difficulté à prédire le rôle modulateur d'un récepteur sérotoninergique à l'échelle d'une population neuronale, et d'en extraire des principes généralisables à l'ensembe des régions cérébrales.

Dans le cadre de ma thèse, la description de la distribution des différents sous-types de récepteurs 5-HT dans le cortex, et le décryptage des fonctions modulatrices associées à chacun d'entre eux, apparaissent comme deux pré-requis indispensables à la compréhension du rôle modulateur de la sérotonine dans les réseaux neuronaux corticaux. Ces deux points essentiels vont maintenant être traités, avant d'aborder, brièvement, la diversité des rôles physiologiques et pathophysiologiques des récepteurs sérotoninergiques.

4.3) Distribution des récepteurs sérotoninergiques

Par volonté de concision et en rapport avec mon travail de thèse, ce paragraphe sera centré sur les connaissances acquises au niveau cortical et pour certains récepteurs. La distribution des récepteurs 5-HT dans les autres régions cérébrales ou dans le système nerveux périphérique ne sera pas décrite.

4.3.1) Récepteurs 5-HT_{1A}

Bien que la plus forte densité de récepteur 5-HT_{1A} soit observée dans les aires limbiques et le raphé (Lanfumey et Hamon, 2000), les aires corticales et le cortex visuel, en particulier, expriment une quantité importante de ce sous-type (Palchaudhuri et Flügge, 2005). Des autorécepteurs 5-HT_{1A} sont localisés sur le soma et les dendrites des neurones du raphé ainsi que sur leurs terminaisons axonales corticales (Sotelo et al., 1990 ; Kia et al., 1996 ; Riad et al., 2000 ; *voir aussi, précédemment, le chapitre 1.3.2 p.54 sur la régulation de l'activité des noyaux du raphé*), où ils inhibent la libération de 5-HT. Au niveau postsynaptique, ils sont fortement exprimés sur les neurones glutamatergiques des différentes couches corticales (excepté en couche 1) et tout particulièrement sur le soma, et le segment initial de l'axone, des neurones pyramidaux de couche 5 (Czyrak et al., 2003 ; Cruz et al., 2004 ; Santana et al., 2004). Cette dernière observation suggère leur rôle dans le contrôle des signaux de sortie corticaux (Czyrak et al., 2003). Leur expression dans les interneurones GABAergiques semble être moins marquée (environ 25 % contre 60 % sur les neurones pyramidaux du cortex préfrontal, Santana et al., 2004 – expériences d'hybridation *in situ*), même si on les retrouve sur des populations d'interneurones GABAergiques ciblant les dendrites des neurones pyramidaux (Aznar et al., 2003). Enfin, le récepteur 5-HT_{1A} peut être exprimé au niveau dendritique (Patel et Zhou, 2005 ; Carrel et al., 2008), mais ceci reste à confirmer pour les cortex sensoriels.

4.3.2) Récepteurs 5-HT_{2A}

Le récepteur 5-HT_{2A} est fortement exprimé sur les neurones pyramidaux des couches 2 à 5 du cortex (plus de 50 % d'expression) et en moindre proportion en couche 6 (30 % environ) (Santana et al., 2004). Sa localisation est remarquablement dense au niveau de la dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5 (que ce soit au niveau proximal ou au niveau distal) et dense au niveau somatique (Jakab et Goldman-Rakic, 1998 ; Xu et Pandey, 2000 ; Jansson et al., 2001 ; Bockaert et al., 2006 ; Basura et al., 2008).

Des évidences fonctionnelles récentes ont suggéré que ce récepteur est fortement exprimé dans une sous-population de neurones pyramidaux localisée dans les couches corticales profondes (5-6) et dont les axones projettent sur les neurones pyramidaux de couche 5 (Beique et al., 2007). Au niveau de leur localisation fine, une densité importante de récepteur a été observée dans les épines dendritiques des neurones pyramidaux du cortex de rat (Miner et al., 2003), bien qu'une telle localisation n'aie pas été observée dans une étude précédente (Cornea-Hebert et al., 1999). Ce récepteur est également accumulé dans le compartiment intracellulaire des dendrites (Cornea-Hebert et al., 2002) où il pourrait servir de réserve en vue de son adressage membranaire (Xia Z et al., 2003). Enfin, son expression présynaptique, sur les terminaisons glutamatergiques corticales reste un sujet débattu (Bockaert et al., 2006).

Par ailleurs, le récepteur 5-HT_{2A} semble spécifiquement exprimé sur des interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine mais pas la calbindine (Jakab and Goldman-Rakic 2000 ; de Almeida and Mengod 2007), deux marqueurs biochimiques qui permettent d'exclure, en partie, l'expression du récepteur 5-HT_{2A} sur les interneurones bipolaires et à double bouquet des couches corticales supérieures (Markram et al., 2004). De façon plus générale, environ 25 % des neurones GABAergiques corticaux (seulement 10 % en couche 6) semblent exprimer ce récepteur (Santana et al., 2004).

Enfin, environ 80 % des neurones pyramidaux corticaux coexpriment les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} (Amargós-Bosch et al., 2004). Cette interaction est fonctionnellement très intéressante dans la mesure où, l'activation du récepteur 5-HT_{2A} peut contrecarrer l'inhibition des courants NMDA, normalement provoquée par l'activation du récepteur 5-HT_{1A} (Yuen et al., 2008). Par ailleurs, la coexpression 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} permet une modulation bidirectionnelle de l'activité d'un même neurone pyramidal (excitation *via* le 5-HT_{2A} et inhibition *via* le 5-HT_{1A}), l'un ou l'autre de ces effets modulateurs pouvant être « obtenu » par la 5-HT libérée à partir de différentes fibres sérotoninergiques (*i.e.* issues de différents noyaux du raphé et projetant spécifiquement sur des domaines enrichis en récepteurs 5-HT_{1A} –soma/axone– ou 5-HT_{2A} –dendrite–, Amargós-Bosch et al., 2004).

4.3.2) Récepteurs 5-HT_3

L'état des lieux concernant le récepteur 5-HT_3 est à la fois relativement simple et très intéressant lorsqu'on s'intéresse à sa distribution corticale. En effet, de nombreuses évidences histologiques et fonctionnelles (combinant électrophysiologie et RT-PCR sur cellule unique) ont révélé (i) une localisation du récepteur 5-HT_3 restreinte à quelques sous-types

d'interneurones GABAergiques et (ii) une absence d'expression dans les neurones pyramidaux excitateurs (Jakab et Goldman-Rakic, 2000 ; Férézou et al., 2002 ; Puig et al., 2004 et pour revue : Chameau et van Hooft, 2006 ; Barnes et al., 2009). Les interneurones exprimant le récepteur 5-HT_3 sont localisés préférentiellement dans les couches corticales supérieures (Puig et al., 2004), co-expriment la calbindine, la cholécystokinine (CCK) et le peptide intestinal vasoactif (VIP), mais n'expriment pas la somatostatine ni la parvalbumine (Morales et al., 1996a,b ; Morales et Bloom, 1997 ; Férézou et al., 2002). En accord avec la classification des interneurones corticaux (Markram et al., 2004), ces observations convergent vers l'idée d'une expression du récepteur 5-HT_3 restreinte aux interneurones bipolaires et à double bouquet ; tous deux localisés dans les couches corticales supérieures et ciblant les dendrites des neurones pyramidaux (Jakab et Goldman-Rakic, 2000). Enfin, il est intéressant de noter que les interneurones corticaux exprimant le récepteur 5-HT_3 sont « contactés » par des varicosités sérotoninergiques (Férézou et al., 2002) et sont activés suite à la stimulation du raphé dorsal (Puig et al., 2004).

4.3.3) Récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_7

Contrairement aux récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} et 5-HT_3, la distribution corticale des récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_7 est peu documentée.

Le récepteur 5-HT_4 est exprimé de façon non négligeable dans les différentes régions corticales du cerveau adulte de rat (Waeber et al., 1994 ; Vilaró et al., 1996, 2005). Lors du développement postnatal, son niveau d'expression maximal, dans le cortex, est atteint à partir de la troisième semaine (Waeber et al., 1996). Malheureusement, sa localisation subcellulaire précise sur les différentes populations de neuronaux corticaux n'est pas connue. Des expériences d'hybridation *in situ* ont révélé une localisation somatodendritique et axonale dans de nombreuses régions cérébrales, incluant l'hippocampe (Vilaró et al., 2005). Une autre possibilité est l'expression de récepteurs 5-HT_4 présynaptiques sur les terminaisons sérotoninergique mais aussi sur les afférences cholinergiques, dopaminergiques ou GABAergiques (Bockaert et al., 2006).

Le récepteur 5-HT_7 est, quant à lui, assez fortement exprimé au niveau cortical mais de façon éparse (Ballaz et al., 2007 et pour revue : Vanhoenacker et al., 2000 ; Hedlund et Sutcliffe, 2004). En effet, des « patch » d'expression relativement denses sont observés dans la couche 5, avec une localisation somatodendritique sur les neurones pyramidaux, ainsi que dans la couche 2/3, très probablement sur les interneurones GABAergiques (Neumaier et al., 2001).

4.3.4) Ségrégation morpho-anatomique

Les éléments décrits ci-dessus, caractéristiques de la distribution des sous-types de récepteurs 5-HT corticaux, font apparaître l'existence d'une ségrégation morpho-anatomique basée sur trois critères : couche corticale, type cellulaire et compartiment cellulaire fonctionnel (axone, soma, dendrites). L'importance fonctionnelle de cette ségrégation est cependant inconnue à l'échelle des réseaux de neurones corticaux.

4.4) Pharmacologie des récepteurs sérotoninergiques

Le développement croissant d'un très grand nombre de molécules agonistes ou antagonistes des sous-types de récepteurs sérotoninergiques a fortement contribué à la compréhension de leurs rôles fonctionnels (Hoyer et al., 2002). La liste complète, et mise à jour, de ces molécules peut être consultée *via* la base de données développée par l'IUPHAR (Union Internationale de Pharmacologie fondamentale et clinique), qui est accessible en ligne à l'adresse suivante : http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorListForward. En contrepartie à ce large choix d'outils pharmacologiques, la sélectivité de certaines molécules n'est pas ou peu satisfaisante, ce qui pourrait nuancer le rôle de certains récepteurs décrit jusqu'à présent. Le développement d'une pharmacologie plus sélective, en particulier pour les agonistes, est une réelle nécessité pour améliorer d'une part, notre connaissance du système sérotoninergique et ses actions modulatrices, et d'autre part pour proposer des traitements cliniques mieux ciblés (Butler et Meegan, 2008).

5) Modulations sérotoninergiques du fonctionnement cortical

5.1) Modulation de la transmission synaptique

Malgré les nombreuses études menées sur le rôle modulateur de la sérotonine dans le cortex du rongeur, il est difficile d'avoir une vision intégrée de son rôle global dans la transmission synaptique. Ceci est lié en partie au cloisonnement des approches mais surtout, comme nous l'avons vu, à la complexité et à la diversité de ce système neuromodulateur et au manque d'outils pharmacologiques sélectifs. Ainsi, l'étude de la modulation sérotoninergique de la transmission synaptique évoquée (à l'échelle d'un couple de neurones ou d'un réseau neuronal) fait cruellement défaut.

De nombreuses expériences de libération ionophorétique de 5-HT ont montré son rôle inhibiteur sur l'activité neuronale spontanée (pour revue : Jacobs et Azmitia, 1992), alors que des enregistrements intracellulaires ont révélé une action plutôt dépolarisante, qui entraîne le déclenchement de potentiels d'action (Araneda et Andrade, 1991 ; Tanaka et North, 1993) ou une augmentation des courants postsynaptiques excitateurs spontanés (sEPSC, Aghajanian et Marek, 1997) dans les neurones pyramidaux. Ces derniers travaux ont également révélé une action directe de la 5-HT (courants excitateurs) sur la partie proximale de la dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5. La différence entre les actions dépolarisante ou hyperpolarisante de la sérotonine peut, aujourd'hui, s'expliquer par des variations du niveau d'expression de certains récepteurs sérotoninergiques au cours du développement postnatal (pour revue : Gaspar et al., 2003). Deux études électrophysiologiques, réalisées sur des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex préfrontal, ont en effet prouvé que la 5-HT corticale a un effet majoritairement dépolarisant pendant les trois premières semaines postnatales, puis bascule ensuite vers un effet hyperpolarisant après le sevrage (Zhang, 2003). Cette divergence trouve son origine dans la variation d'expression de certains sous-types de récepteurs 5-HT (Béique et al., 2004). Chez l'Homme, la 5-HT a aussi des effets mixtes (excitateurs ou inhibiteurs) sur les neurones pyramidaux néocorticaux (Newberry et al., 1999). Quelques années après les travaux d'Aghajanian et Marek, les travaux de Zhou et Hablitz (1999) ont montré que l'application de 5-HT sur des tranches corticales augmente la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSC) enregistrés dans les neurones pyramidaux de couche 5, en plus de celles des sEPSC. Notons toutefois que dans cette dernière étude, les neurones pyramidaux étaient enregistrés de façon aléatoire entre les couches 2 et 6, ce qui a pu entraîner une certaine hétérogénéité des réponses. Zhou et Hablitz furent aussi les premiers à mettre en évidence, de façon relativement précise, l'action hétérogène de la sérotonine sur différentes populations d'interneurones, et suggérèrent son rôle complexe dans la modulation des circuits corticaux.

Dans la continuité de ces travaux, il apparaît nécessaire de préciser les effets modulateurs des différents récepteurs 5-HT sur les principales populations neuronales constitutives des réseaux corticaux. C'est pourquoi les connaissances acquises, au niveau cortical et pour les différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques, sur la modulation de l'excitabilité des neurones pyramidaux (majoritairement de couche 5) et des interneurones ainsi que sur la transmission synaptique (*i.e.* activité spontanée enregistrée dans un neurone), sont résumées dans le **Tableau 1** ci-après.

	Neurones pyramidaux de couche 5			Interneurones
	Excitabilité/Activité réseau spontanée		Courants ioniques	Excitabilité
5-HT_{1A}	-	ϕ	+ i_{K+} (Twik-1) + i_{GIRK} - i_{NMDA}	-
5-HT_{2A}	+ -	↗	- i_{Na+} (via PKC) - i_{sAHP} - $i_{Ca1.2}$ (L-type) - i_{NMDA} - i_{GABA-A} (via PKC)	*
5-HT_3	ϕ			+
5-HT_4	ϕ	↗	+/- i_{GABA-A} (via PKA) - i_{K+} (PKA)	ϕ
5-HT_7	+	↗	- i_h	ϕ

Tableau 1. Actions modulatrices des récepteurs sérotoninergiques
Les signes +/- encerclés signifient : dépolarisation/hyperpolarisation du potentiel membranaire. Les flèches indiquent une augmentation de l'activité spontanée excitatrice du réseau cortical, enregistrée au niveau du neurone de couche 5. Les signes + / - colorés signifient activation (ou régulation positive) / inhibition (ou régulation négative) des courants ioniques correspondants. ϕ : pas d'effet. NA : pas d'information disponible.
(*) Il n'existe pas d'évidence directe de l'action excitatrice du récepteur 5-HT_{2A} sur des neurones corticaux. Néanmoins, l'activation de ce récepteur dans le cortex préfrontal (avec une molécule activant également le récepteur 5-HT_{2C}) provoque une augmentation du niveau extracellulaire de GABA (Abi-Saab et al., 1999).
Dans le cas du récepteur 5-HT_4, l'amplitude des courants $GABA_A$ évoqués, peut être augmentée ou diminuée par l'activation du récepteur, en fonction du niveau d'activité basale de la PKA dans les neurones (Cai et al., 2002).

L'analyse de ce tableau suggère, en partie, pourquoi la sérotonine peut avoir des effets multiples sur un type neuronal donné, même *via* l'activation d'un seul type de récepteur. Ces informations montrent aussi qu'il est parfois difficile de relier l'expression d'un récepteur 5-HT, sur un ou plusieurs types neuronaux (*voir le chapitre 4.3 p.66*), avec son (ou ses) effet électrophysiologique. Enfin, ce tableau révèle le manque d'information concernant la modulation sérotoninergique des interneurones corticaux.

5.2) Modulation de la plasticité synaptique corticale

Nous avons vu précédemment (*chapitre 3*) que la sérotonine a de nombreux rôles dans la plasticité développementale et, en particulier, dans la mise place des structures cérébrales. Le rôle modulateur de la sérotonine sur la plasticité Hebbienne (Hebb, 1949), et plus précisément sur la plasticité synaptique à long terme (potentialisation ou dépression à long terme « LTP ou LTD », Bliss et Lomo 1973 ; et pour revue Le Roux et al., 2008a) a aussi été intensément étudié en raison de son implication dans les processus de mémorisation et d'apprentissage (pour revue sur la LTP et la mémorisation : Neves et al., 2008). Contrairement à l'acétylcholine ou à la noradrénaline corticale qui abaisse le seuil d'induction de la LTP (Brocher et al., 1992 ; Kirkwood et al., 1999), le rôle modulateur de la 5-HT apparaît plus complexe.

5.2.1) Dans le cortex visuel de rat

De façon globale, la sérotonine semble s'opposer à la potentialisation à long terme (LTP) des synapses dans le cortex visuel (voir ci-après) ou le cortex préfrontal (Ohashi et al., 2003) de rat. En effet, le blocage (moyennement sélectif) des récepteurs 5-HT_{1A} ou 5-HT_{2C} dans des tranches de cortex visuel, ou la déplétion pharmacologique du système sérotoninergique chez le rat, favorise l'induction de la LTP après une stimulation haute fréquence (Edagawa et al., 1998a, 2001), alors que l'activation du récepteur 5-HT_{1A} s'y oppose logiquement (Edagawa et al., 1998b). L'effet inhibiteur du récepteur 5-HT_{2C} sur l'induction de la LTP requiert l'activation de la phospholipace C et des récepteurs $GABA_A$ (Edagawa et al., 2000), suggérant l'implication des microcircuits inhibiteurs dans le contrôle sérotoninergique de la plasticité corticale. L'effet inhibiteur du récepteur 5-HT_{1A} s'expliquerait, quant à lui, par une régulation négative des sous-unités NR2B des récepteurs NMDA dendritiques, sous-tendue par une réduction de la stabilité des microtubules (Yuen EY et al., 2005).

5.2.2) Chez le chat et dans les autres régions cérébrales

Dans le cortex visuel de chat âgé de moins de 80 jours, la sérotonine favorise la LTD en couche 4 (induite par une stimulation basse fréquence, à 1Hz, de la substance blanche) dans la moitié des tranches testées et entraîne, au contraire et de façon très surprenante, une LTP dans l'autre moitié des cas (à la même fréquence de stimulation). Cet effet est probablement lié à l'activation des récepteurs 5-HT_{2C} de la couche 4 et disparait chez le chat âgé de plus de 120 jours (Kojic et al., 1997, 2001). Il semblerait ainsi que le signe de la plasticité induite en présence de sérotonine, soit dicté par la répartition du récepteur 5-HT_{2C} : la LTP est induite

dans des régions riches en récepteur alors que la LTD apparaît dans des régions ayant une faible densité de récepteur (Kojic et al., 2000).

L'effet inhibiteur de la sérotonine sur la plasticité à long terme est également retrouvé dans l'hippocampe (Normann et Clark, 2005 ; Mnie-Filali et al., 2006) et dans certaines conditions, dans le cortex auditif (Ji et Suga, 2007). Les règles se compliquent toutefois énormément lorsqu'on s'intéresse au récepteur 5-HT_4 *in vivo*. En effet, l'activation ou le blocage de ce sous-type dans la région CA1 de l'hippocampe, n'a pas d'effet sur la LTP induite à 100Hz, alors qu'avec une stimulation à 10Hz (connue pour induire une LTD modeste), son blocage favorise la LTD et son activation convertit la LTD en LTP (Kemp et Manahan-Vaughan, 2005). Avec une stimulation à 1Hz (connue pour induire une forte LTD), son activation inhibe l'induction de la LTD alors que son blocage supprime le maintien de la LTD (sans en affecter l'induction). La nature multi-directionnelle de ces effets, illustre toute la complexité des actions du récepteur 5-HT_4 et rappelle son rôle modulateur bi-directionnel dans la régulation des courants GABAergiques dendritiques (Cai et al., 2002 et tableau 1)

5.2.3) Limites expérimentales

Du point de vue comportemental, l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} ou 5-HT_3 altére les processus de mémorisation à court et long terme. Au contraire, l'application d'un agoniste partiel des récepteurs 5-HT_4 *in vivo* améliore les performances de mémorisation (Meneses et al., 2007). Ces études ont cependant révélé les limites de l'approche pharmacologique dans la mesure où, différents agonistes d'un même récepteur – ou différentes concentrations d'une même molécule – provoquent des effets opposés sur la plasticité. Enfin, le blocage du transporteur SERT avec la fluoxétine améliore les performances de mémorisation à court et long terme alors que nous avons vu que la 5-HT inhibe majoritairement la LTP. Ce dernier résultat montre qu'il est hasardeux de relier directement les modulations de la LTP/LTD, observées sur tranche, avec les modulations des processus comportementaux observées *in vivo*.

5.3) Modulation des réseaux corticaux

A l'échelle des réseaux neuronaux, le rôle modulateur du récepteur 5-HT_3, sur les circuits inhibiteurs du cortex visuel et dans l'intégration sensorielle a été suggéré il y a plus de dix ans (Roerig et Katz, 1997).

Plus récemment, Béique et al. (2006) ont montré que l'action excitatrice du récepteur 5-HT_{2A} sur les neurones pyramidaux de couche 5 du cortex préfrontal, dépend de l'activation d'une sous-population de neurones pyramidaux afférents, localisés dans les couches 5-6. Ce résultat est, à l'heure actuelle, l'unique évidence pour un rôle modulateur de la 5-HT à l'échelle d'un réseau neuronal dans le néocortex.

6) Rôles physiopathologiques multiples des récepteurs sérotoninergiques

Outre son rôle modulateur complexe sur les différentes populations neuronales du néocortex, la sérotonine peut moduler le fonctionnement astrocytaire et microglial, la myélinisation des axones, le transport, le cycle et la mort cellulaire, le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène ou du monoxyde d'azote. La sérotonine peut également contrôler un très grand nombre de fonctions physiologiques vitales, de comportements ou de processus cognitifs (Barnes et Sharp, 1999 ; Raymond et al., 2001 ; Hoyer et al., 2002 ; Hensler, 2006 ; Millan et al., 2008). Les multiples rôles des récepteurs sérotoninergiques dans les grandes fonctions cérébrales et physiologiques sont résumés sur la figure 20.

Indubitablement, de nombreux récepteurs sérotoninergiques sont impliqués, ou potentiellement impliqués, dans de graves pathologies neuropsychiatriques ou neurodégénératives (ces implications sont résumées dans la figure 20). Par exemple, l'utilisation de souris transgéniques invalidées pour le récepteur 5-HT_{2A} et exprimant le gène *htr2a* sous contrôle du système Cre/Lox, en combinaison avec des approches électrophysiologiques, comportementales et de restauration fonctionnelle, a permis une élégante démonstration du rôle des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux dans l'anxiété. Weisstaub et al., 2006). L'utilisation, chez le rat, de molécules agonistes du récepteur 5-HT_4 a des effets antidépresseurs rapides au niveau cellulaire (désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A}, phosphorylation du facteur CREB, neurogenèse) ou lors de paradigmes comportementaux (amélioration des performances aux tests de nage forcée, ou de prise alimentaire après un stress prolongé). Plus récemment, la perte d'interaction entre le récepteur 5-HT_{2A} et la sous unité mGluR2 des récepteurs au glutamate a été décrite comme un mécanisme probable de prédisposition aux troubles schizophrènes (González-Maeso et al., 2008).

En aval de l'activation des récepteurs sérotoninergique, il reste difficile d'établir une relation directe entre un module de signalisation donné et une fonction sérotoninergique particulière. Certains résultats expérimentaux (associant approches génétiques et pharmacologiques) vont néanmoins dans ce sens : rôle du récepteur 5-HT_7 et de $G_{\alpha 12}$ dans la régulation de la

morphologie neuronale (Kvachnina et al., 2005) ; rôle du récepteur 5-HT_{2C} et de la phosphatase PTEN dans la réponse comportementale au tétrahydrocannabinol (Ji SP et al., 2006) ; implication de $G_{\alpha z}$ et du récepteur 5-HT_{1A} dans l'anxiété (van den Buuse et al., 2007) ; récepteur 5-HT_{2A} et $G_{\alpha}q$ dans les hallucinations LSD-dépendantes (Garcia et al., 2007).

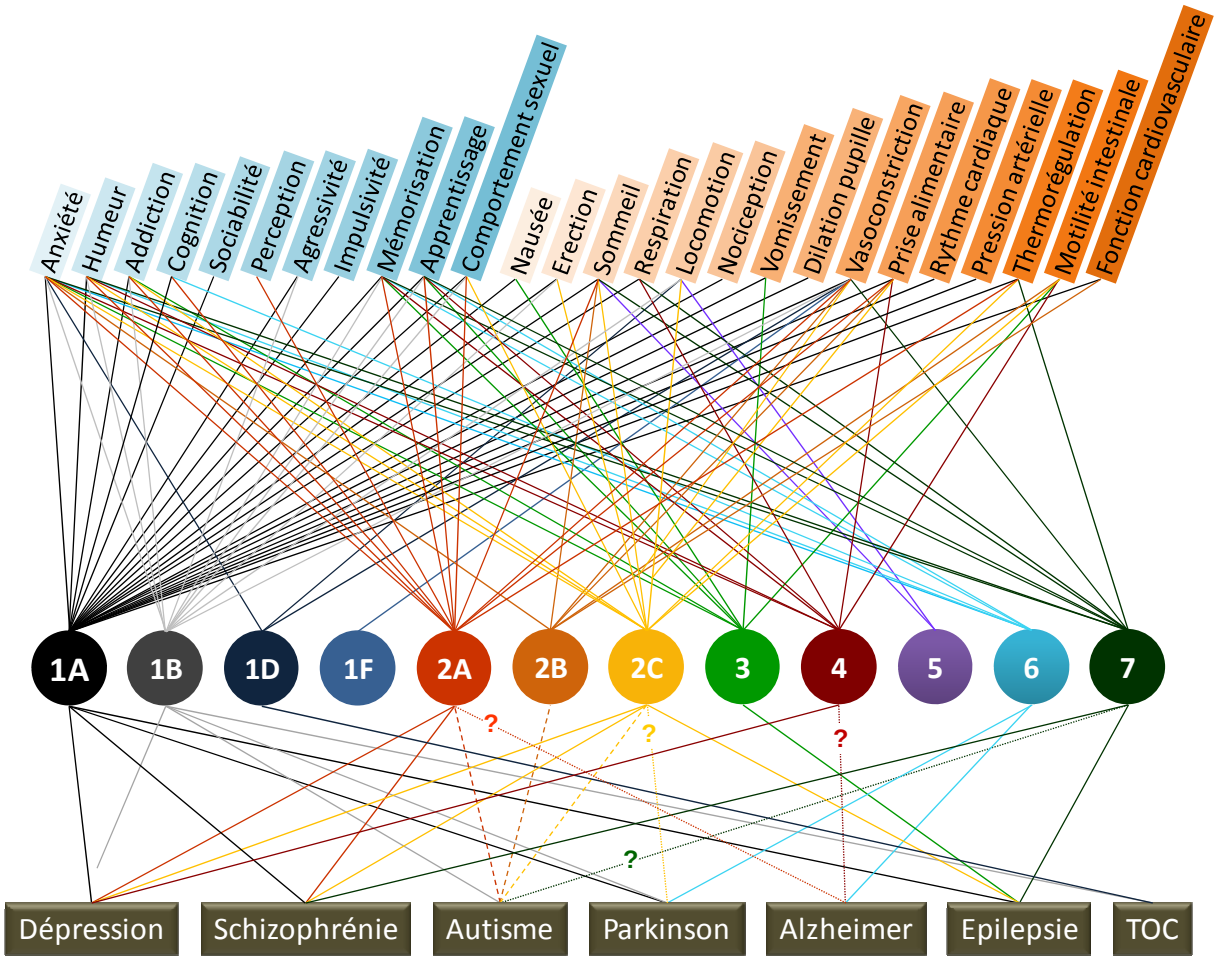


Figure 20. Implications des récepteurs sérotoninergiques dans les fonctions comportementales et physiologiques, et dans la pathophysiologie

La partie haute regroupe les aspects cognitifs et comportementaux (dégradé de bleu) et les aspects physiologiques (orange). La partie basse regroupe les principales pathologies où le rôle des récepteurs sérotoninergiques est établi (trait plein) ou suspecté (« ? »). Les trois traits pointillés suggèrent le rôle de l'ensemble des récepteurs 5-HT2 dans l'autisme (l'étude correspondante n'a pas été conduite avec des molécules sélectives de l'un ou l'autre de ces sous-types).

Ce schéma a été réalisé sur la base de travaux de recherche fondamentale *ou clinique* (publiés dans les revues à comité de lecture)*, réalisés le plus souvent chez le rongeur (rat ou souris) ou chez l'Homme. Une liste partielle des références correspondantes est disponible, en ligne, sur le site « Wikipedia, The Free Encyclopedia » à l'adresse suivante : http://en.wikipedia.org/wiki/5-HT_receptor (pour les rôles physiologiques uniquement).*

En conclusion de ce chapitre, l'extraordinaire pléiotropie des fonctions sérotoninergiques trouve son origine, à différents échelons, dans la diversité de ses récepteurs. La diversité des noyaux sérotoninergiques du raphé et l'immense maillage de leurs fibres efférentes, observé dans l'ensemble du système nerveux central et périphérique (Berger et al., 2009), prennent alors tout leur intérêt en raison de cette diversité d'effecteurs.

7) Sérotonine et dépression

L'implication du système sérotoninergique dans la dépression a été suggérée il y a plus de quarante ans (Coppen, 1967). Les traitements proposés depuis sont basés sur l'hypothèse d'une moindre activité du système sérotoninergique et d'un manque de 5-HT extracellulaire chez les dépressifs. L'utilisation -et la surproduction- d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (SSRIs), comme antidépresseur a ainsi été, et est toujours, très répandue dans le monde ; et ce, malgré une efficacité réduite dans de nombreux cas (Kirsch et al., 2008), voire totalement controversée (Cowen, 2008). Dans ce sens, la prise de SSRIs semble exacerber le risque de passage à l'acte suicidaire dans les premières semaines de traitement, comme l'a annoncé officiellement en mars 2004 la FDA américaine (« Food and Drug Administration ») (voir : http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PublicHealthAdvisories/ucm161696.htm).
Toutefois, le nombre de suicides ne semble pas être particulièrement corrélé avec le nombre de prescriptions d'antidépresseurs (Wheeler et al, 2008).

Cette phase d'envie suicidaire accrue s'explique par la période de latence, entre le début du traitement et le début des effets des SSRIs. Ce retard est probablement attribuable à des mécanismes d'adaptation présynaptiques, secondaires à l'inhibition de la recapture. En effet, l'augmentation de la concentration de 5-HT, induite par la prise de SSRIs, provoque une forte activation des autorécepteurs 5-HT_{1A} inhibiteurs qui, de part leur forte expression sur les neurones sérotoninergiques du raphé et sur leurs terminaisons axonales, freinent fortement la libération de sérotonine (*i.e.* un effet contraire à l'effet attendu). Pendant les premières semaines de traitement, les autorécepteurs 5-HT_{1A} somatodendritiques des neurones du raphé sont progressivement désensibilisés par la sérotonine et les SSRIs commencent à produire leurs effets bénéfiques (figure 21 ; Blier et de Montigny 1994; Kreiss et Lucki 1995; Le Poul et al. 2000 ; Hensler, 2006). Les mécanismes précis de désensibilisation ne sont toutefois pas clairement établis (ils pourraient par exemple impliquer des effets « à distance » sur les effecteurs intracellulaires du récepteur 5-HT_{1A}) et semblent dépendre du type d'antidépresseur utilisé (Hensler, 2002 ; Rossi et al., 2008).

Par ailleurs, une étude récente a suggéré que le délai d'efficacité thérapeutique des SSRIs (*e.g.* citalopram) serait plutôt lié à une augmentation de la sensibilité fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques du cortex (Moulin-Sallanon et al., 2009). Ces efforts de recherche ont finalement conduit à l'émergence d'un nouveau schéma thérapeutique, plus efficace, basé sur l'inhibition sélective des récepteurs 5-HT_{1A} en parallèle à l'administration de SSRIs (Hamon, 1995 ; Lanfumey et Hamon, 2004). Le blocage du récepteur 5-HT_{1A} prévient alors les mécanismes de rétroaction négative et améliore les effets cliniques des SSRIs (Blier, 2001). Le traitement de la dépression par le blocage du récepteur 5-HT_{1A} reste malgré tout une approche complexe, d'autant plus que l'action des antidépresseurs est hétérogène entre les différentes régions cérébrales (thalamus, cortex, hippocampe, amygdale ; Hensler, 2003).

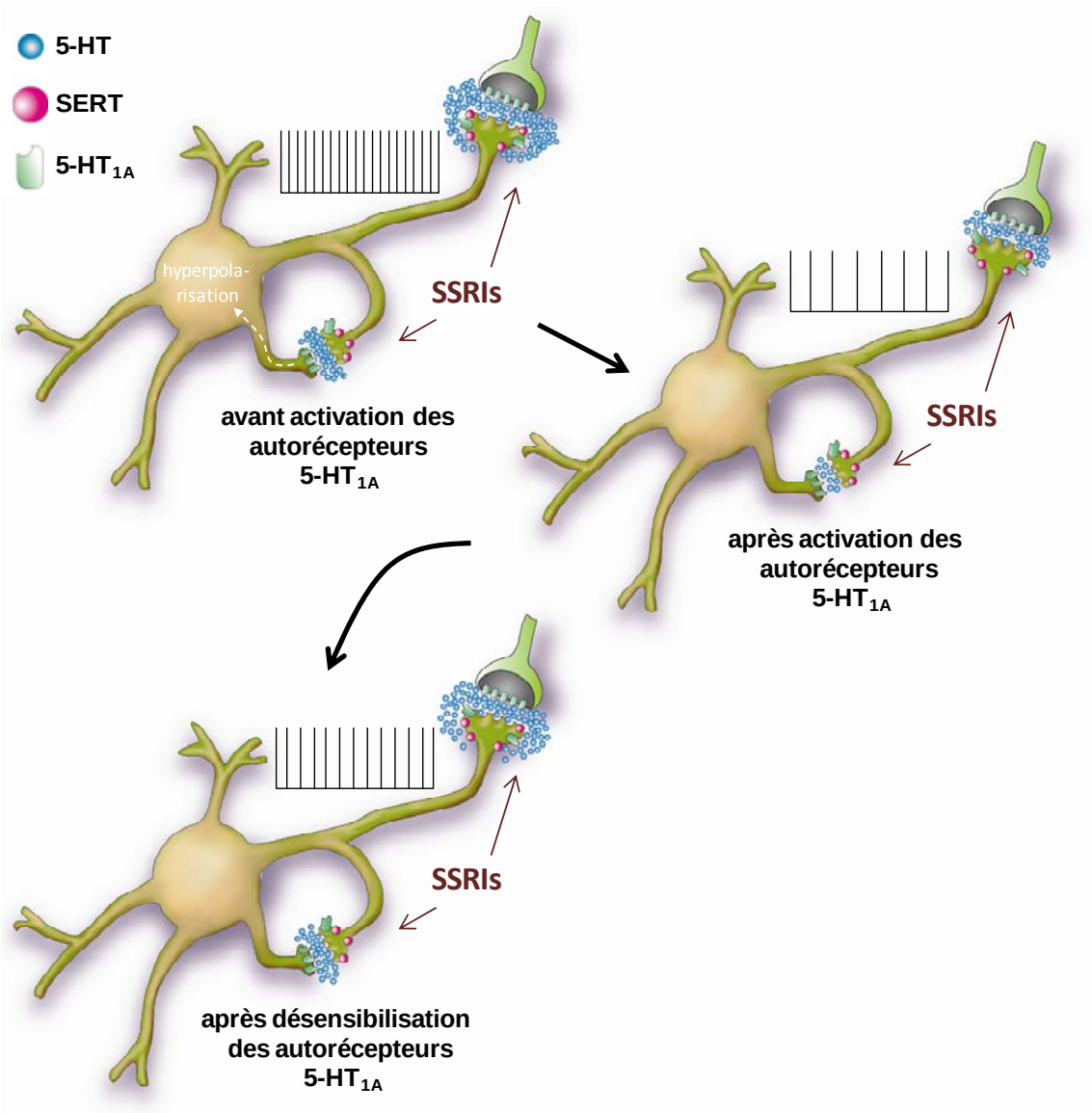


Figure 21. Autorécepteurs 5-HT_{1A} et SSRIs

Le blocage du transporteur présynaptique de la sérotonine (rose) par les SSRIs, provoque dans un premier temps une augmentation de la concentration de 5-HT extracellulaire (bleu). L'activation des autorécepteurs inhibiteurs 5-HT_{1A} par la 5-HT ambiante, entraîne l'activation d'une cascade

intracellulaire (flèche pointillée) qui mène à l'hyperpolarisation des neurones sérotoninergiques (schéma du haut à gauche). Ceci conduit alors à une moindre libération de 5-HT par ces derniers (schéma de droite). Après désensibilisation des autororécepteurs 5-HT_{1A} (en bas gauche), l'activité « normale » des neurones sérotoninergiques est partiellement rétablie et l'action des SSRIs peut devenir significative (augmentation de la concentration extracellulaire de 5-HT et activation de ses cibles postsynaptiques).

Le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} semble aussi améliorer l'effet clinique des SSRis, et permettrait probablement d'avoir, chez les patients résistants au traitement par SSRIs, des effets bénéfiques (Celada et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation du récepteur 5-HT_4 a aussi des effets antidépresseurs multiples chez le rat (Weisstaub et al., 2006). Par curiosité et de façon anecdotique, des antidépresseurs de type antagoniste 5-HT_{2A} peuvent augmenter l'espérance de vie du vers *C. elegans* (Petrascheck et al., 2007).

Paradoxalement, les récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques (en dehors du raphé) sont essentiels dans le contrôle de l'humeur (Savitz et al., 2009). Une diminution de la fonction 5-HT_{1A} (*i.e.* baisse d'expression et diminution du nombres de récepteurs membranaires) chez l'individu dépressif a été reportée dans un grand nombre d'études (Drevets et al., 2007). Le développement d'une pharmacologie plus discriminative des autorécepteurs du raphé et des récepteurs postsynaptiques des autres régions cérébrales, apparaît donc nécessaire.

Une étude récente a révélé les dangers potentiels des SSRIs pour la femme enceinte (Lee LJ, 2009). Une exposition à une dose de 10 mg/kg de fluoxetine (la molécule antidépresseur la plus courante), entre P0 et P6, provoque ensuite chez le rat adulte une altération de la perception tactile et thermique, des troubles locomoteurs, une diminution de l'innervation thalamocorticale dans le cortex somatosensoriel, une réduction du nombre et de la complexité des arborisations dendritiques des neurones étoilés de la couche 4 (*voir le chapitre 2.1 p.31 dans la partie I*) et une diminution de la densité de leurs épines dendritiques.

Pour conclure, malgré la manne financière associée au commerce mondial des SSRIs (estimé à plus de 10 milliards de dollars par an, Nestler et al., 2002), et avec environ 120 millions d'individus dépressifs dans le monde, la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques est criante. Dans ce sens, de nombreuses pistes « non sérotoninergiques » sont actuellement explorées et/ou utilisées en clinique (Lanfumey et Hamon, 2005 ; Berton et Nestler, 2006) comme par exemple, la stimulation de la neurogenèse chez l'adulte (Lanfumey et Hamon, 2005 ; Lledo, 2009) ou la modulation du sommeil par une action sur le système mélatoninergique (Kasper et Hamon, 2009).

III. Traitement dendritique de l'information

Une des fonctions essentielles des réseaux neuronaux est de traiter, en continu, la masse d'informations afférentes et d'y répondre par un message de sortie cohérent. Ce processus dynamique dépend non seulement de la connectivité entre les neurones (décrite dans la première partie de cette introduction), mais également de leurs propriétés intrinsèques qui déterminent l'intégration synaptique et leur excitabilité. Le transfert efficace de l'information dans les circuits neuronaux a depuis longtemps été assimilé à des variations de fréquence de potentiels d'action. Ainsi, les neurones codent l'information en modulation de fréquence de potentiels d'action, après intégration dendritique de leurs différentes entrées synaptiques (pour revue générale sur la relation « entrée-sortie » des neurones, voir Reyes, 2001).

1) Intégration dendritique

« Comment un neurone pyramidal de couche 5 répond-il à ses entrées synaptiques pour initier un potentiel d'action et stimuler à son tour ses cibles postsynaptiques ? »

Cette question cruciale, qui apparaît comme au cœur de la fonction neuronale en tant qu'unité de traitement de l'information, appelle que l'on s'intéresse aux mécanismes qui soutiennent l'intégration synaptique réalisée principalement par la dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5. En effet, c'est lors de ce processus d'intégration dendritique que les différentes entrées synaptiques sont converties, de façon non linéaire, en un message de sortie cohérent.

1.1) Nature des signaux reçus

Corollaire à l'organisation des réseaux neuronaux décrite en première partie, la vaste arborisation dendritique des neurones pyramidaux de couche 5 reçoit des signaux excitateurs et inhibiteurs, que ce soit de façon monosynaptique ou disynaptique.

1.1.1) Signaux excitateurs

La grande majorité des signaux excitateurs postsynaptiques provient de l'activation, par le glutamate, de récepteurs ionotropiques de type AMPA/kaïnate ou de type NMDA et de récepteurs métabotropiques de type mGluR (pour revue Kew et Kemp, 2005).

L'activation des récepteurs AMPA/kaïnate provoque l'ouverture d'une perméabilité cationique (majoritairement Na^+/K^+) dépolarisante. Une fois le bloc magnésium levé (par dépolarisation membranaire, généralement consécutive à l'activation des récepteurs AMPA/kaïnate), les récepteurs-canaux NMDA permettent un influx de Ca^{2+} important et une dépolarisation rapide des éléments postsynaptiques.

Les récepteurs métabotropiques du glutamate sont subdivisés en huit sous-types et répartis en trois classes : classes I et II (récepteurs couplés à $G_{q/11}$) et classe III (couplés à $G_{i/0}$), et peuvent moduler le fonctionnement de certains canaux cationiques postsynaptiques.

1.1.2) Signaux inhibiteurs

Les signaux inhibiteurs proviennent de l'activation par le GABA de récepteurs GABAergiques ionotropiques ($GABA_A$) ou métabotropiques ($GABA_B$), mais aussi de récepteurs glycinergiques par la glycine (Betz et Laube, 2006). L'activation des récepteurs $GABA_B$, couplés à $G_{i/0}$, entraîne une augmentation des conductances K^+ et une diminution des conductances Ca^{2+}, ce qui provoque l'hyperpolarisation des éléments postsynaptiques (Bowery et al., 1980 ; McCormick, 1989). L'activation des récepteurs-canaux ionotropiques $GABA_A$ (ou glycinergiques), conduit à l'ouverture d'un canal perméant aux ions Cl^- et est à l'origine de deux types d'inhibition. La première, appelée « inhibition hyperpolarisante » génère des courants ioniques postsynaptiques inhibiteurs (IPSC) et donc une hyperpolarisation phasique des cellules, elle est rencontrée dans les différents compartiments dendritiques (*voir ci-après, le chapitre 1.2*). La deuxième, appelée inhibition « shuntante » (pour revue, Frégnac et al., 2003) serait de nature tonique (pour revue : Kullmann et al., 2005 ; Farrant et Nusser, 2005) et pourrait résulter principalement de l'activation des récepteurs $GABA_A$ extrasynaptiques (Petrini et al., 2004 ; Mody, 2005), localisés au niveau de la partie proximale de la dendrite apicale des neurones pyramidaux. Bien que ne générant pas d'IPSC, mais ayant pour conséquence une baisse de la résistance membranaire locale, l'inhibition « shuntante », ou silencieuse, permet de « filtrer » les signaux reçus au niveau de l'arborisation apicale distale et qui cheminent vers le soma (*voir le paragraphe 1.3.1.2 p.85* et la figure 24 associée). Fonctionnellement, l'inhibition shuntante peut être recrutée *in vivo* dans le cortex visuel, par exemple en réponse à un stimulus visuel simple (Borg-Graham et al., 1998).

1.2) Les domaines d'intégration

L'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de couche 5 présente une organisation subcellulaire complexe, notamment en terme de localisation des afférences excitatrices (voir notamment la démonstration de Petreanu et al., 2009) qui permettrait à ces neurones de traiter séparément différents « paquets » d'information lors de l'intégration sensorielle (Larkum et Nevian, 2008).

1.2.1) Arborisations distale, apicale et basale

Trois zones fonctionnelles spécialisées peuvent être distinguées (*voir la figure 6b p.32*). La partie distale de la dendrite apicale (qui présente une forte arborisation au niveau des couches 1 et 2/3) assure la réception des signaux thalamiques relayés *via* la couche 2/3 (*voir la description de la colonne corticale page 24*), des différents rétro-signaux générés dans la colonne, et des signaux en provenance des autres aires corticales. Le « tronc » de la dendrite apicale permet la propagation, vers le soma, des signaux reçus. Et l'arborisation basale périsomatique assure quant à elle la réception de la majorité des signaux intracorticaux excitateurs, provenant, par exemple, des colonnes corticales voisines (figure 22a ; Larkum et al., 2001 ; Petreanu et al., 2009 ; Nauhaus et al., 2009). Du point de vue des synapses inhibitrices, l'expression des différentes sous-unités constitutives des récepteurs $GABA_A$ sur l'axe somatodendritique des neurones pyramidaux, semble définir des domaines dendritiques particuliers, spécifiquement ciblés par certaines populations d'interneurones GABAergiques corticaux (figure 22b ; Cherubini et Conti, 2001).

1.2.2) Compartimentation fonctionnelle

Loin d'être indépendants, ces différents compartiments sont connus pour interagir les uns avec les autres, ce qui affecte leurs propriétés d'intégration respectives (Larkum et al., 2004 ; et pour revue : Häusser et al., 2000 ; Sjöström et al., 2008 ; *voir aussi l'exemple des potentiels d'action rétropropagés du soma jusqu'aux dendrites distales, paragraphe 1.3.2.3 p.90*), et qui détermine des propriétés locales d'excitabilité, d'intégration et de plasticité synaptique spécifiques (Mainen et Sejnowski, 1996 ; Schiller et al., 2000 ; Rhodes et Llinas, 2001 ; Sjöström et Häusser, 2006 ; Gordon et al., 2006, et pour revue : Larkum et Nevian, 2008 ; Spruston, 2008 ; Sjöström et al., 2008).

L'impact d'un « input » excitateur sur l'intégration des « inputs » concomitants et/ou sur la génération des signaux de sortie somatique dépendra alors de sa localisation sur l'arborisation dendritique (Williams et Stuart, 1999 ; Zhu, 2000, et pour revue : Williams et Stuart, 2003a). Bien que le rôle des synapses inhibitrices dans l'intégration synaptique soit avéré (Larkum et al., 1999a), la majorité des informations connues à ce jour concerne les synapses excitatrices. Néanmoins, l'influence d'un « input » inhibiteur sur la réponse somatique dépend de sa localisation sur l'axe somatodendritique (Williams et Stuart, 2003b). Des différences de rétrocontrôle inhibiteur (*e.g.* inhibition somatique forte ou inhibition dendritique faible) peuvent, par exemple, influencer la fenêtre temporelle d'intégration dans les neurones pyramidaux (plus étroite ou plus large, respectivement) et par conséquent, la fidélité de l'émission des potentiels d'action (Pouille et Scanziani, 2001).

La spécification fonctionnelle des éléments dendritiques sera illustrée, dans les prochains chapitres, par quelques exemples frappants.

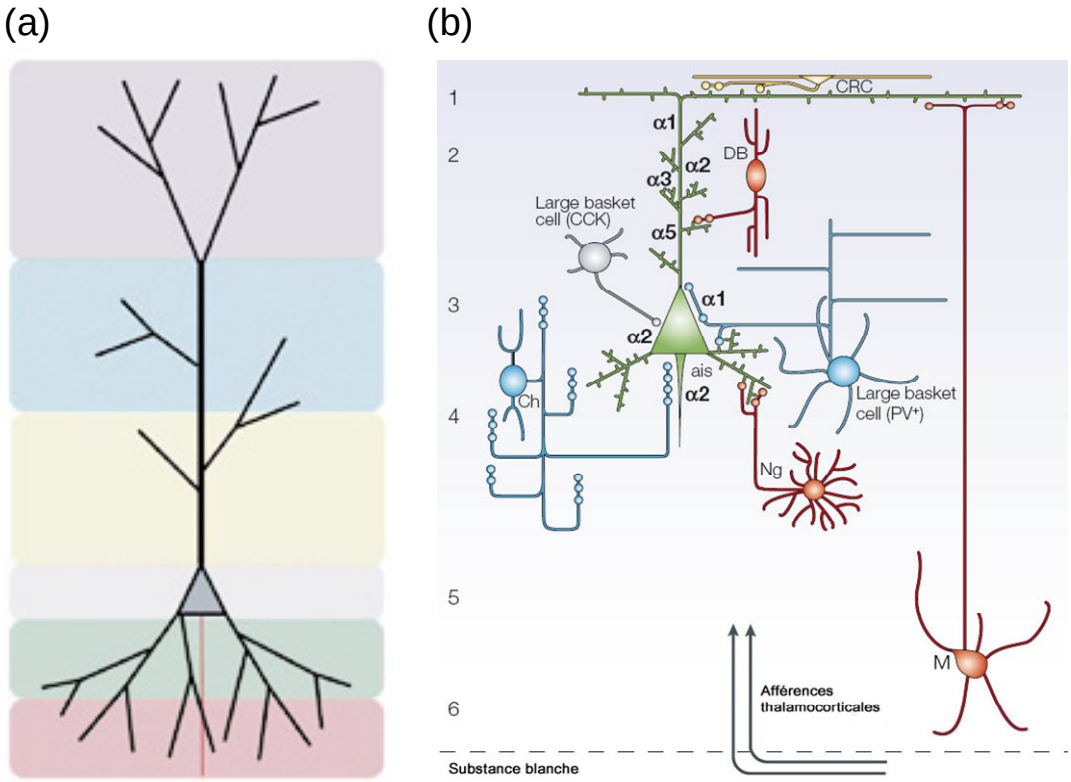


Figure 22. Compartimentation fonctionnelle des neurones pyramidaux

(**a**) Représentation schématique des six compartiments fonctionnels pouvant être distingués dans un neurone pyramidal de couche 5. De haut en bas, 3 compartiments dendritiques apicaux (distal terminal, apical distal, apical proximal), 1 compartiment somatique, et 2 compartiments dendritiques basaux (proximal et distal). L'axone est figuré en rouge. Ces compartiments ont été établis sur des critères de projections synaptiques, d'intégration dendritique et de plasticité synaptique. *Adapté d'après Spruston 2008, Nature Rev Neurosci.*

(**b**) Illustration de l'expression des diverses sous-unités des récepteurs $GABA_A$ (α1, α2, α3 et α5) dans les différents compartiments d'un neurone pyramidal (vert), et représentation des projections spécifiques des sous-types d'interneurones GABAergiques corticaux (Ch, cellule en chandelier ; DB, cellule à double bouquet ; Ng, cellule « neurogliaform » ou en « toile d'araignée » ; M, cellule de Martinotti ; CRC, cellule de Cajal-Retzius). ais : segment initial de l'axone. Dans ce schéma, les ramifications axonales des cellules de Martinoti ont été extrêmement simplifiées (absence des projections somatiques et axonales sur le neurone pyramidal).

Adapté d'après Hensch 2005, Nature Rev Neurosci.

1.3) Les processus d'intégration

Afin d'apprécier pleinement la complexité des mécanismes d'intégration dendritiques, il est nécessaire de différencier les principaux types de transformations que subissent les potentiels synaptiques lors de leur propagation vers le soma, site d'initiation des réponses neuronales. La morphologie complexe des arborisations dendritiques fournit un support anatomique pour un traitement des signaux dendritiques basé sur de multiples unités fonctionnelles, isolées les unes des autres lorsque l'on considère la conduction des potentiels électrotoniques locaux. Les branches dendritiques ont des propriétés d'intégration passive (*voir la théorie de câble, ci après*), qui sont complétées par des mécanismes, actifs et souvent non linéaires, de transformation des entrées synaptiques : amplification, atténuation et sommation.

1.3.1) Atténuation des potentiels synaptiques

1.3.1.1) Théorie de câble et dendrite apicale

La longue dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5 peut s'assimiler simplement à la structure d'un câble constitué d'un corps conducteur (cytoplasme des dendrites) et d'une surface isolante (la membrane plasmique), et présentant donc à la fois une résistance et une capacité (Rall, 1962). D'après la théorie de câble, le signal reçu par les dendrites est déformé lors de sa propagation vers le soma, par les propriétés intrinsèques passives des dendrites, à savoir, leur résistance longitudinale, la capacité membranaire, la longueur de la dendrite et le rapport entre la conductance dendritique et la conductance somatique (Rall W, 1967). Dans ces conditions, le potentiel de membrane devient fonction de la position et du « timing » des entrés synaptiques le long de la dendrite.

Appliquée aux neurones pyramidaux du néocortex, la théorie de câble tend à atténuer fortement, de façon passive, l'amplitude des potentiels synaptiques distaux (figure 23a ; jusqu'à un facteur 100 entre les dendrites apicales les plus distales et le soma, Stuart et Spruston, 1998 ; ou jusqu'à un facteur 30 entre les dendrites basales et le soma, Névian et al., 2007), et à modifier leur décours temporel (Berger et al., 2001 ; *voir aussi la figure 28b p.95*). De cette façon, les synapses proximales donnent naissance (au niveau somatique) à des signaux rapides et de forte amplitude, dans un court délai. Au contraire, des synapses distales donnent naissance, au niveau somatique, à des signaux de faible amplitude au décours temporel allongé, avec un plus grand délai (par rapport à l'arrivée de l'entrée synaptique). Cette vision de l'atténuation est toutefois compliquée par la structure asymétrique de la morphologie dendritique. En effet, l'atténuation du potentiel depuis l'extrémité des dendrites vers le soma n'est pas identique à l'atténuation du soma vers les dendrites (Williams SR, 2004). Ceci ne doit pas être négligé dans le cas des potentiels d'actions rétropropagés (*voir le paragraphe 1.3.2.3 p.90*).

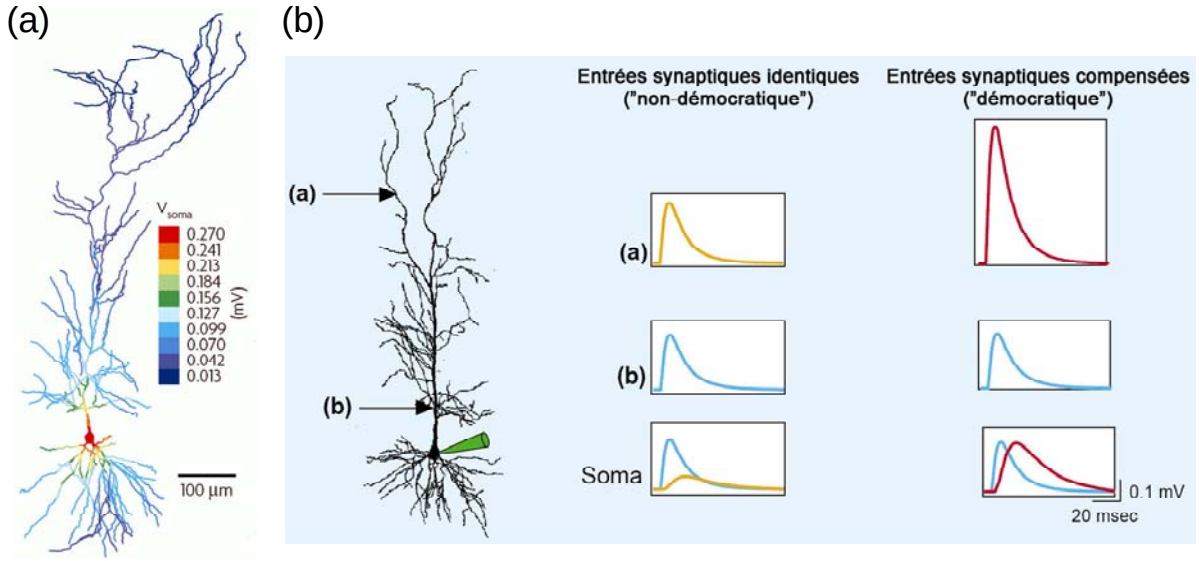


Figure 23. Propriétés de câble et atténuation dendritique des potentiels synaptiques
(**a**) Modélisation de l'atténuation dendritique des EPSPs prédite par la théorie de câble. Le code couleur correspond à l'amplitude de l'EPSP au niveau somatique en fonction de sa localisation initiale. Ainsi, un EPSP généré au niveau du soma aura une amplitude somatique maximale (rouge), alors qu'un EPSP généré dans les dendrites distales aura une amplitude somatique très atténuée (bleu). *Adapté d'après Spruston 2008, Nature Rev Neurosci.*
(**b**) Schématisation de l'amplitude résultante, enregistrée au niveau somatique (« soma », cadre inferieur et électrode d'enregistrement verte), d'un EPSP distal (a, cadre supérieur) et d'un EPSP proximal (b, cadre intermédiaire) de même amplitude initiale, après propagation le long de la dendrite apical d'un neurone pyramidal (gauche). Deux scénarios sont proposés : atténuation due aux propriétés de câble sans (« non-démocratique ») ou avec (« démocratique ») mécanismes compensateurs. Dans le premier cas (colonne centrale), l'amplitude somatique de l'EPSP distal

(trace jaune) est inférieure à l'amplitude de l'EPSP proximal (trace bleue). Au contraire, l'amplitude somatique des EPSPs distal et proximal (traces rouge et bleue, respectivement) est identique en présence de mécanismes compensateurs (colonne de droite). *Adapté d'après Häusser 2001, Curr Biol.*

Comme l'a proposé Michael Häusser, il y a quelques années (Häusser, 2001), l'intégration dendritique dans les neurones pyramidaux de couche 5 apparaît « non démocratique » (figure 23b), en opposition au concept d'intégration « démocratique » observé dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (*i.e.* présence de mécanismes de compensation de l'atténuation électrotonique, comme par exemple, des variations de la densité des récepteurs AMPA ou glycine sur l'axe proximo-distal, Triller et al., 1990 ; Pettit et Augustine, 2000). L'importance physiologique du processus d'atténuation passive a été révélée par des études computationnelles. En effet, la dynamique d'émission des potentiels d'action dans un réseau neuronal modélisé, est modifiée lorsqu'un paramètre d'atténuation passive est « ajouté » (Ascoli GA et al., 2003).

1.3.1.2) Inhibition shuntante

En plus de l'atténuation passive due aux propriétés de câble de la dendrite, l'inhibition shuntante atténue activement, et probablement de façon tonique, les potentiels postsynaptiques dans la partie très proximale au soma de la dendrite apicale (Cipolloni et al., 1998 ; Mody et Pearce, 2004 ; Semyanov et al., 2004). Dans cette région, le potentiel membranaire de repos des neurones pyramidaux de couche 5 (-75 à -80 mV) est proche ou identique au potentiel d'équilibre des ions chlorures (*i.e.* -80 mV). Ainsi l'activation et l'ouverture d'un récepteur-canal $GABA_A$ dans cette région ne provoque pas de passage d'ions à travers la membrane (force électromotrice quasi nulle), mais induit une diminution locale de la résistance membranaire dendritique. Ce dernier événement conduit alors au « shunt », ou à l'atténuation, de l'ensemble des signaux dendritiques avant qu'ils n'atteignent le soma (figure 24 ; Andersen et al., 1980).

1.3.1.3) Canaux ioniques hyperpolarisants

Certaines conductances dendritiques hyperpolarisantes peuvent contrecarrer l'effet des conductances excitatrices décrit précédemment. C'est par exemple le cas des conductances de type $I_{K(Ca)}$ et I_h (Schwindt et Crill, 1997 ; Magee, 1998 ; Williams et Stuart, 2000) qui peuvent diminuer l'amplitude des EPSPs dendritiques. La conductance I_h (cationique non sélective,

activée par hyperpolarisation) présente par ailleurs un gradient de répartition sur l'axe somatodendritique des neurones pyramidaux de couche 5 tout à fait remarquable (Stuart et Spruston, 1998 ; Korngreen et Sakmann, 2000 ; Berger et al., 2001 ; Kole et al., 2006, et pour revue : Migliore et Shepherd, 2002). Dans ce cas, la densité de conductances, très faible au niveau somatique, augmente linéairement pour devenir élevée à l'extrémité distale de la dendrite apicale. Cette répartition hétérogène peut être responsable d'une légère atténuation des potentiels d'action rétropropagés (*voir le chapitre 1.3.2, ci-après ;* Berger T et al., 2003). Les conductances K^+ à inactivation lente présentent aussi un gradient de répartition caractérisé, à l'inverse de I_h, par une forte densité au niveau somatique qui s'atténue ensuite le long de la dendrite apicale (Schaefer et al., 2007).

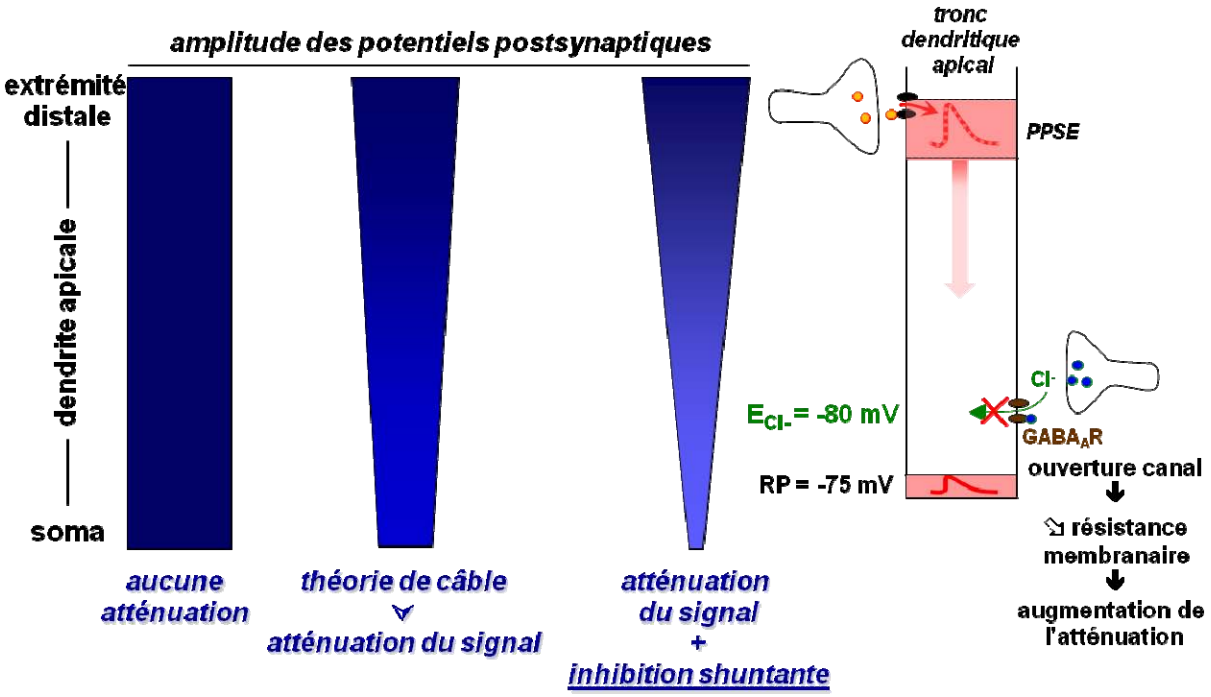


Figure 24. Principe de l'inhibition shuntante

Gauche : l'amplitude des potentiels postynaptiques (dégradé bleu) est atténuée, d'une part par les propriétés de câble de la dendrite, et d'autre part par des mécanismes d'inhibition shuntante.

Droite : Principe de l'atténuation par inhibition shuntante des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE, trace rouge) reçus dans les parties distales de la dendrite apicale. La libération de GABA dans la partie proximale de la dendrite apicale (en bas à droite) provoque l'ouverture de récepteurs $GABA_A$ ionotropiques (marron), mais n'entraîne pas d'influx de Cl^- (vert), car le potentiel de membrane est, à ce niveau, très proche du potentiel d'inversion des ions Cl^- (force électromotrice quasi nulle). Néanmoins, l'ouverture de plusieurs récepteur-canaux a pour effet de réduire localement la résistance membranaire, ce qui tend à augmenter l'atténuation des PPSE cheminant de leur site synaptique d'initiation (en haut à gauche) vers le soma.

Il est intéressant de noter que de tels gradients de répartition ne sont pas observés dans les neurones pyramidaux de couche 2/3 (Larkum et al., 2007) ou avec d'autres types de conductances K^+ dans les neurones de couche 5 (Bekkers JM, 2000 ; Benhassine et Berger, 2005). Ceci suggère leur rôle spécifique dans l'intégration corticale, bien que celui-ci reste en partie à élucider.

1.3.2) Amplification des potentiels synaptiques

La présence d'une arborisation dendritique distale très étendue dans les neurones pyramidaux de couche 5 semble surprenante compte tenu de l'atténuation des potentiels synaptiques distaux qui vient d'être décrite (Rall, 1962). En effet, l'utilité de synapses distales peut être remise en question à partir du moment où les signaux générés par celles-ci devraient avoir une contribution mineure au niveau somatique. La découverte de plusieurs systèmes d'amplification des potentiels synaptiques a, évidement, changé la donne (pour revue : London et Häusser, 2005). L'importance des signaux excitateurs ou inhibiteurs distaux dans l'intégration dendritique ou dans l'excitabilité des neurones pyramidaux est maintenant évidente (Larkum et al., 1999a, 2004 ; Williams, 2004). Quatre mécanismes majeurs ont été décrits et permettent de contrebalancer l'atténuation des « inputs » distaux : l'amplification sous-liminaire par des conductances dendritiques « voltage-dépendantes », les potentiels d'action dendritiques locaux, les potentiels d'action somatiques rétropropagés et l'adaptation synaptique (augmentation du poids des synapses le long de l'axe proximo-distal). Ce dernier mécanisme n'ayant pas été décrit dans les neurones pyramidaux de couche 5 (Häusser, 2001), ne sera pas détaillé.

1.3.2.1) Les conductances dendritiques sensibles au potentiel

En premier lieu, la forme (*i.e.* amplitude et décours temporel) d'un potentiel postsynaptique excitateur (EPSP) peut être modifiée par certaines conductances, elles-mêmes activées en amont suite à la dépolarisation générée par l'EPSP. Ces modifications dépendent de la distribution spatiale des canaux ioniques sensibles au potentiel sur l'axe somatodendritique, de leur densité, de leur seuil d'activation et de leur cinétique d'activation/inactivation (Migliore et Shepherd, 2002). Les dendrites apicales des neurones pyramidaux expriment des canaux Ca^{2+} et/ou Na^+ sensibles au potentiel (Schiller et al., 1997 ; Schwindt et Crill, 1997 ; Larkum et al., 2001) qui permettent de propager − voire d'amplifier − un EPSP (Larkum et

al., 2004). Cette propagation n'est possible que si l'amplitude des EPSP permet une dépolarisation membranaire suffisamment importante pour atteindre le seuil d'activation de ces canaux. Par exemple, l'activation de conductances Ca^{2+} dendritiques peut augmenter significativement l'amplitude d'un EPSP (Gillessen et Alzheimer, 1997). Dans ce cas, la forme des EPSP influence directement leur amplification (Stuart et Sakmann, 1995), dans la mesure où il faudra une dépolarisation plus longue pour atteindre le plateau d'activation des courants Na^{+} persistants, que celui des courants Na^{+} transitoires.

Contrairement au gradient de répartition des conductances I_h (*voir le paragraphe 1.3.1.3 p.85*), les canaux Na+ et Ca^{2+} sensibles au potentiel sont uniformément repartis du segment initial de l'axone jusqu'au trois quart de la partie distale de la dendrite apicale (Colbert et Johnston, 1996 ; pour revue : Migliore et Shepherd, 2002). Toutefois, la localisation du canal calcique de type T semble restreinte à la partie proximale de la dendrite, alors que la densité des canaux de type L ou de type N reste importante jusque dans les parties plus distales (Migliore et Shepherd, 2002).

1.3.2.2) Potentiels d'action dendritiques locaux

L'activation dendritique par les afférences synaptiques peut conduire, localement, à l'initiation de potentiels d'action dendritiques de plusieurs types, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Stuart et al., 1997 ; Golding et al., 2002 ; Waters et al., 2003, et pour revue : Sjöström et al., 2008). Leur seuil d'activation étant fixé par la densité et les propriétés d'activation des conductances dendritiques (Gasparini et Magee, 2002), ils sont plus ou moins fréquents en fonction des branches dendritiques (Goldbergnet al., 2002). Les potentiels d'action dendritiques ont une action amplificatrice locale sur les signaux distaux (Vetter P et al., 2001) et s'opposent donc à l'atténuation de ces derniers (Larkum et al., 1999b ; Williams, 2004). Ils peuvent, au contraire, inactiver localement une branche dendritique (*i.e.* apparition d'une période réfractaire de quelques millisecondes à cinq secondes) et donc déconnecter transitoirement certains compartiments d'intégration (Branco et al., 2008 et le commentaire associé : Branco et Häusser, 2009). Lorsque des synapses proximales et distales sont co-activées, les potentiels d'action dendritique distaux peuvent se propager vers le soma où ils influencent l'édition des trains des potentiels d'action somatiques (Jarsky et al., 2005, et pour revue : Sjöström et al., 2008).

Une compartimentation fonctionnelle basée sur la nature des potentiels d'action dendritiques a été mise en évidence. En effet, les dendrites basales et distales des neurones pyramidaux de couche 5 sont des sites d'initiation de potentiels d'action locaux, majoritairement de type NMDA, ou minoritairement de type sodique, lorsque la dépolarisation locale de la dendrite est suffisante pour activer les récepteurs-canaux ou les canaux sensibles au potentiel correspondants (Schiller et al., 2000 ; Nevian et al., 2007). Dans la partie distale de la dendrite apicale (et avant les ramifications terminales), les potentiels d'action dendritiques locaux sont plutôt de type calcique et de forte amplitude (figure 25a ; Schiller et al., 1997 ; Larkum et al., 1999a,b). Les potentiels d'action dendritiques locaux de type calcique étant capables de se propager vers le soma, certains auteurs considèrent maintenant la zone intermédiaire entre la dendrite apicale et l'arborisation distale touffue (région située à environ 500-650 µm du soma), comme un nouveau site d'initiation des potentiels d'action dans les neurones (*i.e.* à côté du segment initial de l'axone ; Williams, 2004, *voir aussi la zone bleue dans la figure 25b*). Très récemment, une étude publiée dans la revue *Science* a proposé un modèle unifiant les connaissances acquises sur les potentiels d'action dendritiques (figure 25b ; Larkum et al., 2009). Sur des bases électrophysiologiques concrètes, elle révèle toute la complexité des interactions possibles entre les différents types de potentiels d'action dendritiques, et place la dendrite apicale comme un axe de propagation bidirectionnelle des informations reçues au niveau basal et au niveau distal (figure 25b).

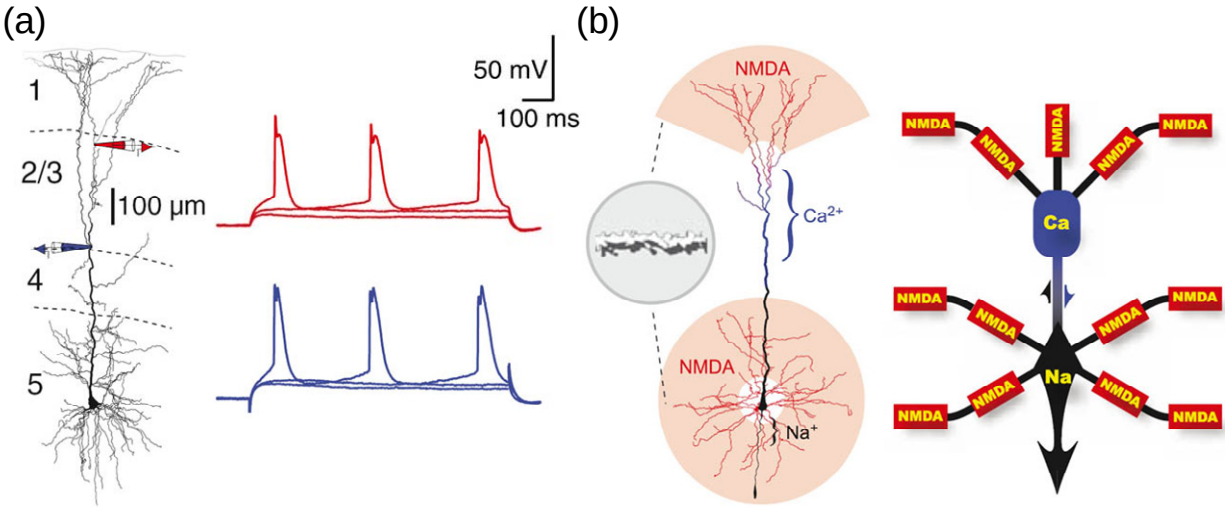


Figure 25. Potentiels d'action dendritiques locaux et compartimentation

(**a**) Exemple d'enregistrement de potentiels d'action dendritiques au niveau de la dendrite apicale d'un neurone pyramidal de couche 5 (dont la morphologie a été reconstituée par injection puis révélation de la biocytine). Les sites d'enregistrement sont indiqués par les pipettes rouge (à 850 µm du soma) et bleue (à 550 µm du soma, site de séparation entre le tronc apical et les ramifications distales). L'injection d'un saut de courant dépolarisant soutenu (400 ms) *via* l'électrode bleu, induit le déclenchement d'un train de potentiels d'action calciques (enregistré par cette même électrode,

tracé bleu) qui se propage vers l'extrémité distale de la dendrite (tracé rouge, correspondant à l'électrode rouge). L'expérience est réalisée en présence de bloqueurs des récepteurs NMDA et des canaux sodiques « voltage-dépendants » rapides (tétrodotoxine).
(**b**) Résumé des différents types de potentiels d'action rencontrés dans un neurone pyramidal de couche 5 (sodique, calcique ou NMDA). Les dendrites basales et apicales peuvent générer des potentiels d'action dendritiques locaux, qui sont majoritairement de type NMDA, et qui se propagent peu le long des dendrites (rectangles rouges). Aux niveaux somatique et dendritique proximal (noir), les potentiels d'actions sont classiquement de type sodique. Au niveau d'une zone particulière entre le tronc apical et le début des ramifications dendritiques distales (bleu), les potentiels d'action sont de type calcique. Les sites d'initiation des potentiels d'action sodiques (noir) et calciques (bleu) délimitent deux nœuds d'interaction (et d'amplification) où est réalisée une intégration dendritique globale, des informations préalablement reçues et traitées localement par les dendrites basales et distales. La dendrite apicale permet alors la propagation active et bidirectionnelle entre ces deux nœuds de traitement de l'information. Notons toutefois que ce modèle a été établi sur la base de potentiels d'action dendritiques générés de façon artificielle (stimulations électriques extracellulaires, photolibération de glutamate cagé). Sa réalité physiologique est donc à confirmer *in vivo*.

Adapté d'après Larkum 2009, Science.

1.3.2.3) Potentiels d'action somatiques rétropropagés et STDP

En opposition avec le dogme de propagation unidirectionnelle de l'influx nerveux, les potentiels d'action générés au niveau du segment initial de l'axone, peuvent se propager de manière rétrograde (et de façon décrémentielle), le long de la dendrite apicale, vers les sites synaptiques distaux (figure 26a ; Stuart et Sakmann, 1994 ; Stuart et al., 1997). Cette rétropropagation est un processus actif qui permet l'amplification des EPSPs distaux et qui requiert, entre autre, l'activation des canaux Na+ sensibles au potentiel (Stuart et Sakmann, 1994). Le profil d'expression de ces conductances sur l'axe somatodendritique influence alors la rétropropagation (Sjöström et al., 2008). Il est intéressant de noter que les dendrites basales peuvent aussi « rétropropager » les potentiels d'action somatiques, avec un coefficient d'atténuation similaire à celui de la dendrite apicale, si l'on tient compte des différences respectives de diamètre et de longueur (Nevian et al., 2007). De plus, des potentiels d'action rétropropagés ont été enregistrés dans les dendrites des interneurones corticaux (Goldberg et al., 2003), interneurones qui, à leur tour, modulent la rétropropagation dans les neurones pyramidaux (Tsubokawa et Ross ; 1996 ; Steriade, 2001a).

L'amplification de signaux dendritiques reçus au niveau distal peut se faire par une activation secondaire de récepteurs NMDA dans ces dendrites, à condition que les potentiels d'action rétropropagés entrent en coïncidence avec les synapses dendritiques, afin d'assurer une dépolarisation locale de la dendrite suffisante pour activer les récepteurs NMDA (figure 27). De plus, la « rencontre » d'un potentiel d'action rétropropagé avec un EPSP distal peut parfois générer un potentiel d'action dendritique calcique, qui se propagera et dépolarisera à sont tour l'ensemble de la dendrite apicale et du soma. Ainsi, les potentiels d'action rétropropagés sont les déterminants principaux de la « détection de coïncidence » dans les neurones pyramidaux de couche 5 (Sjöström et al., 2008). En effet, ils « signalent », au niveau du site synaptique initial, l'émission d'un signal de sortie (*i.e.* train de potentiels d'action) concomitant à l'arrivée des « inputs » dendritiques. Ceci permet alors d'établir une relation précise entre la décharge du neurone pyramidal de couche 5 et une afférence synaptique sur l'arborisation dendritique (Larkum et al., 1999b ; Sjöström et Nelson, 2002 ; Kampa et al., 2007, Sjöström et al., 2008).

La coïncidence entre signaux dans les neurones pyramidaux de couche 5 prend tout son intérêt si l'on considère que l'association répétée d'une activité présynaptique, générant des EPSP, avec une réponse postsynaptique (train de potentiel d'action) conduit à l'apparition d'une plasticité synaptique de type Hebbienne (Hebb, 1949). Les potentiels d'action rétropropagés sont en effet à l'origine de la « plasticité dépendant de la coïncidence des potentiels d'action » ou « spike-timing-dependant plasticity » (« STDP », Sjöström et Häusser, 2006, et pour revue : Sjöström et Nelson, 2002 ; Kampa et al., 2007 ; Caporale et Dan, 2008), dont les mécanismes ont été établis jusqu'à l'échelle de l'épine dendritique (figure 27). Lors de la stimulation concomitante à haute fréquence (*i.e.* « pairing ») d'un site dendritique (par dépolarisation directe ou par stimulation de son afférence synaptique) et du soma d'un neurone pyramidal, la ou les synapses activées peuvent subir des modifications de leur efficacité. Dans ce cas, c'est la précision de la coïncidence, autrement dit le délai, entre le potentiel d'action rétropropagé et les EPSPs dendritiques distaux, qui dicte le signe et la force de la plasticité (LTP ou LTD) qui est induite au niveau de la « synapse coïncidente » (*i.e.* lieu de « rencontre » entre le potentiel d'action rétropropagé et les EPSPs dendritiques). Plus exactement, la résultante d'un protocole de STDP dépend de la position de l'entrée présynaptique sur la dendrite apicale (figure 26b, Sjöström et Häusser, 2006).

Que ce soit *in vitro ou in vivo*, la STDP est impliquée dans l'intégration corticale des stimuli visuels (Fregnac et al., 1988 ; Fregnac et Shulz, 1999 ; Froemke et Dan, 2002) ou odorants (Cassenaer et Laurent, 2007 – étude réalisée chez la drosophile).

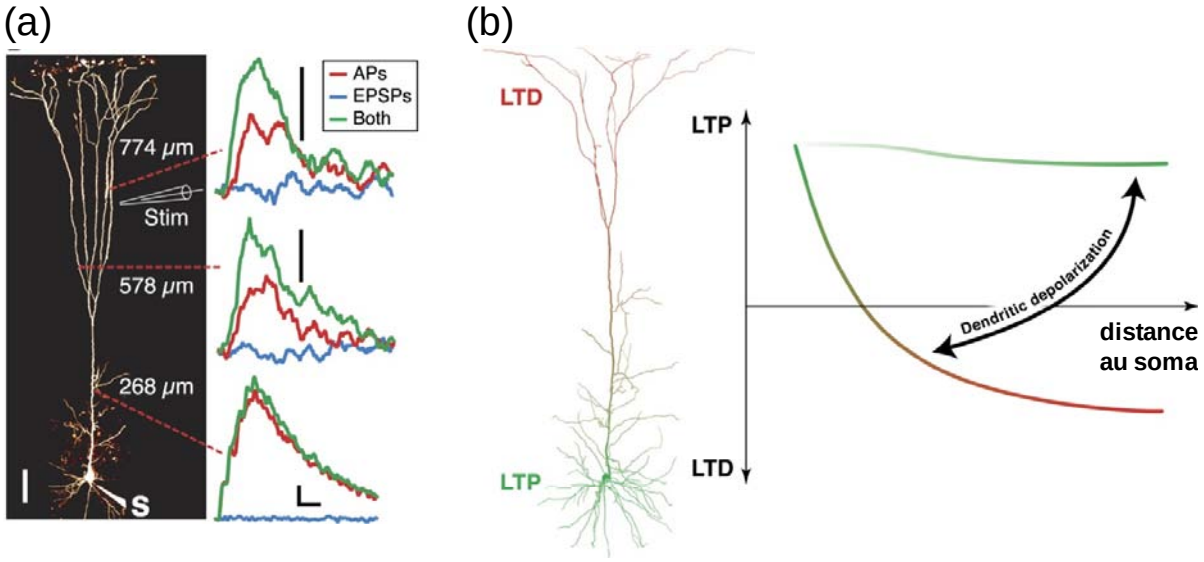


Figure 26. Potentiels d'action rétropropagés et STDP dans les neurones pyramidaux de couche 5

(**a**) Observation d'un neurone pyramidal de couche 5 après incubation avec une sonde calcique (gauche) et acquisition du signal calcique correspondant (droite) dans différentes conditions expérimentales. Des EPSPs sont générés au niveau distal (électrode de stimulation, « stim »), seuls (trace bleue) ou en association (trace verte) avec un potentiel d'action somatique (trace rouge). Le potentiel d'action somatique est ici retropropagé du soma vers l'extrémité apicale en s'atténuant progressivement (comparer l'amplitude des signaux calciques rouges, enregistrés à 268, 578 et 774 µm du soma ; noter la différence d'échelle entre les trois signaux). Au niveau des deux sites les plus distaux (578 et 774 µm), l'association des EPSPs et du potentiel d'action rétropropagé permet une « dépolarisation » plus importante qu'en absence d'association (l'amplitude du signal calcique en vert est nettement plus importante que l'amplitude du signal calcique en rouge).

(**b**) La localisation des entrées synaptiques sur l'arborisation dendritique détermine le signe de la plasticité induite par STDP (« Spike-Timing-Dependent Plasticity »). La stimulation répétée et concomitante du soma d'un neurone pyramidal de couche 5 avec l'une de ses afférences présynaptiques résultera en une LTP lorsque la synapse stimulée est localisée dans les parties proximales de la dendrite apicale (vert). Au contraire, des synapses plus distales (rouge) auront tendance à être déprimées (LTD) par les protocoles de STDP (rouge), en raison notamment de l'atténuation des potentiels d'action rétropropagés. Néanmoins, les synapses distales peuvent être potentialisées par un protocole de STDP lorsque la portion dendritique distale concernée est dépolarisée pendant l'induction de la STDP. Ceci suggère l'importance de l'excitabilité dendritique locale dans cette forme de plasticité.

Adapté d'après Sjöström et Nelson 2006, Neuron.

Dans un niveau de complexité supplémentaire, l'association d'un EPSPs distal de faible amplitude avec un potentiel d'action rétropropagé peut conduire, localement, à l'initiation d'un potentiel d'action dendritique calcique de forte amplitude, qui se propage vers le soma et peut initier le déclenchement d'un nouveau train de potentiels d'action somatiques (*i.e.* réponse globale cette fois ; Stuart et Häusser, 2001).

Pour conclure, les potentiels d'actions somatiques rétropropagés vers les dendrites impactent directement l'intégration dendritique, la plasticité synaptique et, finalement, l'édition des signaux de sortie corticaux.

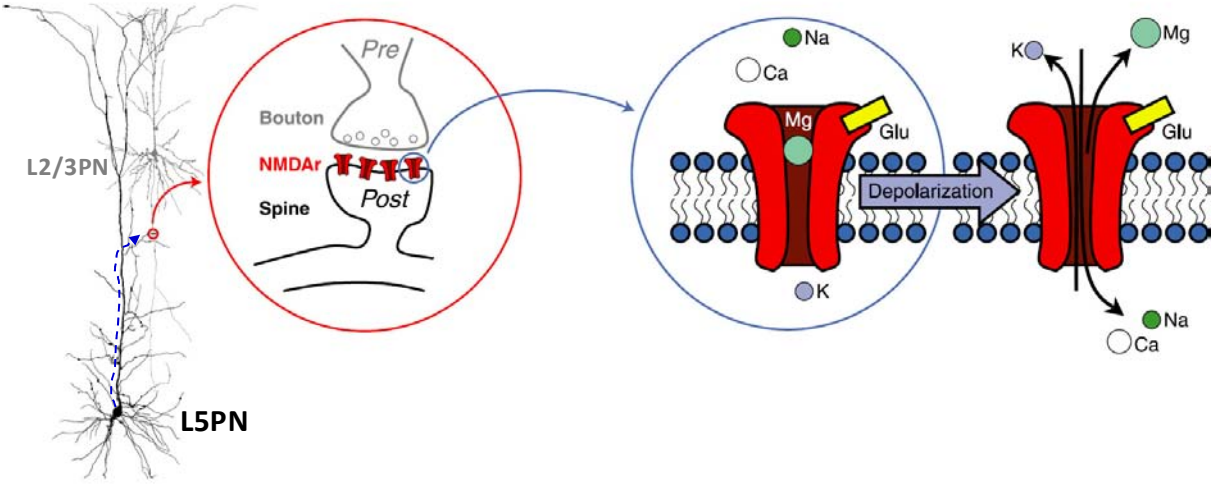


Figure 27. Détection de coïncidence et potentiels d'action rétropropagés

Dans un neurone pyramidal de couche 5 (L5PN), un potentiel d'action somatique peut se rétropropager (flèche bleue pointillée) vers un site synaptique distal (cercle rouge), correspondant à une projection axonale d'un neurone pyramidal de couche 2/3 (L2/3PN). Cet exemple considère que la stimulation basse fréquence de l'élément présynaptique (*i.e.* L2/3PN) induit, en temps normal, des EPSPs de type AMPA/Kaïnate dans la dendrite du neurone pyramidal de couche 5 (non figuré).

Si le potentiel d'action rétropropagé arrive avec une amplitude assez importante au niveau de l'épine dendritique (*i.e.* qu'il a subi une faible atténuation dendritique), il dépolarisera la membrane postsynaptique suffisamment pour lever le bloc Mg^{2+} des récepteurs NMDA. Dans ce cas, et si l'arrivée du potentiel d'action rétropropagé coïncide avec les EPSPs évoqués, la stimulation du neurone pyramidal de couche 2/3 recrutera les récepteurs NMDA et provoquera un influx calcique massif (*i.e.* forte dépolarisation par rapport à la réponse AMPA/Kaïnate initiale). Dans le cadre d'un protocole de « pairing » des deux neurones pyramidaux à haute fréquence, l'activation répétée des récepteurs NMDA (par l'éffet combiné des potentiels d'action rétropropagés et des entrées présynaptiques) pourra conduire à l'induction d'une plasticité synaptique à long terme de type « Spike-Timing-Dependent Plasticity » (STDP). Le récepteur NMDA est alors considéré comme un détecteur de coïncidence canonique, et la position des entrées présynaptiques détermine le signe de la plasticité (LTP ou LTD, *voir la figure 26b p.92*).

Adapté d'après Sjöström et al. 2008, Physiol Rev.

1.3.3) Sommation des entrées synaptiques

Une étape importante de la « transformation » des entrées synaptiques en une réponse neuronale (train de potentiel d'action) est l'intégration des potentiel postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs avant l'édition des signaux de sortie. Etant donné la faible amplitude des potentiels postsynaptiques unitaires atteignant le soma (Markram et al., 1997) et malgré la panoplie des mécanismes d'amplification décrits précédemment, de nombreuses entrées synaptiques sont nécessaires pour initier les trains de potentiels d'action somatiques. La sommation de ces entrées synaptiques dépend de plusieurs paramètres : leur localisation, leur « timing », et le potentiel membranaire des compartiments dendritiques qui les reçoivent.

1.3.3.1) Dépendance à l'espace

Comme cela a été décrit précédemment, la théorie de câble prévoit une atténuation des « inputs » distaux reçus au niveau des différentes branches dendritiques. Différents sites d'intégration peuvent être identifiés, au niveau de l'épine dendritique, au niveau d'un groupe d'épines, au niveau d'une branche dendritique ou au niveau d'une région dendritique (figure 28a). Ceci rend difficile la prédiction du signal somatique final en réponse à des « inputs » concomitants et distribués sur l'arborisation dendritique. De nombreuses études ont tenté de définir les règles d'intégration spatiale dans les dendrites des neurones pyramidaux, sans pour autant trouver un consensus (pour revue : Häusser et Mel, 2003). L'idée résultante de ces travaux est que l'effet combiné de deux ou plusieurs EPSPs dendritiques peut être déterminé, au niveau somatique, en les sommant de façon linéaire ou sous-linéaire (atténuation), sans tenir compte de leur localisation (basale ou apicale) sur l'arbre dendritique. Ce type de sommation a également été observé pour des entrées inhibitrices (générées par l'activité d'interneurones de type « basket cell ») reçus par des neurones pyramidaux ou des interneurones (Tamas et al., 2002). Cette théorie générale est toutefois réfutée, en partie, par des travaux montrant que les EPSPs reçus sur une même branche sont sommés de façon supra-linéaire alors que les EPSPs reçus sur des branches différentes et séparées sont sommés linéairement (figure 28b ; Nettleton et Spain, 2000 ; Polsky et al, 2004). Les auteurs de ces études ont également précisé que la sommation supra-linéaire nécessitait l'activation des récepteurs NMDA dendritiques.

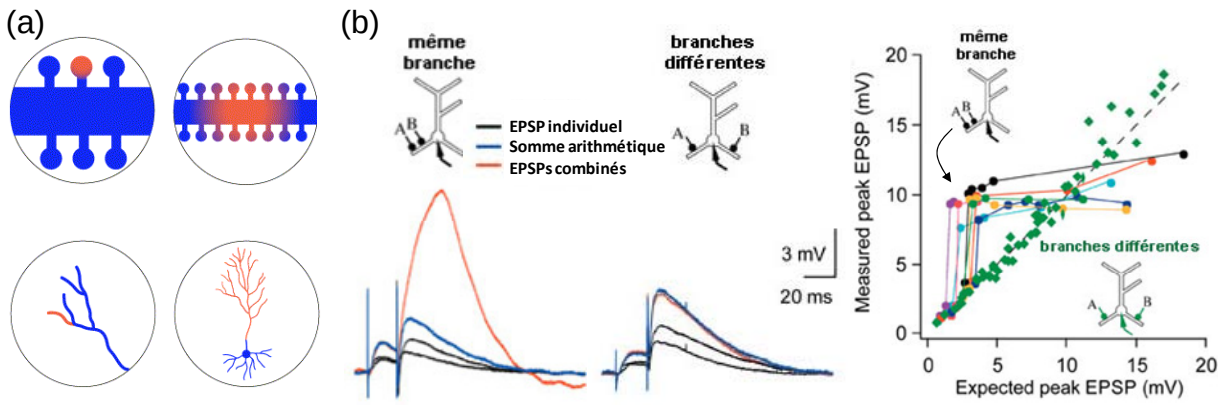


Figure 28. Importance de la localisation dans l'intégration dendritique

(**a**) Schématisation des différents niveaux de compartimentation de l'intégration. L'intégration dendritique peut être initiée à partir d'une épine, d'un ensemble d'épines, d'une branche dendritique ou d'une arborisation plus large. La convergence des entrées synaptiques dans ces différents domaines déterminerait alors le type de l'intégration : du plus local au plus global.

(**b**) Deux types de sommation spatiale pour des « inputs » d'une même branche dendritique ou pour des « inputs » de deux branches séparées. Deux électrodes de stimulation (A et B) permettent d'induire deux EPSPs dendritiques qui sont enregistrés au niveau somatique. Dans la première configuration (« même branche »), la stimulation combinée des points A et B (trace orange) produit un EPSP d'amplitude bien plus importante que le prévoit la somme arithmétique (trace bleu) des EPSP individuels (traces noires, points A et B stimulés séparément). L'analyse de la population (tracés colorés sur le graphique) fait apparaître une sommation supra-linéaire, de type sigmoïde (pour les EPSPs de forte amplitude initiale, la sommation dendritique est inférieure à la sommation arithmétique). Dans la deuxième configuration (« branches différentes »), la sommation dendritique des EPSP (orange) est similaire à la somation arithmétique (bleu) des deux EPSPs (noir). L'intégration est dans ce cas linéaire (diamants verts sur le graphique).

Adapté d'après Polsky et al. 2004, Nature Neurosci.

Il est intéressant de préciser que le type de sommation peut dépendre de l'état d'activité des réseaux neuronaux : linéaire lors d'un rythme à ondes lentes (*ondes thêta*) ou supra-linéaire lors de bouffées d'activité à haute fréquence (Gasparini et Magee, 2006 – étude réalisée dans l'hippocampe). Dans ce dernier cas, la nature non linéaire de la sommation permet au neurone de discriminer des entrées synaptiques synchrones, sur la base de leur localisation.

Enfin, la perte de linéarité lors de la sommation spatiale est évidente lorsqu' entrent en jeu les nombreuses conductances « voltage-dépendantes » distribuées sur l'arbre dendritique, ainsi que les potentiels d'actions dendritiques ou les potentiels d'action rétropropagés (pour revue : Reyes, 2001 ; *voir le chapitre 1.3.2 p.87*).

1.3.3.2) Dépendance au « timing »

Un neurone peut recevoir de nombreux signaux excitateurs ou inhibiteurs dans une période de temps très réduite (d'où le terme de « bombardement synaptique »), notamment lors de l'activation sensorielle (Petersen et al., 2003). Sa capacité d'intégration lui permet de sommer des EPSPs se succédant à intervalles de 5 à 10 ms. Cependant, la fréquence des EPSPs est déterminante dans la nature de l'intégration. En effet, une dépolarisation dendritique soutenue, générée par l'application d'EPSPs à haute fréquence (*e.g. 25-100 Hz)* va avoir tendance à « épuiser » le gradient électrochimique « disponible » pour continuer à générer des courants synaptiques, qui seront par conséquent atténués (*i.e.* sommation sous-linéaire, Larkum et al., 1998). Au contraire, des EPSPs reçus continuellement à intervalles espacés (*e.g.* 1 Hz) seront plutôt sommés linéairement. Enfin, lors d'un train de stimulation, les premiers EPSPs peuvent être sommés de façon sous-linéaire alors que les derniers EPSPs seront sommés linéairement en raison de l'inactivation d'un courant K^+ de type I_A (Cash et Yuste, 1999).

Par ailleurs, la morphologie dendritique affecte le « timing » de la sommation, en introduisant plus ou moins de délai entre deux EPSPs générés en des points distincts de l'arborisation dendritique. La résultante de la sommation de deux EPSPs au niveau du soma (*i.e.* la fenêtre temporelle pendant laquelle le potentiel somatique est supérieur au seuil de déclenchement des potentiels d'action = « fenêtre d'excitabilité ») est alors directement liée à la localisation des EPSPs (figure 29, Agmon-Snir et Segev, 1993 ; Migliore et Shepherd, 2002). Par exemple, deux EPSPs reçus par le soma seront sommés rapidement, ce qui conduira a une augmentation forte et brève de l'excitabilité somatique au-delà du seuil de déclenchement des potentiels d'action. Au contraire, la sommation d'un EPSP distal (atteignant le soma dans un délai d'environ 50 ms) avec un EPSP somatique, conduira à une dépolarisation du soma plus longue. Dans ce dernier cas, la fenêtre d'excitabilité est étalée dans le temps, ce qui peut avoir une conséquence directe sur la réceptivité du neurone pyramidal face aux autres entrées synaptiques.

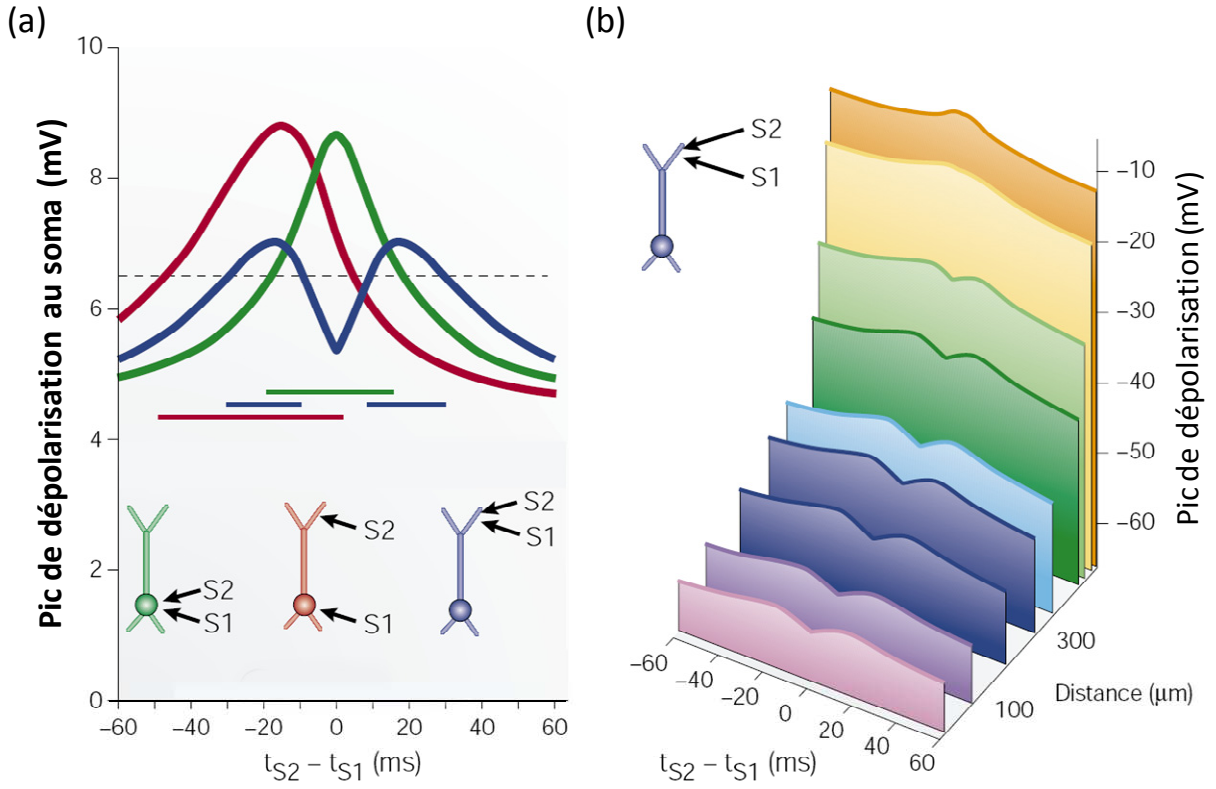


Figure 29. Importance du « timing » dans l'intégration dendritique

(a) Rôle de la position et du délai entre deux EPSPs dans la définition de la fenêtre d'excitabilité somatique. La sommation de deux EPSPs somatiques (*i.e.* délai très court, en vert) conduit à l'apparition d'un pic d'excitabilité somatique (trace verte) qui est restreint dans le temps (la ligne verte indique la fenêtre d'excitabilité (ligne noire pointillée : seuil de déclenchement des potentiels d'action). La sommation d'un EPSP somatique avec un EPSP distal (trace rouge) génère une fenêtre d'excitabilité plus allongée (ligne rouge), qui correspond au temps nécessaire à l'EPSP distal pour arriver au soma. Enfin, la sommation de deux EPSPs distaux fait apparaître deux fenêtres d'excitabilité (bleu). De façon générale, lorsque le délai entre deux EPSPs est trop important (axe des abscisses), la sommation devient moins efficace et diminue la probabilité d'atteindre un niveau d'excitabilité somatique suffisant pour déclencher une réponse.

(b) Graphique illustrant les modifications d'une entrée synaptique dépolarisante, générée suite à la stimulation de sites dendritiques distaux (configuration bleue dans (a)). L'amplitude du signal enregistré à des points plus ou moins distants du soma (l'axe z représente la distance au soma) diminue fortement pendant sa propagation dans le premier tiers de la dendrite apicale. L'atténuation est ensuite plus progressive. La deuxième modification concerne la forme du signal. En effet, la stimulation des deux entrées synaptiques donne naissance à un pic de dépolarisation au niveau distal, qui se « sépare » progressivement en deux vagues de dépolarisation distinctes, au fur et à mesure que l'onde dépolarisante se rapproche du soma.

Adapté d'après Migliore et Shepherd 2002, Nat Rev Neurosci.

1.3.3.3) Dépendance au potentiel membranaire

Comme nous avons pu le voir, l'activité des canaux ioniques « voltage-dépendants », leurs propriétés d'activation et d'inactivation et leur expression différentielle sur l'axe somatodendritique influencent l'intégration dendritique. C'est pourquoi toute modification du potentiel de membrane postsynaptique peut conduire à un changement de la nature de l'intégration. Par exemple, une dépolarisation soutenue de la dendrite peut convertir une sommation sous-linéaire en une sommation linéaire *via* l'inactivation de I_A (Urban et Barrionuevo, 1998). Au contraire, une hyperpolarisation dendritique peut désinactiver les conductances Ca^{2+} de type T et favoriser une sommation supralinéaire (Nettleton et Spain, 2000).

1.3.4) Modulation de l'intégration dendritique

Les propriétés d'intégration des neurones pyramidaux peuvent être modulées par l'action des neuromodulateurs sur les nombreux canaux ioniques dendrites. Les monoammines, l'acétylcholine ou la norépinéphrine ont tous des effets modulateurs qui dépendent de la phosphorylation ou de la déphosphorylation des différents canaux ioniques (Levitan, 1994 ; Cantrell et Catterall, 2001). Le niveau de phosphorylation des canaux Na^+ dendritiques proximaux est par exemple différent du niveau de phosphorylation des canaux sodiques distaux (Gasparini et Magee, 2002). Comme cela a été décrit dans la partie II de cette introduction, la sérotonine peut activer des conductances K^+ dans le soma ou les dendrites des neurones pyramidaux du cortex (Takigawa et Alzheimer, 1999 ; Ma et al., 2007), ce qui peut limiter l'étendue de la rétropropagation des potentiels d'action somatiques dans la dendrite (Sandler et Ross, 1999). Malgré l'expression privilégiée de certains récepteurs 5-HT dans la dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5 (Roth et Xia, 2004), le rôle modulateur de la sérotonine dans l'intégration dendritique est méconnu.

Des travaux récents ont montré que l'intégration d'« inputs » distaux dans les neurones pyramidaux de couche 5, génère des potentiels d'action somatiques globaux pendent les trois premières semaines postnatales, alors que l'intégration de ces mêmes « inputs » génère plutôt des réponses locales chez les rats plus âgés (*i.e.* génération de potentiels d'action dendritiques locaux). Cette modulation de la nature même de l'intégration est liée à l'augmentation, par un facteur dix, de la densité des canaux HCN (canaux cationiques non sélectif, modulés par les nucléotides cycliques et activés par hyperpolarisation) de la dendrite apicale (Atkinson et Williams, 2009).

Les interneurones corticaux sont également impliqués dans la modulation des signaux dendritiques des neurones pyramidaux et assurent le contrôle des variations de l'excitabilité neuronale (Larkum et al., 2001). En plus du mécanisme d'inhibition shuntante décrit précédemment (Mody, 2005), l'activation d'interneurones ciblant la zone proximale de la dendrite apicale (*e.g.* cellules en panier), permet de modifier l'amplitude des signaux dendritiques (Xiang et al., 2002).

Enfin, il ne faut pas exclure que la régulation génique de l'expression des protéines dendritiques puisse moduler l'intégration, en particulier si des signaux intracellulaires générés au niveau synaptique sont transmis au noyau, et *vice versa* (pour revue : Bramham et Wells, 2007).

2) Intégration dendritique, computation et cognition

2.1) Dendrites : des unités de traitement spécialisées ?

Lors du visionnage d'un film, le cerveau doit décoder une image toutes les 50 ms, et extraire en permanence les différences entre deux images successives. Cet exemple simple peut donner une idée du traitement computationnel réalisé par les neurones d'intégration sensorielle. En raison de la grande convergence du système (thalamus ➢ réseaux corticaux des couches 4/6 et 2/3 ➢ couche 5 ; *voir la partie I de cette Introduction*), il est fort probable que l'arborisation dendritique d'un neurone pyramidal de couche 5 du cortex visuel reçoive des centaines de milliers d'entrées synaptiques (« bombardement synaptique ») et qu'elle soit ainsi « noyée » dans le bruit de l'activité des réseaux afférents (Destexhe et Pare, 1999 ; Haider et McCormick, 2009). Les neurones de couche 5 n'ayant qu'un axone de sortie, ils doivent extraire l'information essentielle et suffisante à partir de la masse d'entrées synaptiques afférentes. Pour parvenir à un tel niveau d'efficacité, il faut considérer la diversité des processus et des niveaux d'intégration décrits dans le chapitre précédent, comme une possibilité pour le neurone de constituer des unités de traitement de l'information autonomes, et distinctes les unes des autres (figure 30a ; London et Häusser, 2005). Par exemple, l'importance physiologique de la « détection de coïncidence » a été révélée chez le poussin, où elle permet la localisation des sons (Agmon-Snir et al., 1998). Dans ce cas, les neurones auditifs intègrent les différences de délai du stimulus sonore provenant des deux oreilles, en comparant l'information reçue indépendamment par deux dendrites spécialisés, chacune recevant l'information sensorielle provenant d'une seule oreille.

D'une façon plus générale, le rôle des unités de traitement dendritiques dans le décodage d'un stimulus visuel et dans son traitement cognitif (*e.g.* reconnaissance de visage) reste malgré tout mal compris (figure 30b).

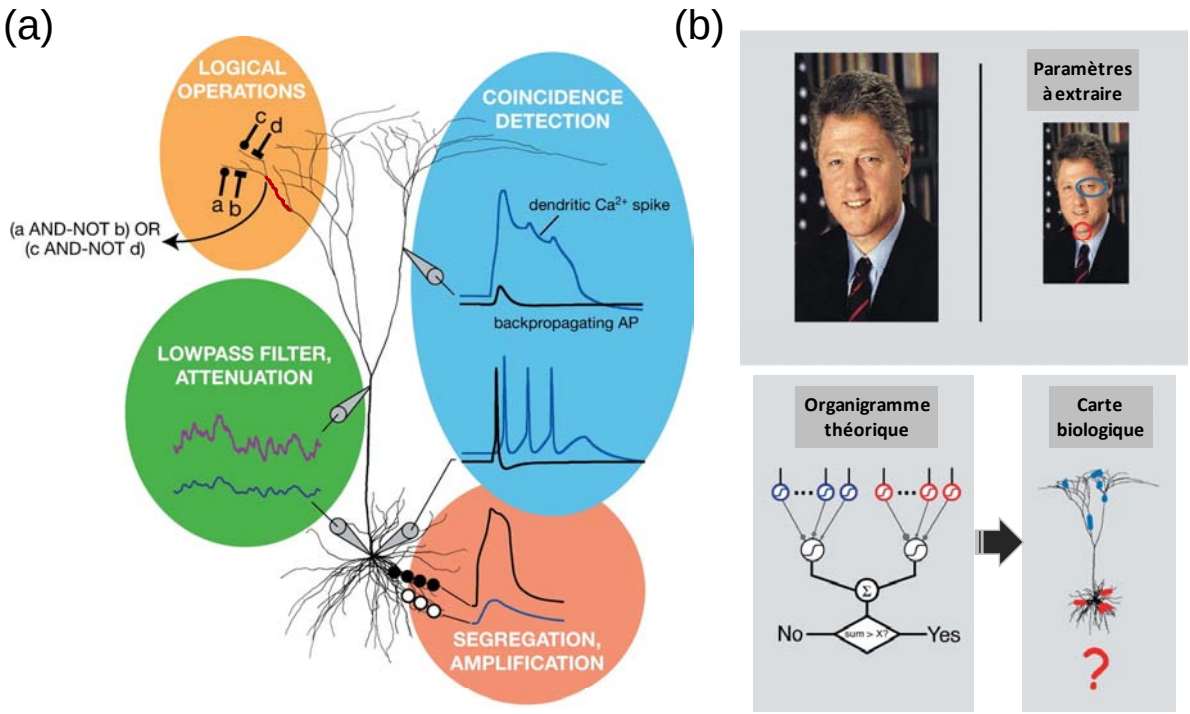


Figure 30. L'intégration dendritique comme boîte à outils computationnelle

(**a**) Schéma résumant les mécanismes dendritiques coexistant dans un neurone pyramidal de couche 5, et pouvant être actifs en parallèle ou de manière hiérarchisée. *Zone verte* : filtre passe-bas atténuant l'amplitude et les fluctuations (lissage) des signaux qui se propagent sur la dendrite apicale. *Zone orange* : Opérateurs dendritiques logiques de types « OR », « AND » et « NOT ». Les sous-branches somment les entrées synaptiques *a* (excitation) et *b* (inhibition) d'une part et *c* (excitation) et *d* (inhibition) d'autre part. La branche dendritique réceptrice en aval (*surlignée en rouge*) transmettra « OU » ne transmettra pas le signal en fonction de l'intégration réalisée dans les sous-branches en amont. Ainsi, les sous-branches « injecteront » le courant correspondant dans la branche réceptrice uniquement si elles reçoivent l'excitation (« ET ») et non l'inhibition (« PAS »). Les signaux inhibiteurs *c* et *d* sont reçus en aval des signaux excitateurs *a* et *b* ; ce schéma considère des entrées synaptiques de même poids. *Zone rose* : Amplification ou réduction des entrées synaptiques lorsqu'elles sont reçues sur une même branche (sommation supra-linéaire). Au contraire, la ségrégation des entrées synaptiques reçues sur des branches distinctes assurera une sommation linéaire. *Zone bleu* : Détecteur de coïncidence renforçant la fidélité temporelle de l'intégration. La coïncidence entre une entrée synaptique distale et un potentiel d'action rétropropagé (trace noire) permet le déclenchement d'un potentiel d'action dendritique calcique (trace bleue supérieure), qui dépolarise l'ensemble de la dendrite apicale et conduit au déclenchement d'un nouveau signal de sortie (train de potentiels d'action somatiques, trace bleue inférieure).

(**b**) Traitement cognitif et intégration dendritique. La perception et la reconnaissance d'un visage requièrent le recrutement de nombreux réseaux neuronaux, dont les signaux de sortie convergent probablement vers un neurone d'intégration unique. L'organigramme théorique qui découle de ce

postulat propose un modèle d'intégration à « trois couches » neuronales avec convergence vers un neurone d'intégration final (Σ). Le signal de sortie de ce dernier conduit à la réponse cognitive, qui est ici, de type « OUI » le visage est reconnu, ou « NON » il ne l'est pas. Dans cet exemple, seul deux paramètres sont analysés (cercles rouge et bleu sur la photo, et réseaux de neurones correspondants sur l'organigramme). *En bas à droite* : la cartographie de cet algorithme théorique sur la morphologie dendritique des neurones pyramidaux de couche 5 reste inconnue. L'information transmise par les réseaux neuronaux en amont, converge-t-elle vers des compartiments dendritiques à la fois distincts et spécialisés (ségrégation spatiale des deux paramètres analysés – rouge et bleu – mais regroupement des entrées synaptiques associées à chaque paramètre) ?

Adapté d'après London et Häusser 2005, Annu Rev Neurosci.

2.2) De la dendrite apicale à la cognition ?

Malgré les nombreuses études consacrées à la fonction dendritique (*voir le chapitre 1 p.79*, et pour revue : Migliore et Shepherd, 2002 ; Sjöström et al., 2008), aucune évidence n'existe sur le rôle cognitif particulier de la longue dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5. Chez l'homme, la dendrite apicale est sept fois plus longue que les dendrites basales (LaBerge, 2005). L'étude morphologique de l'épaisseur des couches corticales chez différentes espèces (Rockel et al., 1980) peut donner une estimation des variations de la longueur de la dendrite apicale au cours de l'évolution. Il apparaît ainsi une augmentation constante de sa longueur, depuis la souris jusqu'à l'Homme en passant par le rat et le singe (LaBerge, 2005). La dendrite apicale des neurones pyramidaux de rats est, par exemple, deux fois moins longue que celle de l'Homme et contient environ 3000 synapses excitatrices, soit un tiers du total des synapses de l'arborisation dendritique (DeFelipe et Farinas, 1992). Ces arguments ont favorisé l'émergence d'une théorie dendritique (apicale) de la cognition (LaBerge, 2006 ; LaBerge et Kasevich, 2007). Dans ce modèle, la dendrite apicale est considérée comme l'élément central de la colonne corticale (*voir la partie I de cette Introduction*) qui permet d'interconnecter fonctionnellement les différentes aires cérébrales nécessaires à la cognition. Ce modèle prévoit également que la longueur importante de la dendrite apicale, qui est à l'origine de l'atténuation passive marquée des EPSPs (*voir le paragraphe 1.3.1.1 p.83*), assurerait (i) une diminution de la variabilité du potentiel membranaire au niveau somatique, dans un environnement cortical chaotique (*i.e.* amélioration du rapport signal/bruit) ; (ii) le maintien du potentiel membranaire dans la gamme sous-liminaire (afin d'éviter les réponses erronés à l'état basal) ; et (iii) la stabilisation

in fine, de l'excitabilité des colonnes corticales interconnectées et des microcircuits thalamocorticaux.

3) La boucle d'intégration sensorielle

En plus des propriétés dendritiques passives (théorie de câble, distributions des conductances dendritiques), l'inhibition shuntante, l'état d'activité des canaux dendritiques sensibles au potentiel, les potentiels d'action dendritiques, les potentiels d'action rétropropagés et le principe de coïncidence, sont autant de mécanismes régulés par l'excitabilité dendritique. L'excitabilité dendritique intrinsèque des neurones d'intégration, tels les neurones pyramidaux de couche 5, apparaît donc fondamentale dans la détermination des signaux de sortie (*i.e.* transformation des entrées synaptiques en trains de potentiels d'action). A leur tour, les signaux de sortie peuvent réguler l'excitabilité dendritique et les réseaux synaptiques afférents par des rétroprojections récurrentes, qui viennent boucler la boucle d'interrelations entre activité réseau (*i.e.* entrées synaptiques), excitabilité dendritique et signaux de sortie (figure 31).

Dans la compréhension des mécanismes de modulation de l'intégration sensorielle, il devient donc essentiel de distinguer les effets dendritiques observés au niveau des neurones intégrateurs (*i.e.* neurone pyramidal de couche 5), des effets globaux observés à l'échelle d'un réseau neuronal afférant. Une question s'impose alors : quel est, parmi ces deux effets, celui qui a le plus de poids dans la modulation de la réponse d'une aire corticale primaire, à la stimulation sensorielle ?

Mesurer et décrire la fonction entrée/sortie d'un neurone pyramidal en présence d'une activité réseau chez l'animal éveillé, seraient une première étape vers une distinction fonctionnelle entre ces deux niveaux fondamentaux de modulation. La mesure de la balance entre excitation et inhibition dans un neurone réalisant l'intégration dendritique (*e.g.* neurone pyramidal de couche 5), suite à l'activation sensorielle ou corticale (*e.g.* stimulation électrique des couches d'entrées thalamiques), associée à l'enregistrement de la dynamique des signaux calciques dendritiques, est une autre possibilité.

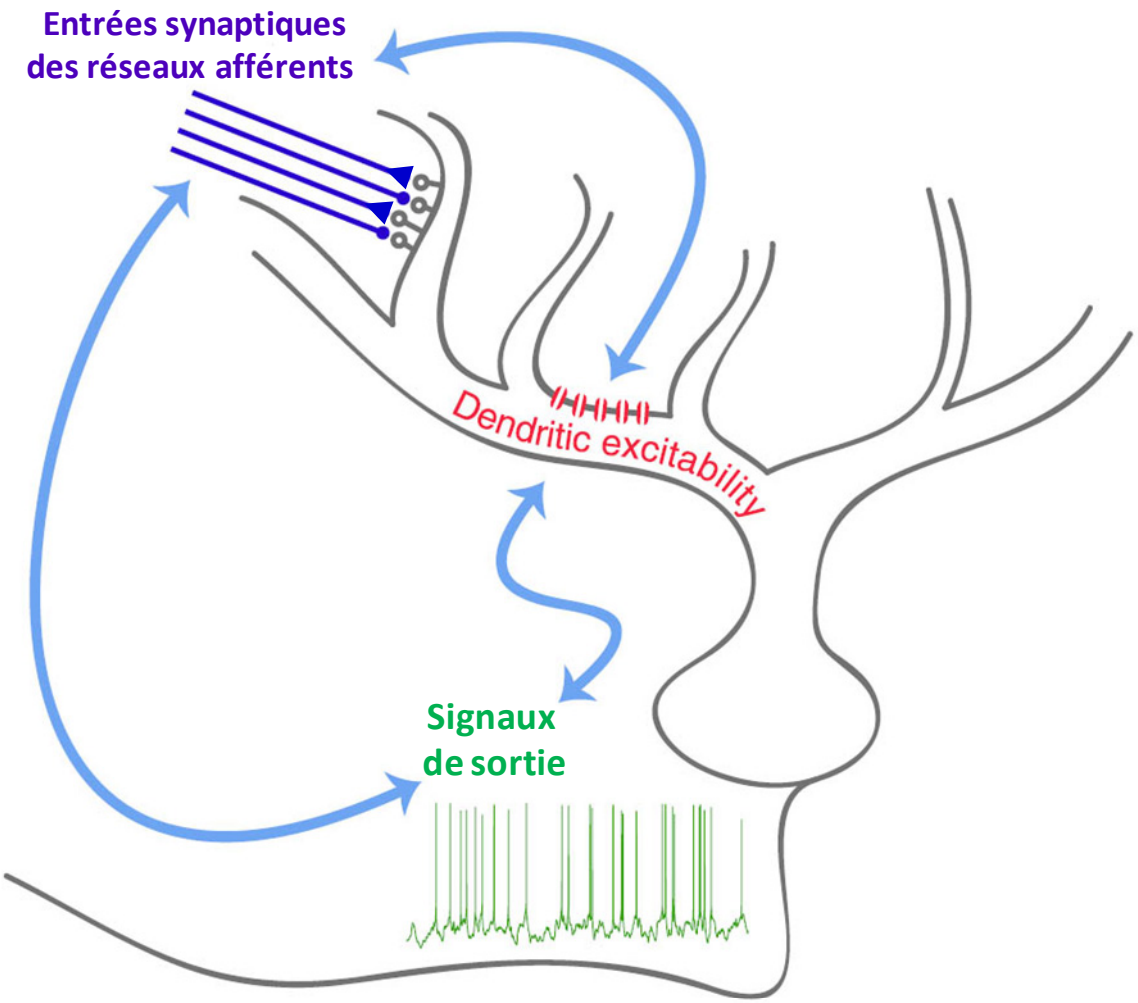


Figure 31. La boucle d'intégration corticale

Les flèches bleues indiquent les interrelations bidirectionnelles entre réseaux corticaux, excitabilité dendritique et signaux de sortie. Les entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices sont représentées par afférences se terminant en triangle et en rond, respectivement.

Modifié d'après Sjöström et al. 2008, Physiol Rev.

IV. La balance excitation-inhibition (E-I)

Le concept de balance entre excitation et inhibition (balance E-I, Hensch et Fagiolini, 2005) trouve toute son importance, au niveau des réseaux neuronaux corticaux, avec l'observation suivante. Que ce soit *in vitro* sur tranche corticale, ou *in vivo* chez l'animal anesthésié, la stimulation (électrique ou sensorielle) conduit dans la très grande majorité des cas à l'apparition rapide d'une vague d'excitation, suivi dans un délai très bref, d'une vague d'inhibition soutenue (Shao et Burkhalter, 1996 ; Marino et al., 2005 ; Wilent et Contreras, 2005; Le Roux et al., 2006 et pour revue : Monier et al., 2008). Les neurones pyramidaux de couche 5 fournissent la principale source de signaux de sortie corticaux, après intégration dendritique complexe des informations excitatrices et inhibitrices transmises par les réseaux neuronaux en amont (Binzegger et al., 2004 ; *voir les Parties I et III de cette Introduction*). Définir la balance E-I dans cette population neuronale apparaît donc essentiel pour comprendre le fonctionnement de la boucle d'intégration corticale (*voir la figure 31*).

1) Des épines dendritiques aux réseaux neuronaux

Bien que mes travaux de thèse portent sur l'étude de la balance E-I dans les neurones pyramidaux de couche 5 et à l'échelle d'un réseau neuronal actif, la notion de balance E-I peut être observée à différents niveaux d'organisation.

1.1) A l'échelle moléculaire et synaptique

Au niveau de l'épine dendritique, la balance d'expression de différentes protéines de la densité postsynaptique oriente la maturation synaptique vers un destin excitateur (PSD-95 + Neuroligin 1, 3 ou 4) ou plutôt inhibiteur (PSD-95 + Neuroligin 2) (Prange et al., 2004 ; Chih et al., 2005 ; et pour revue : Cline, 2005). La balance entre différents sous-types d'une même protéine de la densité postsynaptique (sous-types « E » et sous-types « I ») peut donc être un premier support à l'origine de la balance E-I observée au niveau dendritique (*voir ci-dessous*).

1.2) A l'échelle dendritique

A l'échelle de l'arborisation dendritique d'un neurone excitateur, le ratio entre synapses excitatrices et inhibitrices est de 4 pour 1 (Liu, 2004). D'autres travaux ont révélé que le nombre de synapses inhibitrices sur un neurone pyramidal ne représentait que 5 % du nombre de synapses total (Megias et al., 2001). Pour les interneurones inhibiteurs, le ratio serait plutôt de 8 à 9 pour 2 à 1, avec une réduction importante de la proportion des synapses excitatrices au niveau somatique (Gonchar et Burkhalter, 1999a,b ; Trevelyan et Watkinson, 2005). De plus, la « répartition » de la balance entre synapses excitatrices et inhibitrices sur l'axe somato-dendritique des neurones pyramidaux, n'est pas homogène (Megias et al., 2001), voire même inversée dans certains cas (*e.g.* E >> I au niveau somatique et I >> E dans la partie très proximale de la dendrite apicale).

1.2) A l'échelle de la population neuronale

De façon remarquable, un « ratio de population » semblable au « 4 pour 1 » dendritique précédent est observé à l'échelle de la population neuronale totale, avec environ 80 % de neurones glutamatergiques excitateurs et 20 % d'interneurones GABAergiques inhibiteurs dans le cortex (DeFelipe et Farinas, 1992, DeFelipe, 2002). L'orientation, à un moment donné du développement cérébral, des précurseurs neuronaux vers un destin excitateur ou inhibiteur (Ben-Ari, 2006), puis la sélection et le raffinement des connexions synaptiques préétablies (Katz et Shatz, 1996 ; Sanes et Lichtman, 1999), sont donc fondamentales pour la mise en place de la population neuronale adulte, ce qui déterminera la balance E-I, observée à l'échelle d'un réseau neuronal actif (*voir le paragraphe 1.4, page suivante*). Toute modification différentielle du nombre de neurones excitateurs et inhibiteurs par neurogenèse adulte (Cameron et Dayer, 2008 ; Spolidoro et al., 2009 ; Wang et Kriegstein, 2009), sera alors susceptible d'affecter la balance E-I. C'est par exemple le cas lors de la privation sensorielle, où la suture d'un œil peut modifier profondément l'organisation et l'efficacité des circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs du cortex visuel (Hubel et Wiesel, 1970 ; Daw et al., 1992 ; Fox, 1992 ; Desai et al., 1999, 2002 ; Maffei et al., 2006).

1.4) A l'échelle d'un réseau cortical actif

La balance E-I en tant que « ratio fonctionnel » – reflétant l'activité d'un réseau cortical, évoquée par stimulation électrique ou sensorielle et enregistrée au niveau d'un neurone pyramidal de couche 5 – est estimée à environ 20 % d'excitation et 80 % d'inhibition, que ce soit sur tranche corticale ou *in vivo* (Le Roux et al., 2006 ; Lucas Meunier et al., 2009 et pour revue : Monier et al., 2008). La stimulation de différents réseaux corticaux au sein de la colonne corticale (en couche 2/3, 4 ou 6) n'a, par ailleurs, pas révélé de changement de la balance E-I (Le Roux et al., 2006). La prépondérance contradictoire de l'inhibition dans la balance E-I est également observée lorsque l'on considère l'activité spontanée, et non plus évoquée, d'un réseau cortical (Rudolph et al., 2005).

2) Importance fonctionnelle de la balance E-I

Comme cela a été appréhendé dans la première partie de cette introduction, la mise en place des réseaux corticaux sensoriels dépend de l'inhibition, et plus particulièrement de la balance E-I (*voir la figure 10a page 43* ; Fagioliniet al., 2004 ; et pour revue : Hesnch et Fagiolini, 2004 ; Hensch, 2005 ; Akerman et Cline, 2007). Cependant, ces observations, la plupart du temps basées sur des données morphologiques, ne reposent pas sur une mesure précise de la balance E-I.

2.1) Dans l'intégration sensorielle

L'importance d'une balance entre signaux excitateurs et signaux inhibiteurs dans l'intégration sensorielle, a été mise en évidence *in vivo* à plusieurs reprises. C'est par exemple le cas, dans le système visuel, où la sélectivité à l'orientation (ou au déplacement) des neurones du cortex visuel primaire dépendent du recrutement « balancé » de l'excitation et de l'inhibition évoqués par le stimulus (Anderson et al., 2000 ; Martinez et al., 2002 ; Monier et al., 2003 ; Hirsch et al., 2003 ; Priebe et Ferster, 2005 ; Marino et al., 2005 ; ces travaux fournissent une mesure précise des conductances excitatrice et inhibitrice). Ces études ont révélé que la balance E-I permet un contrôle accru de la fidélité de l'émission des potentiels d'action, en réponse à un stimulus préférentiel pour un neurone donné. Il en va de même pour l'efficacité et la fidélité des réponses neuronales − à un stimulus sensoriel préférentiel − dans les cortex somatosensoriel ou auditif (Wehr et Zador, 2003 ; Zhang et al., 2003 ; Tan et al., 2004 ;

Higley et Contreras, 2005 ; Wilent et Contreras, 2005). Il est important de préciser que la balance des signaux excitateurs et inhibiteurs induite par la stimulation sensorielle, peut être basée sur des critères de fréquence (*i.e.* synchronisation des réponses, Wehr et Zador, 2003 ; Zhang et al., 2003) ou d'amplitude (Shu et al., 2003 ; Liu, 2004).
Le maintien d'un niveau de sélectivité sensorielle élevé, basé sur une stabilité de la balance E-I, apparaît donc comme le rôle majeur, et commun aux différents cortex sensoriels, de la balance E-I. Il faut cependant noter que la sélectivité à l'intensité du stimulus de certains neurones du cortex auditif dépend, au contraire, d'excitation et d'inhibition synaptiques « non-balancées » (Tan AY et al., 2007). La balance E-I permet, par ailleurs, de définir et d'entretenir une activité neuronale relativement stable à l'état basal (Shadlen et Newsome, 1998 ; van Vreeswijk et Sompolinsky, 1998 ; Durstewitz et al., 2000 ; Wang, 2001 ; Compte et al., 2003), qui peut toutefois être rapidement augmentée par des entrées synaptiques (Shu et al., 2003).

2.2) Dans les autres processus neuronaux

A d'autres niveaux, la balance E-I est impliquée dans la mémorisation à court terme (Durstewitz et al., 2000 ; Brunel et Wang, 2001 ; Egorov et al., 2002) ou à long terme (Saghatelyan et al., 2001), dans la régulation de l'excitabilité neuronale (Chance et al., 2002 ; Hahnloser et al., 2002) et dans la génération des activités rythmiques spontanées des différentes phases du sommeil (Steriade et al., 1993 ; Cowan et Wilson, 1994 ; Contreras et al., 1996 ; Sanchez-Vives et McCormick, 2000 ; Steriade, 2001b ; Compte et al., 2003).

3) Balance E-I et pathologies

L'importance physiologique de la balance E-I est telle que ses déséquilibres conduisent à diverses pathologies neurologiques dont la plus significative est l'épilepsie (Cossart et al., 2005 ; Bausch et al., 2006). Dans ce cas, le déséquilibre est une conséquence de la réduction, à la fois du nombre et de la force, des entrées inhibitrices ce qui conduit souvent à une alternance entre des états d'activité « stables » et d'autres « d'hyperexcitabilité » qui se manifestent par des troubles convulsifs (Brenner, 2004). Un déséquilibre de la balance E-I au niveau striato-thalamo-cortical peut aussi être à l'origine des troubles moteurs et cognitifs observés dans la maladie de Parkinson (Llinas et al., 1999).

Une dérégulation de la balance E-I a aussi été impliquée dans d'autres pathologies, comme l'autisme (Rubenstein et Merzenich, 2003 ; Rippon et al., 2007), le syndrome de Rett (Dani et al., 2005), le syndrome de Tourette (Singer et Minzer, 2003) et la schizophrénie (Wassef et al., 2003). Une diminution marquée de l'activité inhibitrice liée à l'âge dans le cortex visuel (par rapport à l'activité excitatrice), est enfin à l'origine d'une réduction de l'acuité visuelle chez le singe (Leventhal et al., 2003).

Ces quelques exemples sont autant d'évidences quant à la nécessité de maintenir un équilibre entre les signaux excitateurs et inhibiteurs dans les différentes régions cérébrales, afin d'obtenir un fonctionnement stable et harmonieux du système nerveux central.

4) Régulation homéostatique de la balance E-I

Chez la souris, la stimulation continue d'une vibrisse pendant vingt-quatre heures provoque une augmentation de plus de 30 % du nombre total de synapses dans le cortex somatosensoriel. Remarquablement, le nombre de synapses inhibitrices et le nombre de synapses excitatrices sont augmentés de telle façon que le ratio 1-4 soit maintenu (Knott et al., 2002, *et voir le chapitre 1 p.79*). Cet exemple révèle l'existence de mécanismes de régulation et de maintien de la balance entre synapses excitatrices et synapses excitatrices. Plus généralement, la balance E-I est maintenue par des mécanismes de plasticité homéostatique.

4.1) Définition d'un système homéostatique

Un système homéostatique possède un domaine d'activité fonctionnel optimal (ou « set-point »), des détecteurs de perturbation, et des mécanismes régulateurs (souvent de rétrocontrole) qui tendent à corriger les perturbations et assurent le maintien du système autour d'un « set-point » de fonctionnement. (Davis et Goodman, 1998 ; Turrigiano et Nelson, 2004). Si la balance E-I reflète l'activité d'un système homéostatique, le fonctionnement des réseaux neuronaux sera alors régulé pour tendre vers le « set-point ».

4.2) Mise en évidence de la plasticité homéostatique

Selon le modèle établit par Turrigiano et Nelson (2000) sur des neurones en culture, la plasticité homéostatique régule l'efficacité globale de la transmission d'un grand nombre de synapses afin de maintenir le niveau d'excitabilité du réseau cible proche de son « set-point »

(figure 32a). De cette façon, lorsque l'activité d'une ou de plusieurs synapses sur neurone postsynaptique est modifiée de façon trop importante (*e.g.* par des phénomènes de plasticité de type LTP ou LTD*)*, des mécanismes compensatoires sont recrutés (*e.g.* variation du nombre ou de l'efficacité des synapses excitatrices et/ou inhibitrices, neurogenèse et insertion de nouveaux neurones, modification du phénotype neuronal excitateur ou inhibiteur, mort cellulaire programmée), afin de contrebalancer ces changements et de normaliser l'excitabilité neuronale (Turrigiano et Nelson, 2000 ; Marder et Prinz, 2002 ; Burrone et Murthy, 2003 ; Liu et al., 2003 ; Turrigiano et Nelson, 2004 ; Doetsch et Hen, 2005 ; Gomez-Lira et al., 2005 ; Meltzer et al., 2005 ; Wierenga et al., 2005 ; Davis, 2006 ; Turrigiano, 2007 ; Nelson et Turrigiano 2008 ; Le Roux et al., 2008a). On parle alors de « synaptic scaling » ou ré-échelonnement synaptique (Turrigiano et al., 1998). Par exemple, à l'échelle d'un réseau neuronal en culture, la suppression de l'activité d'un neurone (par surexpression ciblée d'un canal potassique) provoque, après plusieurs heures, une augmentation du nombre de synapses actives et des courants postsynaptiques excitateurs sur ce neurone (Burrone et al., 2002). L'augmentation ou la diminution de l'activité globale d'un réseau neuronal (par dépolarisation KCl ou blocage des potentiels d'action sodiques par la tétrodotoxine pendant 48h) entraîne un réajustement de l'efficacité des connexions excitatrices ou inhibitrices pour revenir au niveau d'activité initial (figure 32b ; Turrigiano et al., 1998).

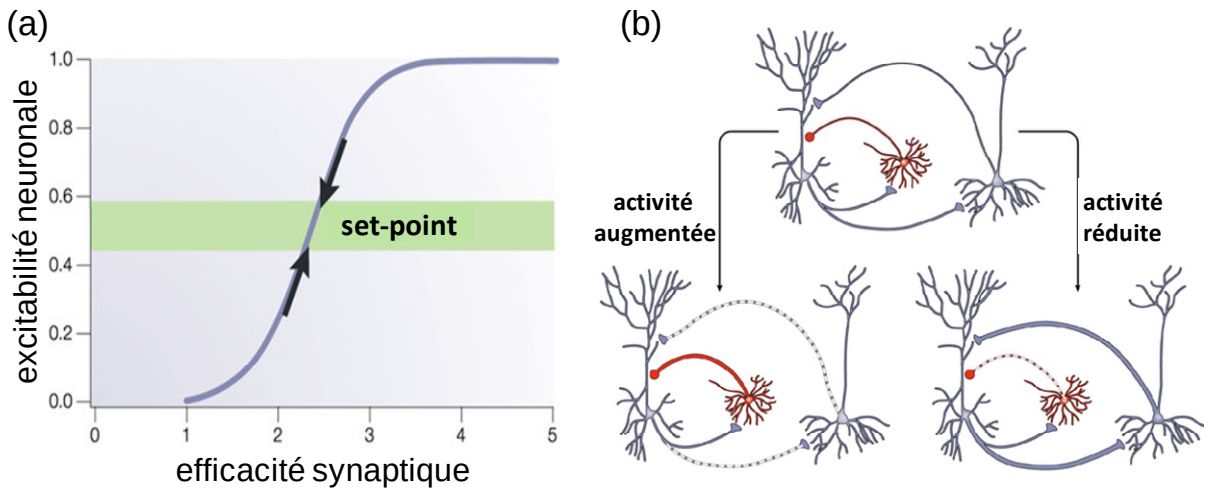


Figure 32. Régulation homéostatique de l'activité des réseaux neuronaux

(**a**) Représentation du « set-point » d'excitabilité neuronale (bande verte) qui est maintenu par des mécanismes de régulation homéostatique (flèches noires) de l'efficacité synaptique. Toute diminution de l'excitabilité neuronale, en dehors de la fenêtre déterminée par le « set-point », sera compensée par une augmentation de l'efficacité des synapses afférentes sur le neurone d'intérêt, afin de réintégrer le « set-point » de fonctionnement de ce dernier. Et inversement lorsque l'excitabilité neuronale dépasse la limite supérieure du « set-point ».

(**b**) A l'échelle d'un réseau neuronal, la plasticité homéostatique peut s'exprimer par des modifications du poids (*i.e.* de l'efficacité) de certaines connexions synaptiques, ce qui maintient constante la balance E-I. Dans ce réseau simplifié (en haut), un neurone pyramidal (bleu, à gauche) est activé par un autre neurone pyramidal en amont (à droite), et recrute en aval un interneurone inhibiteur (rouge). Ce dernier établit une boucle de rétrocontrôle négatif sur le premier neurone pyramidal. En cas d'activité du réseau trop importante (dépolarisation KCl pendant 48h, en bas à gauche), l'efficacité du rétrocontrôle inhibiteur (rouge) est augmentée tandis que l'efficacité des connexions excitatrices (gris) est diminuée. Et réciproquement en cas de trop faible activité du réseau (après 48h de blocage des potentiels d'action par application de TTX, en bas à droite).

Adapté d'après Turrigiano et Nelson 2004, Nature Rev Neurosci.

4.3) Régulation homéostatique de la balance E-I dans le cortex visuel

Sur tranches de cortex visuel de rat, l'induction d'une plasticité à long terme (de type LTP ou LTD, par stimulation à haute ou basse fréquence) sur certaines synapses d'un réseau neuronal de couche 2/3 ou de couche 6 ne modifie pas la balance E-I préalablement déterminée dans les neurones pyramidaux de couche 5, suite à la stimulation de ces mêmes réseaux (les entrées excitatrices et inhibitrices sont potentiées en même proportions, Le Roux et al., 2006). Ainsi, la balance E-I apparaît régulée de façon homéostatique, et les mécanismes mis en jeu requièrent l'activation des récepteurs NMDA et des récepteurs $GABA_A$ (Le Roux et al., 2007, 2008a et pour revue Le Roux et al., 2008a). Le « set-point » de la balance E-I est, dans ce cas, défini à 20 % d'excitation et 80 % d'inhibition. Ce « set-point », déterminé au niveau somatique, reflète l'activité du réseau cortical stimulé en amont du neurone pyramidal de couche 5, et renseigne sur l'excitabilité de ce dernier (*i.e.* la probabilité que l'intégration d'une nouvelle entrée synaptique par ce neurone déclenche une réponse somatique sous forme de potentiels d'action) après intégration dendritique.

Du point de vue physiologique, la régulation homéostatique de la balance E-I permettrait :
(i) d'éviter les épisodes d'hyper- ou d'hypoactivité pendant les phases d'apprentissage ou de mémorisation, en maintenant l'activité du réseau proche de son « set-point »,
(ii) de répondre efficacement à la stimulation sensorielle par une modification rapide de la balance autour de son « set-point », sans trop s'en écarter,
(iii) une normalisation de l'activité du réseau quasi immédiate (*i.e.* 15 min), contrairement au « synaptic scalling » présenté précédemment,
et remplirait, *in fine*, les conditions d'un système homéostatique type (Davis, 2006).

MATÉRIEL

ET

MÉTHODE

Cette section a pour but de décrire la méthode utilisée pour déterminer la balance E-I ainsi que les paramètres importants qui lui sont associés. Toutes les autres méthodes sont décrites en détail dans la publication Moreau et al. 2009, *Cereb Cortex*.

∴

1) Identification des neurones et enregistrements électrophysiologiques

Des tranches parasagittales de cortex visuel (250 µm) ont été obtenues, par dissection et selon les règles d'éthique européennes en vigueur, à partir de rats Wistar agés de 19 à 25 jours. Une heure environ après la dissection, les tranches corticales sont placées dans une chambre de perfusion fixée sur la platine X/Y désolidarisée d'un microscope droit (Axioscope 2 FS+, Zeiss), équipé d'une caméra vidéo et d'un système d'amélioration du contraste interférentiel (DIC), et continuellement perfusées par une solution oxygénée de liquide céphalorachidien artificiel. Le suivi optique du patch est réalisé à l'aide d'un objectif 40x à immersion à eau et à grande distance de travail.

L'activité des neurones pyramidaux de couche 5, identifiés par la morphologie caractéristique de leur soma et de leur dendrite apicale ainsi que par leur profil de décharge, est enregistrée en *patch clamp*, en configuration « cellule entière ». Les enregistrements sont réalisés à température ambiante (20-23°C) avec des pipettes en borosilicate (étirées avec une étireuse horizontale P-97, Sutter Instruments) remplies d'une solution intracellulaire contenant (en mM) : 140 K-gluconate ; 140 KMSO4 ; 10 HEPES ; 4 ATP ; 2 MgCl2 ; 0,4 GTP et 0,5 EGTA (pH 7,3 ajusté avec du KOH, 270-290 mOsm). La résistance des pipettes, contrôlée dans le bain, est de 3 à 5 MΩ. Le potentiel de jonction (d'environ -10 mV avec les milieux utilisés) est compensé lors de l'analyse des enregistrements (*voir le paragraphe 3.1.1 p.114*).

Les enregistrements en courant imposé (« current clamp ») et en potentiel imposé (« voltage clamp ») sont réalisés avec un amplificateur Multiclamp 700A (Axon Instruments, USA), filtrés par un filtre passe-bas ayant une fréquence de coupure de 2 kHz, et échantillonnés à 4 kHz par le système Digidata 1322A (Axon Instruments, USA).

Le profil de décharge des neurones est déterminé en courant imposé, en réponse à un échelon de courant dépolarisant échelonné de 25 pA sur une plage allant de -100 à 200 pA, et appliqué pendant1000 ms (voir la figure 34b p.116).

2) Protocoles de stimulation

2.1) Positionnement

Deux paires d'électrodes de tungstène bipolaires de 1 MΩ d'impédance (TST33A10KT, WPI) sont positionnées à la surface de deux sites de traitement des entrées thalamiques : en couche 2/3 et en couche 6 du cortex visuel primaire. Ces deux positions permettent de recruter deux ensembles de microcircuits corticaux différents, projetant tous deux sur le neurone pyramidal de couche 5 enregistré (figure 33a). Les stimulations électriques sont délivrées par deux stimulateurs à potentiel constant (DS2A-Mk.II, Digitimer).

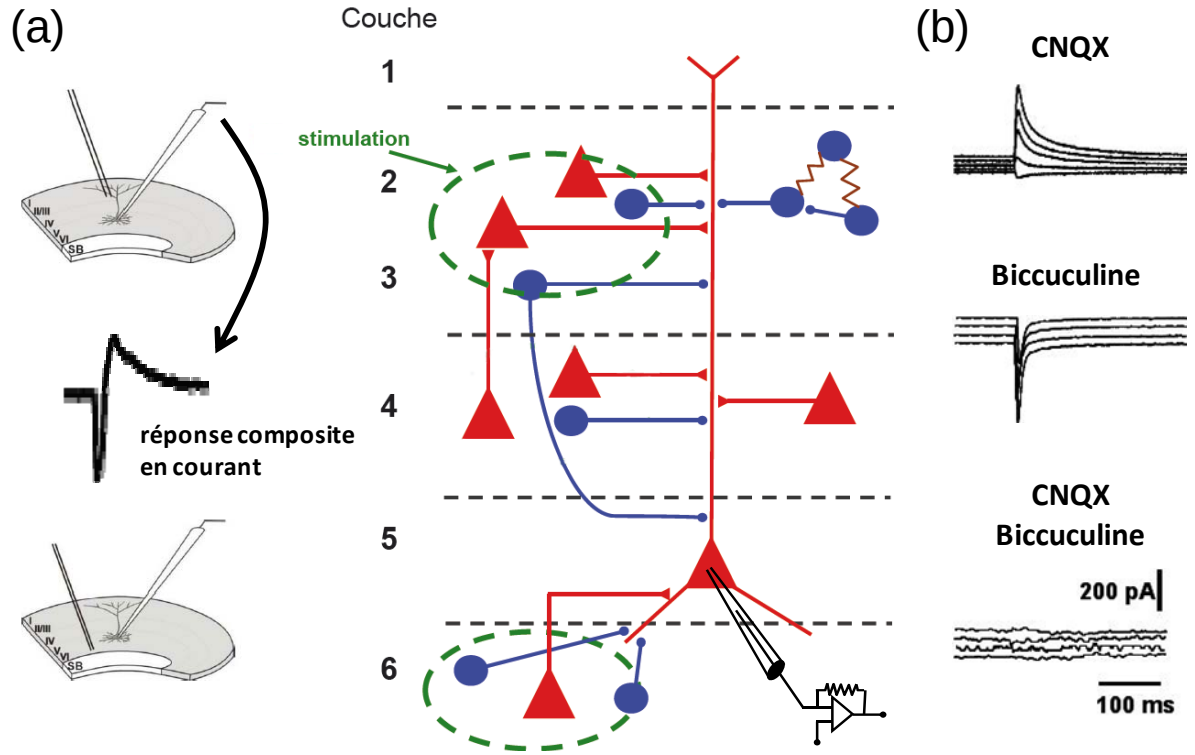


Figure 33. Enregistrement des réponses composites somatiques

(**a**) Représentation schématique et très simplifiée des deux sites de stimulation. La stimulation électrique, appliquée par les électrodes bipolaires, permet de co-activer (cercles pointillés verts) les microcircuits excitateurs (rouge) et inhibiteurs (bleu) qui projettent sur le neurone pyramidal de couche 5, où la réponse composite évoquée est enregistrée en *patch clamp* cellule-entière (en potentiel imposé). La stimulation est appliquée soit en couche 2/3, soit en couche 6.

(**b**) Caractérisation pharmacologique de la réponse composite. Enregistrement des réponses en courant d'un neurone pyramidal de couche 5 à la stimulation électrique de la couche 2/3 à différents niveaux de potentiel imposé (de – 65 à – 80 mV). La réponse en courant, en condition contrôle, est biphasique et présente une composante entrante glutamatergique et une composante sortante GABAergique. L'application de CNQX (bloqueur des récepteurs AMPA/kaïnate) supprime la composante excitatrice. L'application de bicuculline (bloqueur des récepteurs $GABA_A$) supprime la composante sortante. L'application conjuguée de CNQX et de bicuculline supprime la réponse.

2.2) Protocole pour la détermination la balance E-I

Le protocole utilisé pour déterminer la balance E-I consiste en des stimulations sous-liminaires (1-10 µA) de 0,2 ms délivrées, après 15 min d'équilibration du *patch*, à une fréquence de 0,05 Hz. L'intensité de la stimulation est ajustée en courant imposé afin de co-activer les microcircuits excitateurs et inhibiteurs sans déclencher de potentiel d'action dans le neurone enregistré (figure 33a). La réponse composite des neurones pyramidaux de couche 5 à ces stimulations est enregistrée en potentiel imposé (configuration cellule-entière) et est moyennée, pour 5 à 7 potentiels (autour du potentiel de repos du neurone) et à raison de 4 à 6 répétitions par potentiel, en vue de leur future décomposition (réalisée hors acquisition, *voir le paragraphe 3.2 p.117*). Une répétition plus importante des stimulations peut toutefois être nécessaire lorsque la réponse évoquée est moyennement stable.

Les réponses composites se caractérisent par un courant entrant glutamatergique (AMPA/kaïnate), suivi par un courant sortant GABAergique ($GABA_A$) soutenu (figure 33b). Les séries de stimulations sont appliquées dans un premier temps en couches 2/3, puis dans un deuxième temps et de façon identique en couche 6.

Afin de déterminer les modulations de la balance E-I, un enregistrement est réalisé après les 15 minutes d'équilibration du *patch* puis, dans les mêmes conditions, après 15 minutes de perfusion d'une drogue d'intérêt.

2.3) Protocole pour l'étude de la régulation homéostatique de la balance E-I

Pour les expériences de plasticité homéostatique, des protocoles de stimulation à haute fréquence (HFS, « High Frequency Stimulation ») sont appliqués en couche 2/3 et sont du type « theta burst », classiquement utilisé sur d'autres préparations (Abraham et Huggett, 1997). Ils consistent en 3 trains de 13 bouffées appliqués à une fréquence de 5 Hz, chaque bouffée contenant 4 impulsions à 100 Hz.

Un enregistrement contrôle (avant HFS) est réalisé avec le premier protocole (0,05 Hz, 0,2 ms ; *voir le paragraphe précédent*) puis un enregistrement, toujours avec ce premier protocole, est réalisé 15, 30, 45, et 60 min après application du protocole HFS. Ceci permet de déterminer la balance E-I, avant et après modification du poids de certaines synapses dans le réseau simulé, et d'étudier les éventuelles modulations de sa régulation homéostatique. Pour cela, une drogue d'intérêt est perfusée avant l'application du protocole HFS et après avoir réalisé un premier enregistrement avec le protocole de détermination de la balance E-I.

La séquence de résultats obtenue est alors la suivante : balance E-I « contrôle » - balance E-I « avec drogue / avant HFS » - balance E-I « 15, 30, 45 et 60 min après HFS, avec drogue ». Cette série de résultats est toujours comparée aux valeurs de balance obtenues avec le protocole HFS dans une série contrôle (perfusion du milieu extracellulaire seul).

3) Analyse des réponses synaptiques

3.1) Paramètres intrinsèques à la technique et au neurone enregistré

Différents paramètres, en rapport avec la technique d'enregistrement utilisée et avec les propriétés intrinsèques du neurone enregistré, doivent être mesurés avant l'analyse des réponses composites et la détermination de la balance E-I.

3.1.1 Le potentiel de jonction

Le potentiel de jonction décrit par Neher (1992) résulte de la différence de mobilité des ions à l'interface entre deux solutions différentes. Dans nos conditions, le milieu intrapipette est riche en ions K^+-gluconate, ce qui induit une différence de potentiel de 10 mV entre la l'extrémité de la pipette d'enregistrement et la solution extracellulaire de perfusion (pauvre en ions K^+). Avant tout enregistrement, le potentiel de pipette est ajusté à 0 mV pour compenser le potentiel de jonction. Après le passage en configuration cellule entière, le milieu intracellulaire est rapidement dialysé par le milieu intrapipette, éliminant alors le potentiel de jonction. Ainsi, lors de l'analyse, tous les résultats sont corrigés par la valeur du potentiel de jonction qui a été vérifiée expérimentalement (*i.e.* -10 mV).

3.1.2 La dérive du potentiel de l'électrode

Le potentiel de pipette (établi entre l'électrode et la masse, et ajusté à 0 mV en début d'expérience) est mesuré en fin d'expérience, après la rupture du *patch*. Si la valeur observée est différente de zéro, la différence provient d'une dérive du potentiel de l'électrode qui survient le plus souvent au moment du passage en configuration cellule entière. Par la suite, tous les potentiels enregistrés sont corrigés de cette valeur lors de l'analyse. Lorsqu'un changement de potentiel de repos a été observé au cours des expériences, le protocole d'enregistrement en courant imposé a été appliqué à la cellule afin de s'assurer que le seuil de

décharge du neurone était constant et que ce changement de potentiel n'était pas dû à la dérive du potentiel de l'électrode.

3.1.3) La résistance série

La résistance d'accès (Ra) est la résistance à l'écoulement du courant entre la pipette et le cytoplasme du neurone enregistré (elle est en partie liée à la forme de la pointe de la pipette). La résistance externe (Rex) est liée à la masse et peut être négligée en configuration cellule-entière. La somme de la résistance pipette (*voir le chapitre 1*) et de la résistance d'accès est appelée résistance série (Rs). La résistance de pipette (Rp) étant fixe et connue (entre 3 et 5 MΩ) tout changement de la résistance série reflète une variation de la résistance d'accès (*i.e.* de la qualité du scellement). Globalement plus l'excision de la membrane par l'électrode d'enregistrement est importante, plus la résistance série est faible. Tous les neurones retenus dans cette étude ont été enregistrés avec une résistance série inférieure à 25MΩ.

Rs est initialement déterminée en mode courant imposé, par application d'un créneau de courant et par balancement du pont de Wheastone de l'amplificateur jusqu'au point de rupture de la pente qui sépare la résistance due à l'électrode d'enregistrement (Rs) de celle due à la cellule (résistance membranaire d'entrée, Rm) (figure 34a). La résistance série ne pouvant pas être compensée efficacement lors des enregistrements réalisés en potentiel imposé, elle est compensée lors de l'analyse. Ceci passe par une correction du potentiel imposé (Vhc) par la résistance série selon la relation : Vhc(t) = Vh(t) - I(t) x Rs ; dans laquelle Vh(t) est le potentiel imposé à l'instant t et I(t) est le courant enregistré à ce même instant. Afin de suivre les variations de la qualité du scellement (inévitables lors des protocoles d'enregistrement de longue durée), la valeur de résistance série est déterminée avant chaque enregistrement des réponses composites (réalisé en potentiel imposé). Elle est également vérifiée après acquisition – et corrigée le cas échéant – par l'analyse de la réponse en potentiel à un bref saut de courant hyperpolarisant appliqué au repos (juste avant le saut de courant dépolarisant, nécessaire à la caractérisation du profil de décharge du neurone enregistré, *voir le chapitre 1*) (figure 34b). Cette réponse est analysée avec la somme de deux exponentielles, la première (au décours temporel rapide) permettant d'ajuster la réponse de l'électrode et d'extraire Rs, et la deuxième permettant d'ajuster la réponse membranaire et d'extraire deux paramètres intrinsèques au neurone enregistré : la résistance d'entrée de la membrane (Rm) et sa constante de temps (τm).

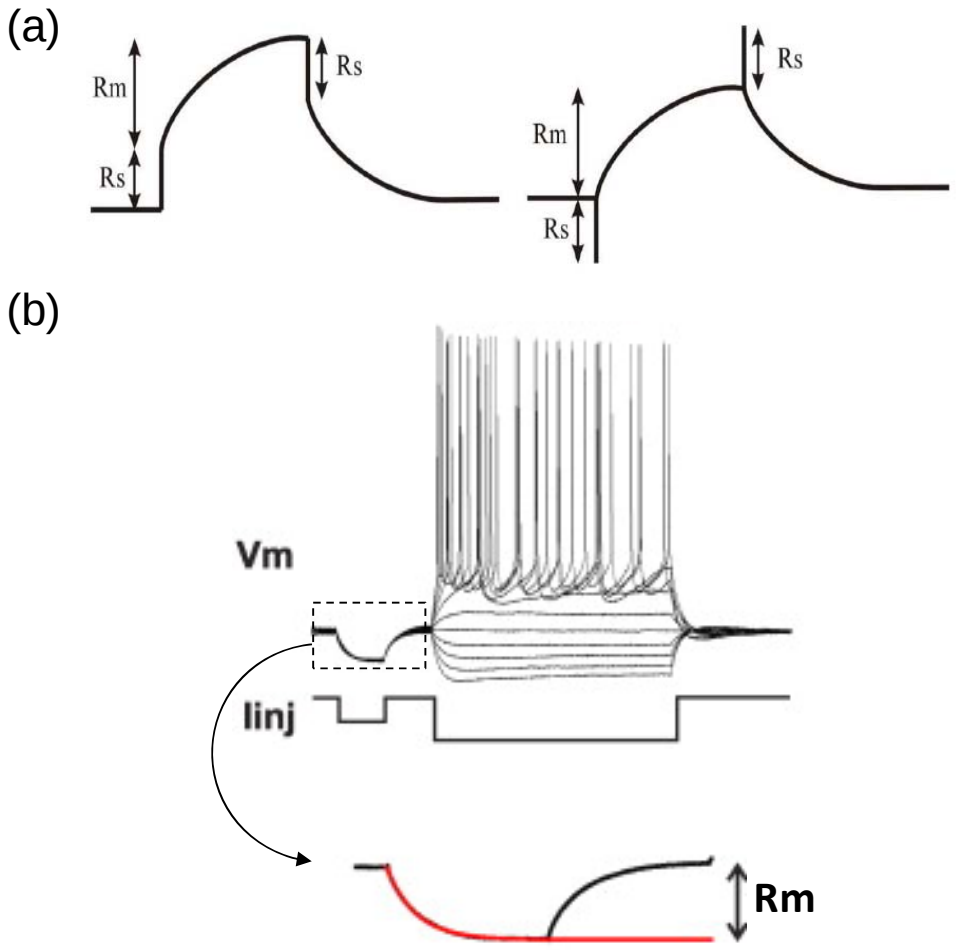


Figure 34. Profil de décharge et détermination des résistances série et membranaire du neurone pyramidal de couche 5

(**a**) Compensation de la résistance série (Rs) en mode courant imposé. La Rs est compensée visuellement par balancement du pont de Wheastone de l'amplificateur, jusqu'au point de rupture de pente qui sépare Rs de la résistance membranaire Rm.

(b) Caractérisation du profil de décharge d'un neurone pyramidal de couche 5 (Vm) par injection d'un saut de courant dépolarisant de 1000 ms (Iinj). Un bref créneau hyperpolarisant est aussi appliqué au préalable, puis la réponse en potentiel correspondante est ajustée, après acquisition, avec la somme de deux exponentielles pour extraire Rm (en rouge) et Rs (non représenté).

3.1.4) La relation courant-potentiel (courbe I/V)

A partir des réponses composites enregistrées à plusieurs potentiels imposés (figure 35-A), des courbes I/V sont faites en chaque instant (t) de la réponse (figure 35-B). Le calcul de la pente de la courbe I/V, en chaque point de la réponse, donne alors le profil du changement de la conductance membranaire du neurone pyramidal de couche 5 (« g(t) », d'après la loi d'Ohm: U = RI = I/G), évoqué par la stimulation des couches 2/3 ou 6 (figure 35-C).

Ici, les courants membranaires (Im(t)) correspondent à la mesure, à chaque instant t de la réponse évoquée, du courant injecté par l'amplificateur pour maintenir Vm égal aux différents potentiels imposés (5 à 7 niveaux, *voir le chapitre 2*). Il est important de préciser que la courbe I/V déterminée au pic de la réponse, est linéaire entre – 100 mV et + 30 mV, c'est-à-dire dans le domaine d'excursion expérimental (*i.e.* les potentiels imposés autour du potentiel de repos des neurones pyramidaux de couche 5) qui est généralement compris entre -90 mV et -40 mV (figure 36a). Seuls les neurones présentant des courbes I/V dont le coefficient de corrélation de Pearson (pente des régressions linéaires) est supérieur à 0,95 sont conservés pour la décomposition de la conductance totale (gT).

3.2) Décomposition des réponses composites évoquées

Les enregistrements sont analysés avec le logiciel spécialisé Elphy™, développé par Gérard Sadoc (UNIC-CNRS). La méthode est basée sur une mesure continue des changements de conductance d'une réponse somatique globale évoquée par un stimulus, comme décrit initialement *in vivo* dans le cortex visuel de chat par Borg-Graham et al. (1998) et Monier et al. (2003), dans le cortex auditif primaire de rat par Wher et Zador (2003) et sur tranches de cortex préfrontal et occipital de furet par Shu et al. (2003). Pour une revue complète sur la méthode, voir Monier et al., 2008. Cette méthode permet de déterminer la contribution des conductances excitatrice et inhibitrice dans la réponse globale sans aucun blocage pharmacologique de l'une ou l'autre des deux composantes, ce qui permet de maintenir les interactions fonctionnelles entre neurones glutamatergiques et interneurones GABAergiques au sein des microcircuits corticaux ; interactions qui sont par ailleurs essentielles au bon fonctionnement des processus neuronaux (Kullmann et Lamsa, 2007).

A partir des courbes I/V déterminées à chaque instant (t) de la réponse composite (figure 35-B), le changement de conductance total gT(t) est dérivé de la conductance d'entrée en retranchant la valeur de la conductance membranaire au repos (g_{rest}) (figure 35-C). Dans nos conditions expérimentales, l'activité spontanée globale étant très faible, l'activité synaptique de repos est nulle. C'est pourquoi g_{rest} est estimée sur 90 ms avant le début de la stimulation.
Le potentiel d'inversion apparent de la réponse, mesuré au niveau somatique $E_{syn}(t)$, est déterminé à l'abscisse du point d'intersection entre, d'une part, la courbe I-V obtenue à chaque instant (t) après stimulation et, d'autre part, la courbe I-V obtenue au repos (figure 35-B). Considérant que le changement de conductance somatique évoqué reflète l'intégration de

l'ensemble des entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices ayant atteint le soma, $E_{syn}(t)$ caractérise l'évolution dynamique des conductances excitatrices et inhibitrices en réponse à la stimulation (figue 36b). $E_{syn}(t)$ est par conséquent essentiel pour la décomposition de la conductance totale en ses composantes excitatrice et inhibitrice.

Le changement de conductance totale gT(t) est décomposée, pour chaque instant (t) de la réponse, en deux composantes correspondant à l'activation des courants synaptiques excitateurs et inhibiteurs (figure 35-D), chacune d'entre elle étant associée à une valeur de potentiel d'inversion connue (Monier et al., 2003) et vérifiée expérimentalement (figure 36a) : 0 mV pour l'excitation (Eexc) et -80 mV pour l'inhibition (Einh). Le potentiel d'inversion de -80 mV correspond à la seule contribution des récepteurs $GABA_A$, les récepteurs $GABA_B$ ne participant pas (ou très peu) à la réponse évoquée dans cette préparation.

gT(t) est décomposée linéairement en ses composantes excitatrice gE(t) et inhibitrice gI(t) en

$$C_m \frac{dV_m(t)}{dt} = -G_{leak}(V_m(t) - E_{leak}) - G_{exc}(t)(V_m(t) - E_{exc}) - G_{inh}(t)(V_m(t) - E_{inh}) + I_{inj}$$

considérant l'équation générale de membrane suivante :

où C_m est la capacité membranaire, I_{inj} est le courant injecté, G_{leak} est la conductance de fuite et E_{leak} le potentiel d'inversion de fuite. $G_{exc}(t)$ et $G_{inh}(t)$ sont les conductances excitatrices et inhibitrices avec les potentiels d'inversion respectifs E_{exc} *et* E_{inh},

et selon l'algorithme de décomposition suivant :

- si $E_{syn}(t) > Eexc$ alors $gT(t) = gE(t)$
- si $Einh < E_{syn}(t) < Eexc$ alors $gT(t) = gI(t) + gE(t)$
- si $E_{syn}(t) < Einh$ alors $gT(t) = gI(t)$

Dans nos conditions expérimentales, les valeurs d'intérêt gI(t) et gE(t) sont déterminées, pour la deuxième situation, à partir du système suivant de deux équations à deux inconnues *:*

$$gT(t) = gI(t) + gE(t)$$
$$I(t) = gI(t)[E_{syn}(t) - Einh] + gE(t)[E_{syn}(t) - Eexc],$$

les valeurs de E_{exc} et E_{inh} étant connues (respectivement 0 et -80 mV, figure 36a) et les valeurs de I(t), g(t) et E_{syn}(t) ayant été déterminées dans les étapes précédentes.

Le changement de conductance globale de la réponse évoquée (gT) est ensuite quantifié en intégrale (intgT) sur une fenêtre de 200 ms (figure 35-E). Le calcul des intégrales reflète mieux l'évolution de la conductance en fonction du temps (intégration spatio-temporelle des entrées synaptiques par la dendrite apicale ; *voir en Introduction, le paragraphe 1.3.3 p.94*) et assure une meilleure reproductibilité expérimentale que la mesure directe du changement de conductance au pic.

La contribution des composantes excitatrice et inhibitrice au changement de conductance globale est exprimée en calculant le pourcentage de leur intégrale respective par rapport à l'intégrale globale (intgE x 100 / intgT et intgI x 100 / intgT). La balance excitation-inhibition est alors donnée sous sous la forme « %E - %I ».

Les latences de l'excitation et de l'inhibition sont également calculées, entre le début de la stimulation (t = 0) et le pic de conductance excitatrice, ou inhibitrice, de la réponse.

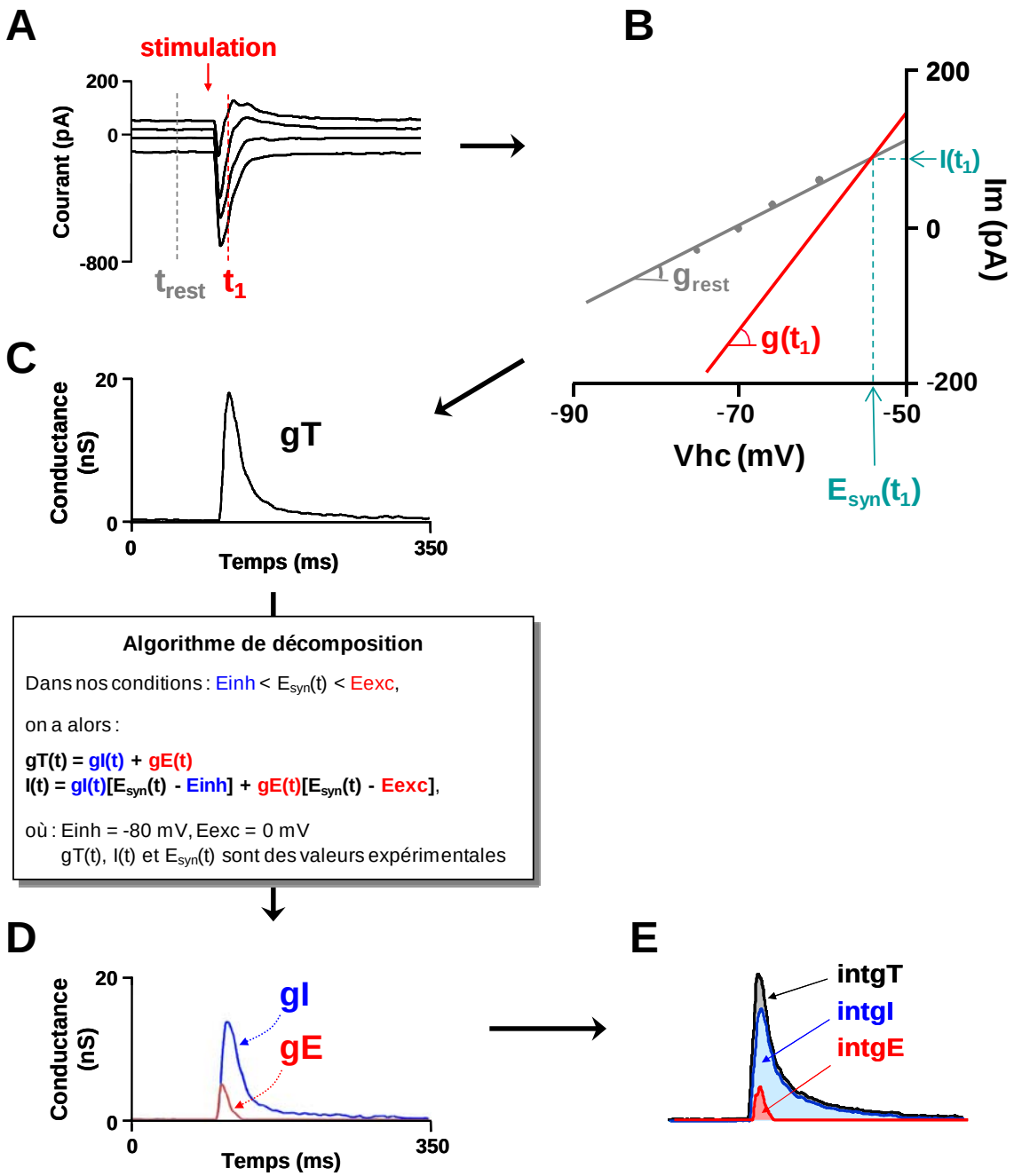


Figure 35. Décomposition des réponses composites

(**A**) Réponse en courant d'un neurone pyramidal à une stimulation électrique des couches 2/3, enregistrée à quatre potentiels imposés (-60, -65, -70 et -75 mV). (**B**) Courbes courant/potentiel (I/V) déterminées au repos (sur 90 ms, avant la stimulation) et à un instant t_1 de la réponse évoquée. Les valeurs de g_{rest} (conductance membranaire au repos) et de $g(t_1)$ (conductance d'entrée de la cellule à l'instant t_1) sont données respectivement par les pentes de ces deux courbes. La potentiel d'inversion apparent de la réponse à l'instant t_1 ($E_{syn}(t_1)$) est calculé à leur point d'intersection. g et E_{syn} sont déterminés pour chaque instant (t) de la réponse. (**C**) Changement de conductance global (gT) de la réponse calculé, à partir de la courbe I-V à chaque instant t, sachant que $gT(t) = g(t) - g_{rest}$. (**D**) Décomposition, selon l'algorithme encadré, du changement de conductance global (gT) en ses composantes excitatrice (gE) et inhibitrice (gI). (**E**) Quantification des changements de conductance en intégrale (sur une fenêtre de 200 ms) pour une meilleure reproductibilité expérimentale que la mesure directe du pic de conductance.

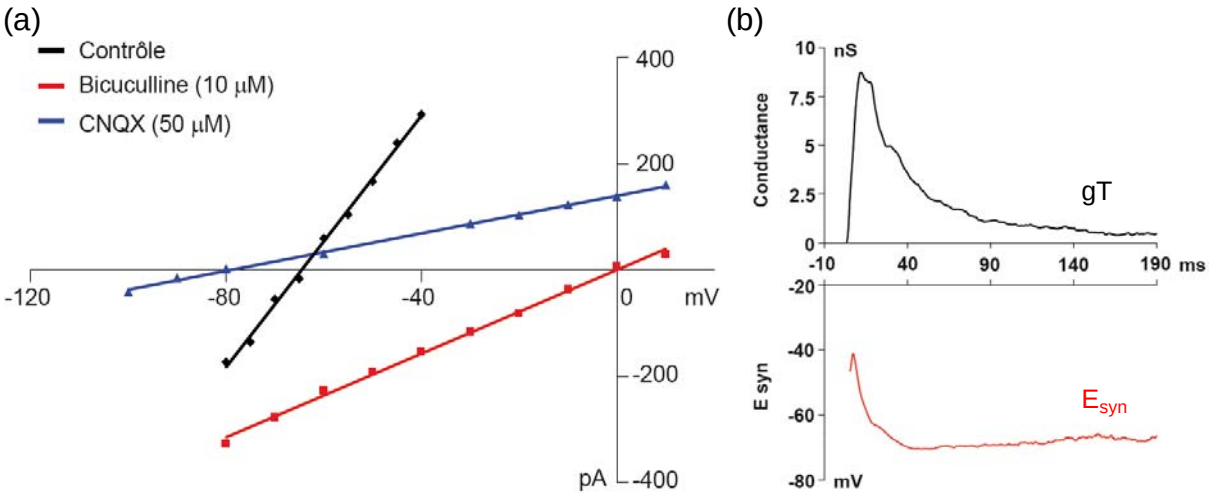


Figure 36. Courbes I/V et potentiels d'inversion

(**a**) Courbes I/V déterminées au pic de la réponse composite pour différentes conditions expérimentales (les expériences sont ici réalisées en présence d'un bloqueur des récepteurs NMDA, D-AP5 à 50 µM). En condition contrôle (noir), le potentiel d'inversion est de – 65 mV. Le potentiel d'inversion de la composante excitatrice de la réponse est déterminé en présence de bicuculline (blocage de la composante inhibitrice, rouge) et est égal à 0 mV. Le blocage de la composante excitatrice à l'aide de CNQX (bleu) permet de déterminer le potentiel d'inversion de l'inhibition, ici estimé à – 80 mV. Il est important de noter que dans tous les cas, la relation I/V est linéaire dans la gamme de potentiel où sont réalisés les enregistrements : – 90 à – 40 mV.
(**b**) Changement de la conductance totale d'un neurone pyramidal de couche 5 en réponse à une stimulation électrique des couches 2/3 (noir), et variation du potentiel d'inversion synaptique associé (rouge). Le potentiel d'inversion apparent au soma évolue dans la gamme de potentiel où les réponses sont linéaires (*i.e.* – 90 à – 40 mV).

3.3) Reconstruction des réponses composites en potentiel et facteur M

L'évolution du potentiel membranaire des neurones pyramidaux, pendant la réponse évoquée, est reconstituée (VrecT, figure 37) à partir du profil de changement de conductance déterminé expérimentalement, selon l'équation suivante :

$$Cm \frac{dVrec(t)}{dt} = -gleak(Vrec(t) - Eleak) - gT(t)(Vrec(t) - Esyn(t)) + Iinj$$

où Cm (la capacitance membranaire) est déterminée à partir de la constante de temps membranaire mesurée au repos (*Cm=gleak* x *τm* ; *voir le paragraphe 3.1.3 p.115*). VrecE et VrecI sont également déduits de cette équation en considérant que le changement de potentiel est uniquement dû au profil des conductances excitatrice ou inhibitrice, respectivement.

Etant donné que la méthode utilisée donne une valeur de gE et gI au niveau somatique (*i.e.* après intégration dendritique), nous n'avons pas d'estimation directe de l'inhibition shuntante due à l'activation des récepteurs $GABA_A$ dans la partie proximale de la dendrite (Mitchell et Silver, 2003 ; Kullmann et al., 2005 ; Mody, 2005 ; *et voir dans la partie III de l'Introduction, le paragraphe 1.3.1.2 p.85*).

Un moyen de s'affranchir de ce problème est de calculer le facteur M qui reflète le coefficient d'atténuation de l'excitation par l'inhibition « shuntante » au niveau dendritique ; atténuation qui est efficace lorsque le potentiel membranaire est proche du potentiel d'inversion des ions Cl^- (composante $GABA_A$ dans notre cas). C'est pourquoi, pour estimer l'inhibition « shuntante », le facteur M (Koch et al., 1990) est calculé à partir des intégrales (*int*) de VrecT, VrecE et VrecI selon l'équation,

$$M = (intVrecT - intVrecI)/(intVrecE)$$

L'inhibition « shuntante » est d'autant plus forte que le facteur M tend vers 0.

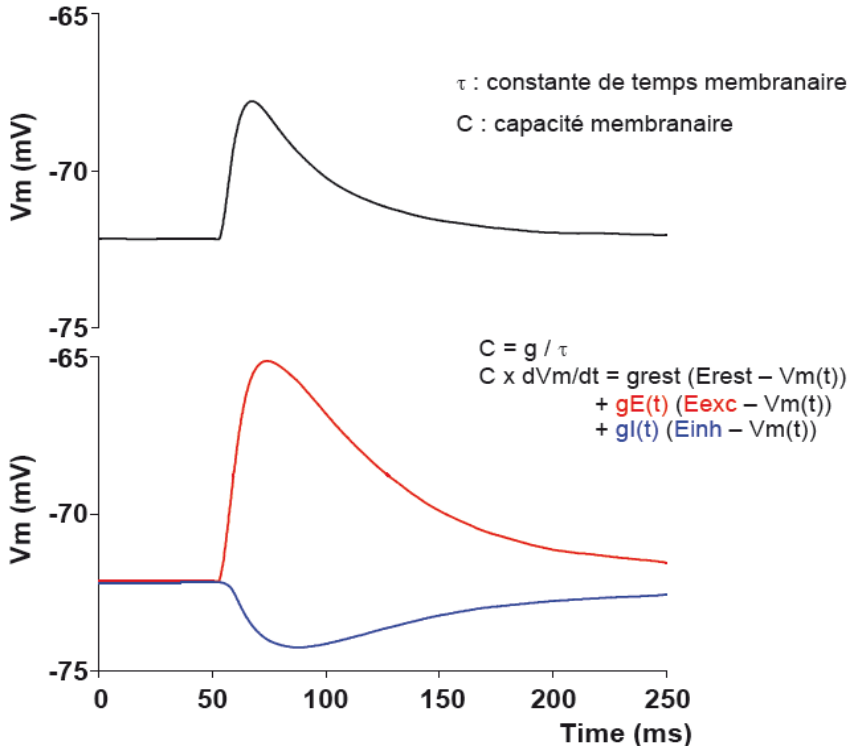


Figure 37. Reconstitution de la réponse composite en voltage

VrecT (noir), VrecE (rouge) et VrecI (bleu) d'un neurone pyramidal de couche 5 sont représentés sur cette figure, et reconstitués à partir du profil de changement de conductances évoqué par une stimulation des couches 2/3. Notons que VrecT ne correspond pas à une sommation linéaire des composantes excitatrice (VrecE) et inhibitrice (VrecI).

RÉSULTATS

Préambule

Dans cette section, seront présentés les résultats obtenus d'une part sur la modulation sérotoninergique de la balance E-I (partie I) et de sa régulation homéostatique (partie II), et d'autre part sur la modulation de la transmission synaptique par le complexe PAK3/Nck2 (partie III) et par la sous-unité a1 de la v-H^+ATPase (partie IV). En parallèle à mon sujet de thèse principal (parties I et II), j'ai développé les parties III et IV dans le cadre de deux collaborations internes au laboratoire, la première avec l'équipe de Jean-Vianney Barnier et la seconde avec l'équipe de Nicolas Morel.

J'ai aussi contribué, de façon minoritaire (réalisation de quelques expériences complémentaires, rédaction des articles), aux travaux de Nicolas Le Roux sur la détermination des mécanismes impliqués dans la régulation homéostatique de la balance E-I (*voir la partie IV de l'introduction*). Ceci m'a permis de cosigner trois articles qui sont regroupés en *Annexe*, à la fin de ce manuscrit.

Certains résultats de ces articles sont des pré-requis fondamentaux pour l'analyse et la compréhension des modulations sérotoninergiques de la balance E-I et de sa régulation homéostatique, reportées dans les partie I et II de cette section. C'est pourquoi je les présenterai en premier lieu.

∴

(I) "Roles of nitric oxide in the homeostatic control of the excitation-inhibition balance in rat visual cortical networks"

Le Roux N, Amar M, Moreau AW, Fossier P.

Neuroscience (2009) **163**:942-951.

Dans cette étude, nous avons observé que le blocage non-spécifique des différentes isoformes de la NO synthase (NOS) est capable d'augmenter significativement la balance E-I (augmentation de l'excitabilité des neurones pyramidaux de couche 5). En présence d'un antagoniste spécifique de la NOS neuronale, aucun changement de la balance E-I n'est induit. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un « signal NO » tonique persistant qui résulterait de la NOS endothéliale selon l'hypothèse de Hopper et Garthwaite (2006) et qui serait primordial dans la régulation du niveau d'excitabilité des réseaux neuronaux.

L'application de L-arginine, le substrat de la NOS, provoque une potentiation des entrées excitatrices et inhibitrices dans les mêmes proportions que celles observées suite à l'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence. Par ailleurs, l'application de ce protocole après perfusion du substrat, ou en présence d'un bloqueur des NOS, ne permet plus l'expression de la potentiation homéostatique (*voir en Introduction, le paragraphe 4.3 p.93*). Ces résultats suggèrent qu'un « signal NO » phasique est nécessaire à la potentiation homéostatique des entrées excitatrices et inhibitrices au niveau des neurones pyramidaux de couche 5 (en opposition au « signal NO » tonique requis pour la régulation de l'excitabilité des réseaux neuronaux). Pour conclure, cet article révèle un aspect de la complexité de la neuromodulation de la balance E-I.

∴

(ii) "Involvement of NR2A- or NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage"

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Fossier P.

European Journal of Neuroscience (2007) **26**:289-301.

Ce travail met en évidence que la balance E-I ne dépend pas des récepteurs NMDA et de leur état d'activation (aucune modification de la balance, que ce soit après le blocage ou l'activation pharmacologique de ces récepteurs). Cette dernière observation est fondamentale pour l'analyse d'éventuelles modulations de la balance E-I, dans la mesure où des effets modulateurs directs sur les récepteurs NMDA ne seront pas détectés (avec le protocole de stimulation à 0,05 Hz, utilisé pour ma détermination de la balance E-I). Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la potentiation des entrées excitatrices, mais aussi des entrées inhibitrices, reçues par les neurones pyramidaux de couche 5 requiert obligatoirement l'activation des récepteurs NMDA, soit du type NR2B pendant la période critique postnatale (rats âgés de 17 à 23 jours), soit du type NR2A en fin de période critique (29 à 32 jours).

∴

(iii) "Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks"

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Baux G, Fossier P.

European Journal of Neuroscience (2008) **27**:3244-56.

Dans cet article, nous avons mis en évidence que la sur-activation ou le blocage partiel des récepteurs $GABA_A$ dans les réseaux neuronaux du cortex visuel induit, dans les deux cas, une augmentation marquée de la balance E-I.

Le blocage des récepteurs $GABA_A$ (gabazine) entraîne des effets opposés sur l'excitation et l'inhibition, à savoir une augmentation de l'excitation et une diminution de l'inhibition. La sur-activation des récepteurs $GABA_A$ (THIP) entraîne par contre des effets de même signe sur les deux composantes, une diminution significative de l'excitation et une diminution plus importante de l'inhibition, à l'origine de l'augmentation de la balance E-I. Nous pouvons ainsi supposer, dans le cas du blocage des récepteurs $GABA_A$, que la régulation de la balance E-I est inopérante alors que dans le cas de leur sur-activation, le contrôle est toujours présent (effets similaires sur E et I) mais moins efficace (augmentation de la balance E-I). De plus le blocage de l'excitation (CNQX) entraine une diminution d'environ 90% de l'inhibition, ce qui montre la nature majoritairement disynaptique de cette dernière dans le réseau stimulé. Ce dernier point sera essentiel pour l'analyse des modulations sérotoninergiques de la balance E-I.

L'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence (HFS), en présence d'un bloqueur ou d'un agoniste partiel des récepteurs $GABA_A$, empêche l'induction d'une potentiation de l'excitation et de l'inhibition et entraîne, au contraire, une dépression des entrées excitatrices et inhibitrices sur le neurone pyramidal de couche 5. Dans les deux cas, la valeur de balance E-I est modifiée après l'application du protocole HFS, ce qui signale une perte du contrôle homéostatique de la balance E-I. Afin d'expliquer ce phénomène, un bloqueur intracellulaire des canaux Cl^- (DNDS) a été perfusé dans le neurone pyramidal de couche 5, *via* le milieu intrapipette. Dans cette condition, l'induction de la potentiation des entrées inhibitrices et excitatrices est impossible, ce qui révèle toute l'importance des boucles de rétrocontrôle entre le neurone pyramidal de couche 5 et les microcircuits inhibiteurs afférents des couches corticales en amont. L'ensemble de ces résultats suggère que les neurones pyramidaux de couche 5 régulent l'efficacité des afférences qu'ils reçoivent, afin de maintenir une balance E-I stable au niveau somatique.

La modulation des boucles de rétrocontrôle par la sérotonine (ou par d'autres neuromodulateurs) devrait donc avoir un effet critique dans la régulation homéostatique de la balance E-I.

Enfin, la sur-activation ou le blocage des récepteurs $GABA_A$ corticaux conduit à une diminution importante de l'inhibition shuntante et par conséquent à une augmentation de la composante excitatrice reçue, au niveau somatique, par le neurone pyramidal enregistré. De plus, il est intéressant de noter qu'un blocage total de l'inhibition shuntante n'est observé qu'en présence d'une forte concentration d'antagoniste GABAergique qui bloque, très probablement, à la fois les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques. Cette observation suggère qu'il faut nuancer l'idée d'une implication exclusive des récepteurs $GABA_A$ extrasynaptiques dans l'inhibition shuntante. La modulation des ces différents sous-types d'interneurones corticaux, ou directement des récepteurs $GABA_A$ postsynaptiques, doit être un mécanisme supplémentaire de modulation de l'intégration dendritique dans les neurones pyramidaux de couches 5 (*i.e. via* un effet sur l'inhibition shuntante).

En conclusion, cet article montre le lien étroit entre micro-circuits excitateurs et inhibiteurs dans le cortex visuel. La perturbation de ces interactions, quel qu'en soit le sens, altère d'une part l'intégration des signaux excitateurs et inhibiteurs réalisée par les neurones pyramidaux de couche 5 (modification de la balance E-I), et d'autre part, le fonctionnement bouclé entre les neurones pyramidaux de couche 5 et les micro-circuits excitateurs et inhibiteurs afférents (perte de la régulation homéostatique). Cette dualité (également observée avec le NO, *voir le premier article*) devra être considérée dans l'analyse des modulations de la balance E-I par la sérotonine et ses récepteurs corticaux.

I. Etude des rôles de la sérotonine et des récepteurs 5-HT corticaux dans la modulation de la balance E-I dans le cortex visuel de rat

1) Position du problème

Le cortex reçoit, *via* la couche 1 et la substance blanche, de très nombreuses projections sérotoninergiques issues des noyaux du raphé, dont les ramifications multiples ciblent massivement les neurones pyramidaux glutamatergiques et les différentes classes d'interneurones GABAergiques des six couches corticales (Dahlström et Fuxe, 1964 ; Kosofsky et Molliver, 1987 ; Jacobs et Azmitia, 1992 ; Vu et Törk, 1992 ; Gu, 2002). Parmi la grande diversité des récepteurs de la sérotonine (14 sous-types), un seul est de type ionotropique (5-HT_3) et est associé à une transmission synaptique rapide (ouverture d'une perméabilité cationique à dominante sodique). Tous les autres récepteurs sont de type métabotropique et sont couplés à diverses voies de signalisation intracellulaire : 5-HT_1 (couplé à $G_{i/0}$), 5-HT_2 (couplé à $G_{q/11}$), 5-HT_4, 5-HT_5, 5-HT_6 et 5-HT_7 (couplés à $G_{\alpha s}$) (Hoyer et al., 2002). La répartition des récepteurs 5-HT dans les différentes couches corticales n'est pas homogène et certains d'entre eux semblent être préférentiellement associés à une ou plusieurs classes particulières d'interneurones (Paspalas et Papadopoulos, 2001 ; Férézou, 2002). De multiples possibilités de modulation des micro-circuits inhibiteurs apparaissent donc selon leur composition neuronale et l'expression plus ou moins sélective des différents récepteurs 5-HT. L'activité des micro-circuits excitateurs peut également être modulée par la sérotonine, certains sous-types de récepteurs 5-HT étant préférentiellement exprimés dans certains domaines des neurones glutamatergiques (*i.e.* dendrite, soma, segment initial) (Zhou et Hablitz, 1999 ; Amargós-Bosh et al., 2004). De plus, plusieurs travaux ont mis en évidence une « innervation » sérotoninergique corticale préférentielle sur les interneurones GABAergiques plutôt que sur les neurones pyramidaux glutamatergiques (DeFelipe et al., 1991 ; Paspalas et Papadopoulos, 2001), et l'action modulatrice de la sérotonine sur les différentes populations de neurones inhibiteurs apparaît essentielle au bon fonctionnement des processus corticaux (Bacci et al., 2005).

Malgré les nombreuses évidences concernant le rôle modulateur de la sérotonine à l'échelle des différentes populations neuronales, et malgré la ségrégation morphologique de ses récepteurs, ses effets neuromodulateurs n'ont pas été décrits ni quantifiés à l'échelle d'un réseau neuronal complexe et de l'intégration dendritique. Comme cela a été expliqué en

introduction, la mesure de la balance E-I dans les neurones pyramidaux de couche 5 est un bon moyen d'explorer les fonctions modulatrices de la 5-HT, jusqu'alors inconnues à l'échelle d'un réseau cortical sensoriel

2) Résultats

2.1) "Serotoninergic Fine-Tuning of the Excitation-Inhibition Balance in Rat Visual Cortical Networks"

Moreau AW, Amar M, Le Roux N, Morel N, Fossier P.

Article publié dans *Cerebral Cortex* (2009) doi:10.1093/cercor/bhp114

Cerebral Cortex Advance Access published July 8, 2009

Cerebral Cortex
doi:10.1093/cercor/bhp114

Serotoninergic Fine-Tuning of the Excitation–Inhibition Balance in Rat Visual Cortical Networks

Alexandre William Moreau, Muriel Amar, Nicolas Le Roux, Nicolas Morel and Philippe Fossier

CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard—FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire—UPR9040, F-91198 Gif sur Yvette, France

Fundamental brain functions depend on a balance between excitation (E) and inhibition (I) that is highly adjusted to a 20–80% set point in layer 5 pyramidal neurons (L5PNs) of rat visual cortex. Dysregulations of both the E–I balance and the serotonergic system in neocortical networks lead to serious neuronal diseases including depression, schizophrenia, and epilepsy. However, no link between the activation of neuronal 5-hydroxytryptamine receptors (5-HTRs) and the cortical E–I balance has yet been reported. Here we used a combination of patch-clamp recordings of composite stimulus-locked responses in L5PN following local electrical stimulations in either layer 2/3 or 6, simultaneous measurement of excitatory and inhibitory conductance dynamics, together with selective pharmacological targeting and single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction. We show that cortical serotonin shifts the E–I balance in favor of more E and we reveal fine and differential modulations of the E–I balance between 5-HTR subtypes, in relation to whether layer 2/3 or 6 was stimulated and in concordance with the specific expression pattern of these subtypes in pyramidal cells and deep interneurons. This first evidence for the functional segregation of 5-HTR subtypes sheds new light on their coherent functioning in polysynaptic sensory circuits.

Keywords: 5-HT_{1A} 5-HT_{2A} 5-HT_3 5-HT_7Rs, patch clamp, pyramidal neuron, serotonin, synaptic integration

Introduction

The balance between excitation (E) and inhibition (I) results from the coordinated and highly regulated activities of recurrent excitatory and inhibitory cortical networks and governs numerous brain processes, including cortical integration of sensory information (Wehr and Zador 2003; Wilent and Contreras 2004; Marino et al. 2005; Priebe and Ferster 2005; Higley and Contreras 2006). Any disruption of the E–I balance has been involved in central pathologies such as epileptic seizures (Roberts 1984; Cobos et al. 2005), schizophrenia (Kehrer et al. 2008), and Alzheimer's disease (Small 2007). We previously showed that the somatic E–I balance is continuously adjusted to a 20–80% set point in layer 5 pyramidal neurons (L5PNs) of rat visual cortex (Le Roux et al. 2006) by homeostatic processes involving glutamate N-methyl D-aspartate (NMDA) (Le Roux et al. 2007) and γ-aminobutyric acid $(GABA)_A$ (Le Roux et al. 2008) receptors, and we revealed the endogenous cholinergic modulation of this E–I balance by nicotinic and muscarinic receptors (Lucas-Meunier et al. 2009). Neocortical L5PNs constitute a crucial population that elaborate cortical outputs following the integration of thalamocortical inputs, mainly relayed by synapses from layer 2/3 neurons onto their apical and basal dendrites (Thomson and Bannister 1998). Inhibitory cortical circuits contain a wide range of GABAergic interneuron classes that afford to monitor and balance E at specific domains of L5PNs: dendrites, soma, and axon hillock (Markram et al. 2004).

The rat visual cortex receives a massive input of extensively ramified 5-hydroxytryptamine (5-HT) fibers that derive from midbrain raphe nuclei (Dori et al. 1996) and target both excitatory and inhibitory neurons in all cortical layers (Dahlstrom and Fuxe 1964; Vu and Tork 1992). Due to a diffuse release from nonjunctional axonal varicosities, cortical serotonin can act as a neuromodulator faraway from its release sites, on 14 characterized receptor subtypes, whose majority is expressed on cortical pyramidal neurons and/or interneurons (Gu and Singer 1995; Bunin and Wightman 1998, 1999). In rat visual cortical slices, exogenous 5-HT application has opposite effects on spontaneous and evoked currents in pyramidal neurons (Zhou and Hablitz 1999), and 5-HT receptors' (5-HTRs) activation by endogenous serotonin has been shown to decrease long-term potentiation in vitro (Edagawa et al. 2001). All 5-HTR subtypes are G protein–coupled receptors that are able to recruit multiple signaling modules, with the exception of the 5-HT_3R which is a ligand-gated cation channel (Hoyer et al. 2002). This surprising versatility can be linked with most of neurobiological diseases resulting from perturbations or dysfunctions of the serotoninergic system: major depression, schizophrenia, anxiety, obsessive–compulsive disorder, drug abuse (Jones and Blackburn 2002), or epilepsy (Bagdy et al. 2007). Despite the numerous studies on 5-HTR signaling pathways, cortical distribution, and neuronal localization (Bockaert et al. 2006), their functional involvement on the modulation of the E–I balance has not been investigated.

In order to keep functional the dynamic interactions between excitatory and inhibitory neurons in the visual cortical network, no pharmacological blockade of E or I was used in this study. So considered, the method that we used (for review, see Monier et al. 2008) allows an optimal determination of the E–I balance in the soma of L5PNs following synaptic activations. The main finding of this study is that the E–I balance is increased, decreased, or unchanged following the selective blockade of 5-HT_{1A}, 2A, 3, or 7Rs through a diversity of modulatory effects affecting the activity of both excitatory and inhibitory neurons in various cortical layers and input integration in L5PN.

Materials and Methods

Cortical 5-HT Depletion

Wistar rats were intraperitoneally injected with either physiological serum (0.9% isotonic NaCl, control group) or *p*-chlorophenylalanine

© The Author 2009. Published by Oxford University Press. All rights reserved.
For permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

(pCPA, 200 mg/kg) once daily for 4 consecutive days and sacrificed 24 h after the fourth injection in order to obtain the best depletion efficacy (see the comparative study of Kornum et al. 2006).

Slice Preparation and Electrophysiology

In accordance with the guidelines of the American Physiological Society, 19- to 25-day-old Wistar rats were decapitated and their brain quickly removed. A hemisection of the left hemisphere was removed, attached to the stage of a Vibratome tissue slicer (Campden Instrument, Loughborough, Leicestershire, UK), and immersed in ice-cold artificial cerebrospinal extracellular solution containing the following (in mM): 126 NaCl, 26 $NaHCO_3$, 10 glucose, 2 $CaCl_2$, 1.5 KCl, 1.5 $MgSO_4$, and 1.25 KH_2PO_4 (pH 7.5, 310–330 mOsm). Parasagittal slices (250 μm) containing primary visual cortex were cut and transferred to an holding chamber filled with the extracellular solution, continuously bubbled with 95% O_2/5% CO_2, and maintained at 36 °C. Each slice was transferred to a recording chamber mounted on the *X–Y* translation stage of an upright microscope (Zeiss Axioskop 2 FS+) and perfused (~2 mL/min) at room temperature (~25 °C) with the extracellular solution. The borosilicate glass pipettes (of 3–5 MΩ resistance) contained the following intracellular solution (in mM): 140 K-gluconate, 10 4-2-hydroxyethyl-1-piperazine ethanesultanic acid, 4 ATP, 2 $MgCl_2$, 0.4 GTP, and 0.5 ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-*N,N,N′ N′*-tetraacetic acid (pH 7.3 adjusted with KOH, 270–290 mOsm). Cells were visualized using video-enhanced differential interference contrast (DIC) optics and ×40 long working distance water-immersion lens. Stable whole-cell voltage-clamp and current-clamp recordings were obtained from L5PNs (identified from the shape of their soma and primary dendrites and from their current-induced firing profile to 1-s depolarizing steps ranging from −100 to 200 pA, see Fig. S3 for a typical L5PN spiking profile), were obtained using a Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments), filtered at 2 KHz by a low-pass Bessel filter, and sampled at 4 KHz using a Digidata 1322A acquisition board (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) connected to a personal computer. Voltage data were corrected off-line for a measured liquid junction potential of −10 mV.

After capacitance neutralization, bridge balancing was done online under current clamp to make initial estimations of the access resistance (R_s). These values were checked and revised as necessary off-line by fitting the mean voltage response to a short hyperpolarizing current pulse (applied at rest) with the sum of 2 exponentials. The first one (fast decaying exponential) was used to fit the electrode response and extract R_s. The second one (slower decaying exponential) permitted to fit the membrane response and extract the membrane input resistance (see Table 2) and time constant (τm) (for review, see Monier et al. 2008). *F/I* curves were extracted from the current-induced firing profiles and fitted with a linear function whose mean slope allowed to estimate the intrinsic excitability of the L5PNs under our experimental conditions (see Table 2). Only cells with a resting potential more negative than −60 mV and with an access resistance lower than 25 MΩ were kept for further analysis. The access resistance was compensated off-line in voltage-clamp mode.

Electrical stimulations (1–10 μA, 0.2 ms, 0.05 Hz) were applied in 2 entrance sites of visual cortex: layer 2/3 and 6 using 1 MΩ impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT, WPI, Hertfordshire, UK) (see Fig. 1*A*). The stimulation intensity was adjusted in current clamp (see Fig. S1) to be strong enough to induce a subthreshold postsynaptic response due to coactivation of excitatory and inhibitory circuits but weak enough to avoid to recruit dominant nonlinear processes linked for instance to NMDA receptor activation (Le Roux et al. 2007). Thus, intensity level was always set to 2–3 times the amplitude of the stimulation necessary to induce a detectable response in current clamp. Under voltage clamp, 5–10 trials were repeated for each holding potential. A control recording was made after 15 min of patch-clamp equilibration at 5–7 holding potentials, and after 15 min of continuous drug perfusing (10 min for 5-HT perfusion), a "drug recording" was made in same conditions.

Continuous Estimation of the Synaptic Conductances in Voltage Clamp

Data were analyzed off-line with specialized software (Acquis1™ and Elphy™, Biologic UNIC–CNRS, Gif sur Yvette, France).

The analysis method, fully published in our previous papers (Le Roux et al. 2006, 2007, 2008) and extensively reviewed by Monier et al. (2008), is based on the continuous measurement of conductance dynamics during the full-time course of the stimulus-evoked synaptic response, as primarily described in vivo on cat cortex (Borg-Graham et al. 1998; Monier et al. 2003). This method received further validation on various experimental models (Shu et al. 2003; Wehr and Zador 2003, 2005; Haider et al. 2006; Le Roux et al. 2006, 2007, 2008). To estimate conductances, the neuron is considered as the point-conductance model of a single-compartment cell, described by the following general membrane equation:

$$Cm\frac{dVm(t)}{dt} = -gleak[Vm(t) - Eleak] - gE(t)[Vm(t) - Eexc] - gI(t)[Vm(t) - Einh] + Iinj,$$

where Cm denotes the membrane capacitance, Iinj the injected current, gleak the leak conductance, and Eleak the leak reversal potential. The gexc(t) and ginh(t) are the excitatory and inhibitory conductances with respective reversal potentials Eexc and Einh.

Evoked synaptic currents were measured and averaged at a given holding potential. In *I–V* curves for every possible delay (t), the value of holding potential (Vh) was corrected (Vhc) from the ohmic drop due to the leakage current through the access resistance [Vhc(t) = Vh(t) − $I(t) \times R_s$]. An average estimate of the input conductance waveform of the cell was calculated from the best linear fit (mean least square criterion) of the *I–V* curve for each delay (t) following the stimulation onset. Only cells showing a Pearson correlation coefficient for the *I–V* linear regression higher than 0.95 between −90 and −40 mV were considered to calculate the conductance change of the recorded pyramidal neuron from the slope of the linear regression.

The synaptically evoked global conductance term [gT(t)] was then measured by subtracting the resting conductance observed in the absence of stimulation (on a time window of 100 ms before the electrical stimulation) from the input total conductance. The synaptic reversal potential of the synaptic conductance [Esyn(t)] was taken as the voltage of the intersection between the *I–V* curve during the synaptic response and the *I–V* curve at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, Esyn(t) characterizes the stimulation-locked dynamics of the balance between E and I. The global synaptic conductance [gT(t)] was further decomposed into 2 conductance components [gE(t) and gI(t)] corresponding to the activation of excitatory and inhibitory synapses, respectively, each associated with known and fixed reversal potentials. Indeed, we showed (see Supplementary data in Le Roux et al. 2006) that the *I–V* curve in the presence of excitatory transmission blockers (6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione and D-2-amino-5-phosphonopentanoate) is linear between −80 and +10 mV with a reversal potential equal to −80 mV. In the presence of bicuculline in order to block inhibitory inputs on the L5PN, the *I–V* curve for E is also linear between −80 and +10 mV with a reversal potential equal to 0 mV.

Accordingly, the reversal potentials used for the decomposition of the global synaptic conductance were set at 0 mV for excitatory (Eexc) and −80 mV for inhibitory conductance (Einh). In addition, these values for the reversal potentials are classically accepted and used in other studies (Wehr and Zador 2003, 2005). Einh corresponds to the reversal potential corresponding to $GABA_A$ (and not an intermediate value between $GABA_A$ and $GABA_B$) because in the presence of QX314 in the pipette (which blocks K^+ efflux, Nathan et al. 1990), no variation of the synaptic response was observed. Under our experimental conditions, Esyn(t) took any intermediate values between −80 and −40 mV (see Supplementary data, Fig. B in Le Roux et al. 2006) and thus includes between Eexc (0 mV) and Einh (−80 mV) and within the limits of our voltage excursion (−80 and −40 mV), in such a way that the mathematical conditions of the oversimplification used to calculate gI(t) and gE(t) were fulfilled.

Like all somatic recordings, our recordings cannot make rigorous estimates of synaptic events in the distal dendrites, and estimated conductances are ratio of the overall excitatory and inhibitory drive contained in the local network stimulated (Haider et al. 2006). However, our measurements are relative changes in conductance

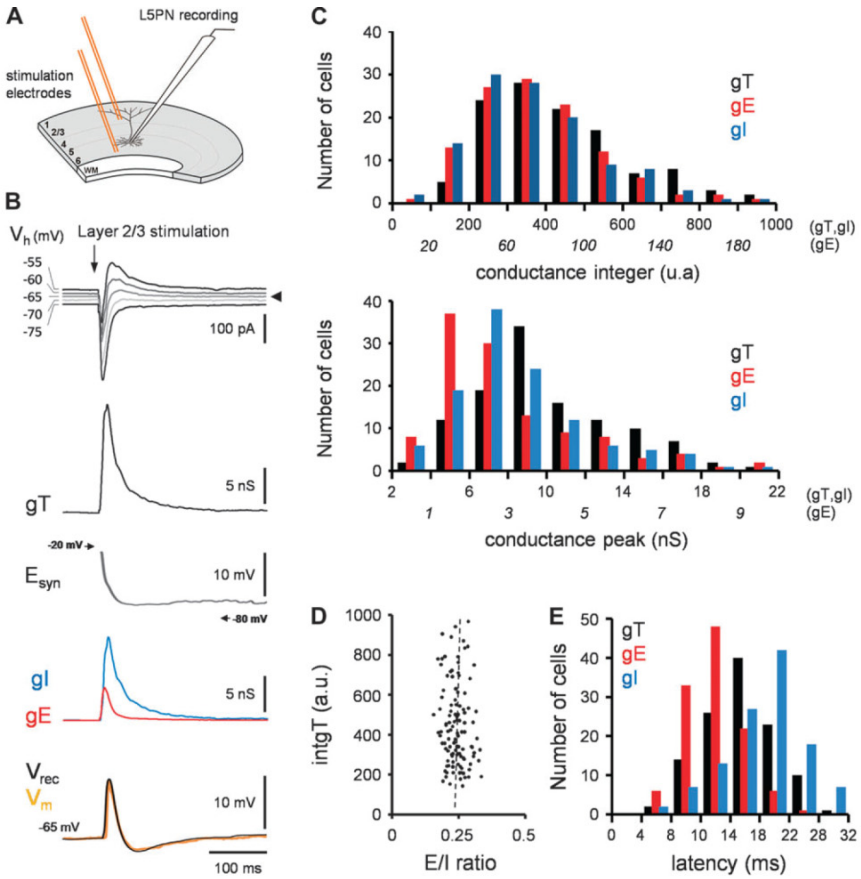


Figure 1. Stimulus-locked composite response characterization. (*A*) Schematic representation of the stimulation protocol: electrical stimulations are applied in either layer 2/3 or 6 of rat visual cortex slice and the composite synaptic responses are recorded in an L5PN. (*B*) Representative current responses of an L5PN to layer 2/3 stimulation recorded in voltage clamp at various holding potentials. Vertical arrows indicate the stimulation onset. Black triangles represent the 0 current line under voltage clamp. Corresponding total conductance change (gT, black line) and synaptic reversal potential change (Esyn) are represented under current traces. Note that Esyn takes any value between −80 and −20 mV, that is, within a linearity range for the used algorithmic decomposition (see Materials and methods). Excitatory (gE, red line) and inhibitory (gI, blue line) conductance changes are obtained from gT decomposition (see Materials and methods) and represented below. Vrec (black line) shows the reconstructed voltage drive of the current response that should be observed in current clamp (see Materials and methods) and Vm (orange line) shows the raw voltage response recorded in the same cell in current clamp. (*C*) Distribution of gT (black), gE (red), and gI (blue) integers (top panel) or peaks (down panel) in the control pool (n = 116, layer 2/3 stimulation). (*D*) Plot distribution showing a lack of correlation between conductance amplitude of the response and the E/I ratio under typical control condition (r^2 = 0.028, linear regression). (*E*) Latency distributions for gT (black), gE (red), and gI (blue) after layer 2/3 stimulation. Latencies are calculated from the onset of stimulation to the conductance peak. Note that E always appeared before I.

magnitude, which reflect the cumulative contributions of E and I arriving at proximal portions of the neuron. Nevertheless, the distortion of synaptic events by transient voltage-dependent channels and capacitance near to the recording site are minimized in voltage-clamp method (Borg-Graham et al. 1998).

For each component, excitatory and inhibitory, we calculated the conductance change as the mean averaged over a time window of 200 ms. The contribution of each component was expressed by the ratio of its integral value (intgE or intgI) to that of global conductance change (intgT).

Reconstitution of the Membrane Potential and Shunting I Estimation

The membrane potential trajectory (VrecT) that would have been observed in current clamp (see Fig. 2*D* in Lucas-Meunier et al. 2009) was reconstructed from the experimentally derived excitatory and inhibitory conductance profiles (obtained in voltage clamp) on the basis of the prediction given by the combination of the different synaptic activation sources:

$$\mathrm{Cm}\frac{\mathrm{dVrec}(t)}{\mathrm{d}t} = -\mathrm{gleak}[\mathrm{Vrec}(t) - \mathrm{Eleak}] - \mathrm{gT}(t)[\mathrm{Vrec}(t) - \mathrm{Esyn}(t)] + \mathrm{Iinj}.$$

Cm is estimated from τm (the membrane time constant, Cm = gleakτm) of the cell measured at rest with a small step of hyperpolarizing current. gT(t) takes into account inhibitory and excitatory components [gsyn(t) = gexc(t) + ginh(t)].

Because our method gives gE and gI at the somatic level (i.e., after dendritic integration), we do not have an estimation of shunting I due to the activation of $GABA_A$ receptors (which opens chloride permeability) in conditions where the reversal potential of Cl^- is close to the resting potential. Shunting effects act to reduce the membrane depolarizing effects of concurrent distal excitatory events (Kullmann et al. 2005; Mody 2005).

To estimate the shunting I previously reported by theoretical studies as a tonic-like $GABA_A$ conductance (Staley and Mody 1992; Mitchell and Silver 2003; Mody 2005), the following parameter, described as M factor (Koch et al. 1990), was calculated: M = (intVrecT − intVrecI)/(intVrecE) using the integrals of VrecT, VrecI, and VrecE. M reflects the

reducing coefficient of E by shunting I at the somatodendritic level when the membrane potential is near the Cl^- reversal potential.

Immunohistochemistry

The right hemisphere of each pCPA or isotonic NaCl–injected rat was fixed in a 4% paraformaldehyde/15% saccharose solution during 1 week at 4 °C, cut into 30-µm slices, and stored at 4 °C in a 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) and 0.02% sodium azid solution for further immunostaining controls of 5-HT depletion. Fixed brain slices of pCPA or isotonic NaCl–injected rats were permeabilized during 30 min (10 mM glycine and 0.4 mM triton), saturated during 60 min (2% bovine albumin serum and 3% sheep serum in PBS), and incubated (overnight at 4 °C) with a rabbit polyclonal antibody anti-5-HT plasma membrane transporter (1/750[c], Calbiochem, La Jola, CA) and with a mouse monoclonal antibody anti-glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) (1/1000[c], Chemicon International, Inc., Temecula, CA) for double-staining experiments. Bound antibodies were detected with specific secondary fluorescent antibodies from Molecular Probes (Cergy Pontoise, France) (incubated for 2 h at room temperature) conjugated to fluorescein isothiocyanate (5-HT vesicular transporter) or conjugated to Alexa568 for GAD67 detection. Controls and cross-controls were performed by omitting the primary antibody, and the rest of the procedure was similar. In all cases, no labeling was observed.

Single-Cell Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

The mRNA was amplified from single L5PNs or from single layer 6 interneurons in primary visual cortex slices prepared from 19- to 21-day-old rats, as mentioned above. All L5PNs were identified under video-enhanced DIC microscopy, exhibited both the stereotyped soma shape (large and triangular) and thick proximal apical trunk (Larkman and Mason 1990; Mason and Larkman 1990), and showed the typical regular adaptation discharge pattern of pyramidal neurons as described by McCormick et al. (1985), and the membrane of these cells had an input resistance of 238.4 ± 44.6 MΩ (n = 28). This value is typical of L5PN populations in slice of visual cortex (Monier et al. 2008; Lucas-Meunier et al. 2009) or pyramidal neurons of prefrontal cortex slices (Cauli et al. 2000). All these criteria were considered in detail and allowed to ascertain that all cells of the L5PN pool were not regular spiking interneurons that exhibited higher input resistance and that mostly showed a fusiform-type morphology (Cauli et al. 2000). Thus, interneurons were identified in the layer 6 on the basis of both their soma shape (small and nonpyramidal or fusiform) and their specific current-clamp electrophysiological profile and had an input resistance of 406.5 ± 63.9 MΩ (n = 21). The cytoplasmic content was harvested essentially as previously described by Poea-Guyon et al. (2006) with video-enhanced DIC optical monitoring. Harvests were considered successful when cytoplasm and small organelles entering the pipette tip were observed while applying negative pressure and when the soma of the neuron shrinked. Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed based on GenBank sequences for serotonin receptors and are indicated in the Table 1. The complete procedure is described in detail in the Supplementary methods.

Table 1
Primer sequences for RT-PCR

Subtype	Sequence	5′ Position	Product length
5-HT_{1A}receptor			
Sense	5′ AGCGCAATGCTGAAGCAAAG	977	192
Antisense	5′ AGCCTAGCCAGTTAATTATGGCAC	1168	
5-HT_{2A}R			
Sense	5′ ATCCCCCTAACCATCATGGTG	667	225
Antisense	5′ TTGCTCATTGCTGATGGACTG	891	
5-HT_7R			
Sense	5′ CGGTGTGCTTCGTCAAGAAG	438	245
Antisense	5′ TCTCGTGATCCCAAGGTACCTG	682	

Statistics

Data reported are mean ± the standard error of the mean of n cells. Statistical significance was evaluated using the nonparametric Mann–Whitney U-test to compare unpaired conditions or the 2-tailed Student's t-test for other paired samples. In both cases, data were expressed as percentage of control values. Statistical significances are indicated in figure legends.

Chemicals

All chemicals used for electrophysiology experiments were obtained from Sigma–Aldrich (Lyon, France) except citalopram, a-Phenyl-1-(2-phenylethyl)-4-piperidinemethanol (MDL) 11939, GR113308, and SB269970 (Tocris Bioscience, Bristol, UK). Ritanserin, MDL 11939, and GR113808 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in the extracellular solution. The final concentration of DMSO in the slice was 1/10 000 (v/v).

Results

Stable somatic voltage-clamp recordings of L5PN subthreshold postsynaptic responses evoked by layer 2/3 or 6 electrical stimulation were obtained in slices from visual cortex (Fig. 1*A* and Fig. S1), and the decomposition method (Monier et al. 2008) was applied. For each recording (see Fig. 1*B* for a typical control recording and decomposition), the total input conductance (gT) was first extracted and its decomposition allowed to further evaluate the relative contribution of evoked excitatory and inhibitory inputs reaching the soma of the recorded pyramidal neuron (see Materials and methods). Typical layer 2/3 (Fig. 1*B*) or 6 (not shown) electrical stimulation produces a fast excitatory conductance (gE) elicited before a long-lasting inhibitory conductance (gI) in the L5PN, as shown by the latency distributions for gT, gE, and gI (Fig. 1*E*, layer 2/3). Layer 6 latencies were shorter with a preferential distribution between 10 and 14 ms for gT (not shown). Quantification of these somatic conductances showed that the control stimulus-locked composite signal at the soma of L5PNs is composed in average of 20% of E and 80% of I whatever the stimulated layer was (control pool, n = 116), as already reported (Le Roux et al. 2006). Distribution of integer and peak values of gT, gE, and gI over the control population (Fig. 1*C*, layer 2/3 stimulation) showed that the control E–I ratio is not correlated to conductance amplitude and is independent of the stimulation intensity (Fig. 1*D*). Similar distributions were observed with layer 6 stimulation (not shown). The shape of the corresponding reconstructed voltage drive dynamic (Vrec trace, Fig. 1*B*) fitted well with the voltage response recorded in current clamp in the same cell (Vm trace, Fig. 1*B*) (see also Lucas-Meunier et al. 2009). This voltage drive dynamic determines the ability of L5PNs to produce a putative response that may occur when any additional and concomitant input reaches the soma (i.e., responsiveness threshold) and allows the quantification of shunting I (here estimated as M factor, see Materials and methods) acting at the proximal part of the apical dendrite. The membrane input resistance and intrinsic excitability of L5PN (estimated from the slope of F/I curves, Table 2) included in the present database were not changed under the different experimental conditions compared with the control pool.

Endogenous Activation of Whole 5-HTRs Increases the E–I Balance

The presence of an extensive network of 5-HT fibers in the rat primary visual cortex was first confirmed by immunostaining

Table 2
L5PN membrane resistance at rest and intrinsic excitability in the various experimental conditions

	Control	Citalopram	pCPA	WAY 100635	MDL 11939	SB269070	Tropisetron
Input resistance (MΩ)	240.3 ± 13	235.5 ± 19	229.2 ± 21	244.1 ± 24	223.9 ± 15	236.4 ± 16	251.3 ± 25
F/I (AP/s/pA)	68.2 ± 36	65.9 ± 41	64.2 ± 38	60.8 ± 44	62.7 ± 42	72.3 ± 43	70.1 ± 39

Note: *F/I*, values correspond to the mean slope of frequency/intensity curves fitted with a linear function; AP, action potential.

the serotonin plasma membrane transporter (SERT) in acute cortical slices (Zhou et al. 1996). As expected, many thin and ramified 5-HT fibers containing small varicosities were observed in all cortical layers and close to GABAergic interneurons (see Fig. S2 in the Supplementary material). Furthermore, these slices exhibited a massive endogenous serotonin immunoreactivity in cortical input (L2/3 and L4) and output (L5) layers and to a lesser extent in the layer 6 (data not shown). Bath application of the selective SERT inhibitor citalopram (10 μM, 20 min) was then used in order to determine whether an increased tone of serotonin in the slice (Luparini et al. 2004) could affect the E–I balance in L5PN. SERT blockade led to a decreased amplitude of gT, gE, and gI when compared with the control response (Fig. 2*A*, layer 2/3 stimulation). Quantification of 18 experiments showed a large decrease in inhibitory conductance (roughly −25%) compared with excitatory conductance (Fig. 2*B*), and this led to a decreased inhibitory drive of the representative reconstructed voltage

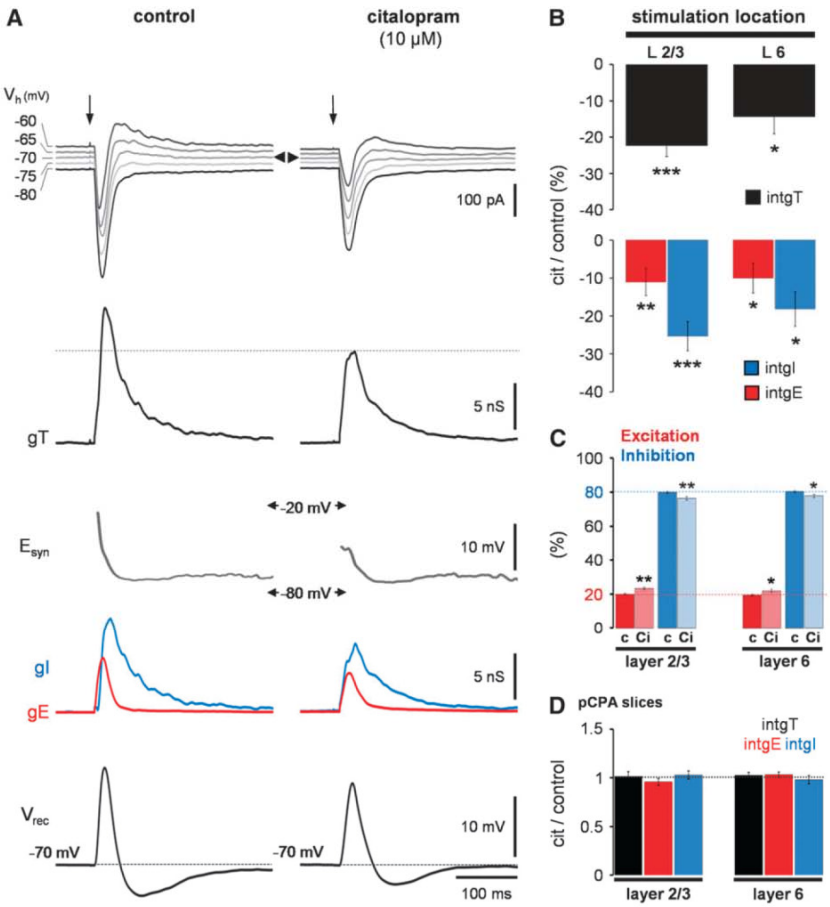


Figure 2. SERT blockades shift the E–I balance in favor of E. (*A*) Representative current responses to layer 2/3 before (control) and after (citalopram) perfusion of the selective SERT antagonist citalopram (10 μM, 30 min). Vertical arrows indicate the stimulation onset. Black triangles represent the 0 current line under voltage clamp. Corresponding gT (black line) and synaptic reversal potential change (Esyn) are represented under current traces for the 2 experimental conditions. Excitatory (gE, red line) and inhibitory (gI, blue line) conductance changes are obtained from gT decomposition (see Materials and methods) and represented below. Vrec traces show the reconstructed voltage drive of the current responses that should be observed in current clamp (see Materials and methods). (*B*) Histograms representing the relative change of the total (intgT, black), excitatory (ingE, red), and inhibitory (intgI, blue) conductance change integer after citalopram perfusion for layer 2/3 or 6 electrical stimulation ($n = 18$). (*C*) Stacked bar graph displaying the E–I balance (red for E and blue for I) expressed as percentage of the total conductance change in control (c) and citalopram (Ci) conditions for the 2 stimulation locations. (*D*) intgT (black), intgE (red), and intgI (blue) did not change after citalopram perfusion on 5-HT-depleted slices (pCPA slices, $n = 9$) for both stimulation locations. Error bars represent standard error of the mean. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

trace (Vrec, Fig. 2*A*). Indeed, SERT blockade produced an increased ratio of E and I from 19.9–80.1% to 23.4–76.6% (Fig. 2*C*, $P < 0.01$). This modulatory effect appeared 20 min after the onset of bath perfusion (no modulation was observed after 10 min). Similar modulations that increased net excitatory drive in L5PNs were observed when layer 6 was stimulated (Fig. 2*B,C*). Finally, as a control experiment, the perfusion of citalopram on 5-HT–depleted slices (pCPA depletion, see below and Materials and methods) failed to produce any significant change of gT, gE, and gI ($n = 9$, Fig. 2*D*).

In order to confirm this outcome, the pharmacological depletion of the serotoninergic system using the tryptophan hydroxylase inhibitor pCPA (see Materials and methods) was carried out. The depletion efficacy in pCPA-injected animals used for electrophysiological recordings was systematically checked by the immunolabeling of 5-HT fibers in cortical slices. Contrary to control animals (NaCl injected), almost all 5-HT fibers were depleted in each pCPA-injected animal, thus validating the depletion protocol (see Fig. S2). Whereas no significant modification of the current responses and conductance (Fig. 3*A*, "control") or of the E–I balance (Fig. 3*C*, "c") was reported in slice obtained from NaCl-injected animals, pCPA slices exhibited a decreased E–I balance (13.6–86.4%) compared with the typical 20–80% control set point (Fig. 3*C*, $n = 75$, $P < 0.001$, unpaired *U*-test; see also Fig. S3). This E–I balance shift appeared to be due to an increase in I as illustrated by the prominent GABAergic component of the composite current response that led to a dramatic increase of gI proportion over gE (Fig. 3*A*, middle panel, layer 2/3 stimulation). The corresponding Vrec showed a reduced excitatory drive (Fig. 3*A*, middle pannel) that can support a decrease of the putative responsiveness threshold of L5PNs after 5-HT depletion. Results obtained with layer 6 stimulation revealed a similar shift of the E–I balance after 5-HT depletion (Fig. 3*C*). Next, we checked whether this E–I balance shift was truly due to lack of activation of all 5-HTR subtypes in the slice or to a change in cortical connectivity during the 4 days of pCPA treatment, by perfusing exogenous serotonin (100 μM, 10 min) on pCPA slices. 5-HT perfusion strongly decreased intgI (compared with intgE that weakly decreased, Fig. 3*B*) and led to a partial recovery of the control E–I balance to 16.6–83.4% ($n = 21$, $P < 0.05$, Fig. 3*C*) and of the voltage drive shape (Fig. 3*A*, right panel). A similar recovery was obtained when the layer 6 was stimulated (see Fig. 3*B,C*). Altogether, these results strongly suggest that a global activation of 5-HTRs in visual cortex by endogenous serotonin shifts the E–I balance in favor of E. Because 5-HTRs' blockade in visual cortical slices has been shown to produce neuronal modulations depending on the endogenous 5-HT tone (see Edagawa et al. 2001), selective blockers were used to further dissect the specific modulatory function of four 5-HTR subtypes (1A, 2A, 3, and 7) in the serotoninergic tuning of the E–I balance.

5-HT$_{1A}$ Blockade Increases Excitatory and Inhibitory Input but Does Not Change the E–I Balance

The potent and selective antagonist N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pryidyl)cyclohexanecarboxamide (WAY)

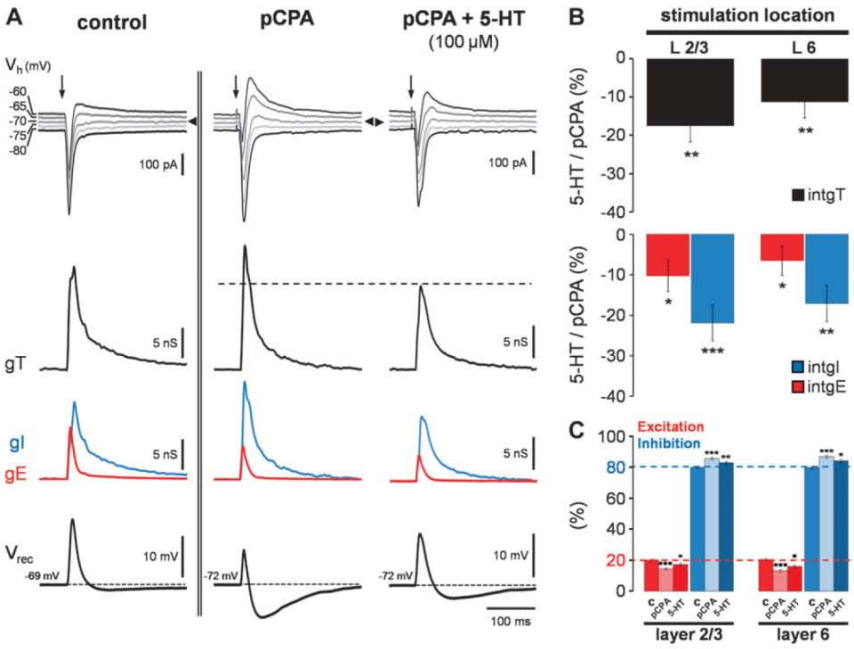


Figure 3. 5-HT depletion strongly shifts the E–I balance in favor of I. (*A*) Representative current responses of an L5PN to layer 2/3 stimulation recorded at various holding potentials in control condition after 5-HT depletion (pCPA) and after 5-HT perfusion (100 μM) on depleted slices (pCPA + 5-HT). Vertical arrows indicate the stimulation onset. Black triangles represent the 0 current line under voltage clamp. The corresponding total (gT, black line), excitatory (gE, red line), and inhibitory (gI, blue line) conductance changes, obtained after decomposition of the current responses, are represented under current traces. Vrec traces show the reconstructed voltage drive (Vrec) of the current responses that should be observed in current clamp. (*B*) Relative variations of total (intgT, black bars), excitatory (intgE, red bars), and inhibitory (intgI, blue bars) conductance change integers after 5-HT perfusion on pCPA slices. (*C*) Stacked bar graph displaying the E–I balance ratio (red for E and blue for I) in control (c, $n = 27$), pCPA (pCPA, $n = 75$), and pCPA + 5-HT (5-HT, $n = 21$) conditions for layer 2/3 or 6 electrical stimulation. *U*-test was used to compare the unpaired conditions control and pCPA. Error bars represent standard error of the mean. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

100635 (20 nM) was used to block the 5-HT_{1A}R in the cortical network. Both inward and outward currents evoked in the L5PN by layer 2/3 stimulation and the corresponding total (gT), excitatory (gE), and inhibitory (gI) conductances were increased after 5-HT_{1A}R blockade (Fig. 4*A*). Irrespective of the stimulation location, integers of total (intgT), excitatory (intgE), and inhibitory (intgI) conductances were similarly increased by, in average, roughly 35% (Fig. 4*B*, $n = 16$, $P < 0.01$). The E–I balance thus remained close to the 20–80% set point after 5-HT_{1A}R blockade whatever the stimulated layer was (Fig. 4*C*), and no change in the L5PN voltage drive shape was observed (not shown).

5-HT_{2A} Blockade Decreases or Increases the E–I Balance with Regard to Stimulation Location

Given the strong modulation of the E–I balance observed after the unselective blockade of whole 5-HT_2Rs with ritanserin (see Fig. S4), we emphasized on the role of the 5-HT_{2A} subtype using the selective MDL 11939 antagonist (400 nM). Surprisingly, a large increase of the inhibitory conductance and an unchanged excitatory one was observed with layer 2/3 stimulation (Fig. 5*A*, left), whereas they were both decreased with layer 6 stimulation (Fig. 5*A*, right) after 5-HT_{2A}R blockade. The quantification of 15 experiments confirmed these observations (Fig. 5*B*) and revealed a decreased (15.4–84.6%, $P < 0.01$) or an increased (22.9–77.1%, $P < 0.001$) ratio of E and I compared with the control set point when stimulation was applied in layer 2/3 or 6, respectively (Fig. 5*C*). Because the *M* factor increased when layer 6 was stimulated (from 0.68 to 0.76, $P < 0.05$), the shunting I decreased when deep layer 5-targeting afferents were recruited.

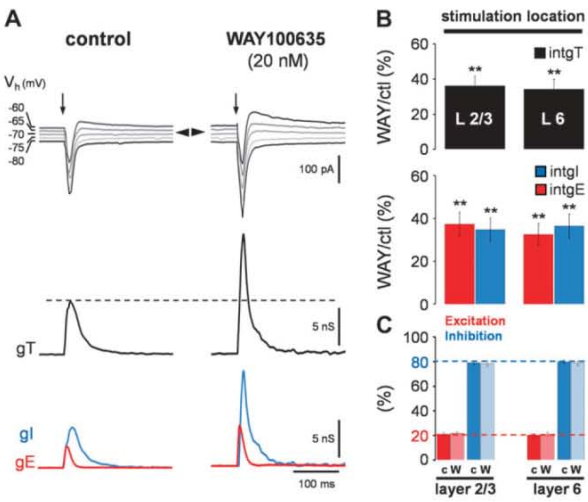


Figure 4. Blockade of the 5-HT_{1A}R increases excitatory and inhibitory inputs without shifting the E–I balance. (*A*) Representative current responses of an L5PN to layer 2/3 stimulation recorded at various holding potentials in control condition and after the blockade of the 5-HT_{1A}R subtype with WAY 100635 (20 nM). Vertical arrows indicate the stimulation onset. Black triangles represent the 0 current line in voltage clamp. Corresponding total (gT, black line), excitatory (gE, red line), and inhibitory (gI, blue line) conductances are represented under current traces. (*B*) Relative change of the total (intgT, black bars), excitatory (intgE, red bars), and inhibitory (intgI, blue bars) conductance change integers after WAY 100635 perfusion for layer 2/3 or layer 6 electrical stimulations. (*C*) Stacked bar graph displaying the E–I balance (red for E and blue for I) before (c) and after (W) 5-HT_{1A}R blockade ($n = 16$) for the 2 stimulation locations. Error bars represent standard error of the mean. $^{**}P < 0.01$.

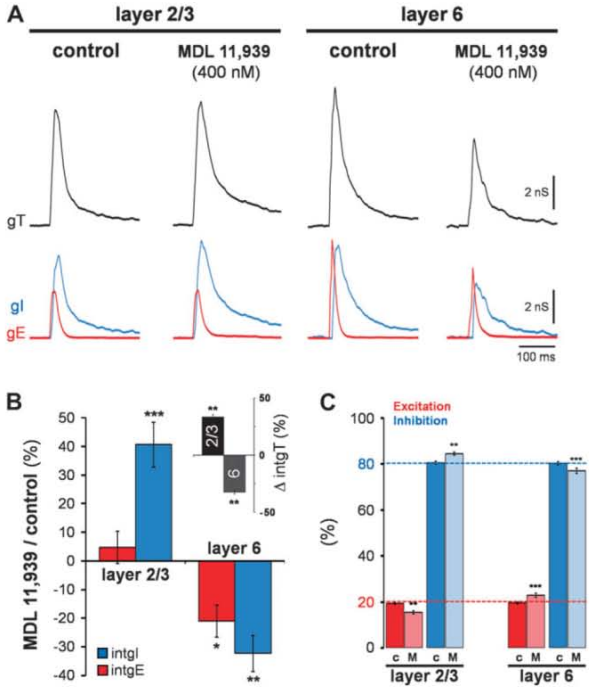


Figure 5. 5-HT_{2A}R blockade decreases or increases the E–I ratio depending on input location. (*A*) Representative total (gT, black line), excitatory (gE, red line), and inhibitory (gI, blue line) conductance changes in response to layer 2/3 or 6 electrical stimulation in the absence (control) or presence of a selective 5-HT_{2A}R antagonist (MDL 11939, 400 nM). (*B*) Relative changes of intgE (red bars) and intgI (blue bar) after 5-HT_{2A}–selective blockade, for stimulation in layer 2/3 ($n = 15$) or 6 ($n = 13$). Inset: relative variations of intgT in same conditions. (*C*) Bar graph displaying the E–I balance (red for E and blue for I) for both experimental conditions (c: control; M: MDL 11939). Error bars represent standard error of the mean. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

5-HT_7 Blockade Strengthens Inhibitory Drive in L5PNs

We then examined the role of 5-HT_7R positively coupled to adenylyl cyclase. Blockade of 5-HT_7Rs with 500 nM of the selective SB269970 antagonist led to an important increase of gT due to an increase of gE and gI (Fig. 6*A*). Indeed, intgI was strongly increased (+44 ± 9%, $P < 0.001$) compared with intgE (+18 ± 9%, $P < 0.05$) when layer 2/3 was stimulated (Fig. 6*B*), thus increasing the net inhibitory drive as illustrated by the reconstructed voltage responses (Fig. 6*A*) and the E–I balance changes (17.5–82.5% after SB269970 perfusion, Fig. 6*C*, $P < 0.001$). The *M* factor decreased from 0.67 to 0.57 ($P < 0.05$), indicating an increase in the shunting I. Similar modulations were obtained when layer 6 was stimulated (see Fig. 6*B*,*C*) except for the *M* factor that did not vary significantly.

L5PNs and Layer 6 Interneurons Show Distinct 5-HTR mRNA Profiles

In order to better understand the role of the 5-HT_{1A}, 2A, and 7Rs in the E–I balance tuning, we conducted single-cell reverse transcriptase (RT)-PCR experiments on L5PNs and deep interneurons of the visual cortex (see Materials and method for the identification of the cells). Cells were harvested, and the different mRNA profiles were established by reverse transcription and 2-round PCR amplification (see Materials and methods).

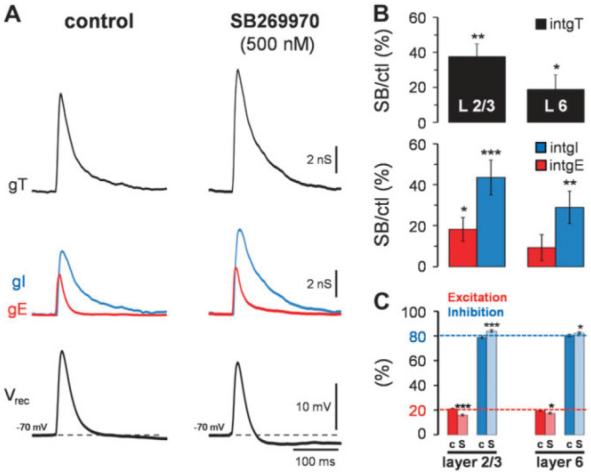


Figure 6. Blockade of the 5-HT$_7$R strengthens I in cortical networks. (*A*) Representative total (gT, black line), excitatory (gE, red line), and inhibitory (gI, blue line) conductance changes in response to layer 2/3 or 6 electrical stimulation in the absence (control) or presence of a selective 5-HT$_7$R antagonist (SB269970, 500 nM). Corresponding reconstructed voltage drives (Vrec) are shown below conductance traces. (*B*) Relative changes of intgT (black bars), intgE (red bars), and intgI (blue bar) after SB269970 perfusion for the 2 stimulation locations. (*C*) Bar graphs displaying the E–I balance (red: E; blue: I) for both experimental conditions (c: control; S: presence of SB269970). Error bars represent standard error of the mean. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

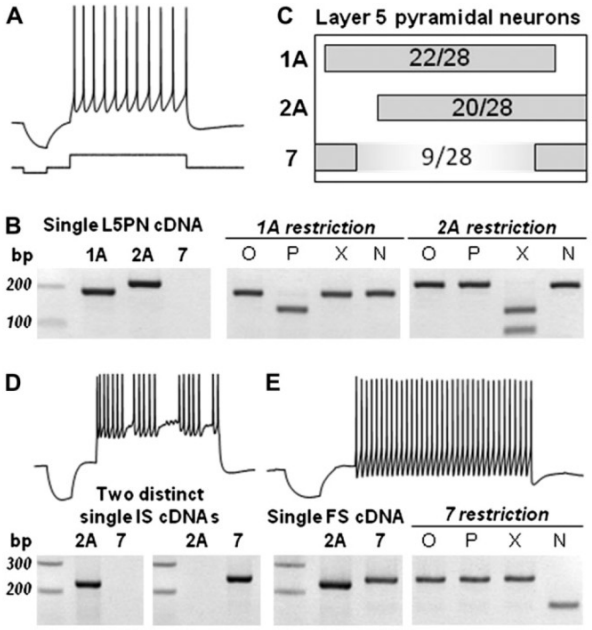


Figure 7. Single-cell 5-HTR subtype expression for L5PNs and L6 interneurons. (*A*) Typical spiking profile of an L5PN in which cytoplasmic content was harvested for further 5-HTR mRNA detection using the single-cell RT-PCR technique (see Materials and methods). (*B*) Negative image of an ethidium bromide–stained agarose gel showing RT-PCR amplification products obtained from the L5PN shown above. This neuron coexpresses both 5-HT$_{1A}$ and 5-HT$_{2A}$ mRNAs but does not express 5-HT$_7$R mRNAs. Two right panels: specificity of the amplified products checked by restriction (0: without restriction; P: *Pvu*II; X: *Xho*I; N: *Nco*I). (*C*) Bar plot showing the coordinated expression of 5-HTR mRNAs in a sample of 28 L5PNs. Bars overlapping indicate the extent of coexpression. (*D*) Typical spiking profile of a layer 6 irregular spiking (IS) interneuron (upper trace) and RT-PCR products obtained from 2 distinct single IS interneurons expressing either 5-HT$_{2A}$ or 5-HT$_7$ mRNAs. The left gel corresponds to the above IS cell spiking profile. No coexpression was observed for this class including both IS and stuttering cells ($n = 15$). (*E*) Spiking profile and the corresponding RT-PCR products of a layer 6 FS interneuron. All neurons of this class coexpress both 5-HT$_{2A}$ and 5-HT$_7$ mRNAs ($n = 6$). Lower right panel: specificity of the amplified 5-HT$_7$R product checked by restriction. The 5-HT$_{1A}$R mRNA was rarely detected in these interneurons (<10%). See Table 1 for primer sequences and product lengths.

A representative L5PN, whose typical spiking profile is shown in Figure 7*A*, coexpresses 5-HT$_{1A}$ and 5-HT$_{2A}$Rs but does not express the 5-HT$_7$R (Fig. 7*B*). In 28 individual L5PNs (Fig. 7*C*), a vast majority expressed the 1A or the 2A subtypes (79% or 71%, respectively) and 32% the 5-HT$_7$ subtype. A coexpression of both 1A and 2A subtypes was found in 63% of L5PNs. Three neurons coexpressed the 3 subtype mRNAs. 5-HT$_{2A}$R mRNA was also detected in single layer 6 pyramidal neurons (data not shown).

Two GABAergic populations are mostly expressed in the cortical layer 6: large basket cell and Martinotti cells. These interneurons target either L5PNs' soma and proximal apical/basal dendrites (basket cells) or distal apical and perisomatic dendrites (Martinotti cells), and both exhibit irregular spiking (IS) or fast spiking (FS) electrophysiological profiles (Markram et al. 2004). When pooled together, 62% of the interneurons harvested in the layer 6 (IS and FS cells) expressed the 5-HT$_{2A}$ mRNA (13/21) and 43% expressed the 5HT$_7$ mRNA (9/21). The 5-HT$_{1A}$ mRNA was rarely amplified (less than 10%). Individually, whereas IS cells (Fig. 7*D*) and STUT cells (stuttering, not shown) never coexpress 5-HT$_{2A}$ and 5-HT$_7$ mRNAs ($n = 15$), FS cells (Fig. 7*E*) show a strict coexpression of both of these subtypes ($n = 6$). These specific patterns strongly suggest a differential tuning role of 5-HT on the activity of distinct inhibitory populations that are known (Markram et al. 2004; Silberberg 2008) to influence dendritic processing and synaptic input integration in specific postsynaptic domains of L5PN dendrites (see also Fig. 9).

5-HT$_3$ Blockade Leads to an Afferent-Specific Increase of the E–I Balance

Finally, we investigated the role of the ionotropic 5-HT$_3$R. When layer 2/3 was stimulated, 5-HT$_3$R blockade with tropisetron (200 nM) elicited a weak decrease of intgT (Fig. 8*A* inset, −9 ± 2%, $P < 0.05$, $n = 17$), due to a surprising increase of intgE (+15 ± 6%, $P < 0.05$) and an expected decrease of intgI (−24 ± 7%, $P < 0.01$). This produced a strong shift of the E–I balance in favor of E (25.6–74.4% after tropisetron perfusion, Fig. 8*B*, $P < 0.001$) and thus increased the responsiveness threshold of L5PNs (see the increased excitatory drive of Vrec after 5-HT$_3$R blockade, Fig. 8*C*). In these conditions, the shunting I was decreased (the *M* factor increased from 0.68 to 0.80, $P < 0.01$). Interestingly, layer 6 stimulation failed to produce any significant modification of excitatory and inhibitory conductances (Fig. 8*A*) nor any changes in the E–I balance (data not shown) after 5-HT$_3$R blockade.

Discussion

We show in this study that a global activation of 5-HTRs by exogenous 5-HT or by endogenously released 5-HT both increases the net excitatory drive in L5PNs, and we reveal fine and differential modulations of the E–I balance in relation with both 5-HTR subtypes and stimulation location.

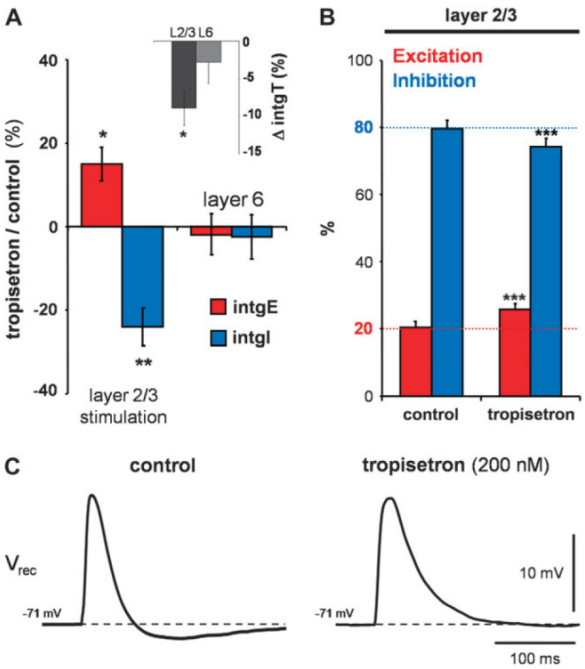


Figure 8. Blockade of the 5-HT_3R in outer cortical layers increases the net excitatory drive in L5PNs. (*A*) Variation of intgE (red bars) and intgI (blue bars) after 5-HT_3R–selective blockade (with 200 nM tropiseton) for both stimulation sites ($n = 17$). Inset: bar graph showing intgT variations after tropisetron perfusion (200 nM). (*B*) Bar graph displaying the E–I balance (red bars: E; blue bars: I) in control and tropisetron conditions with layer 2/3 stimulation. (*C*) Reconstructed voltage drive (Vrec) of the response evoked by layer 2/3 stimulation in control and tropisetron conditions. Error bars represent standard error of the mean. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

5-HT_{1A}Rs Tune Excitatory Transmission but not the E–I Balance in Cortical Networks

The hyperpolarizing 5-HT_{1A}R subtype is predominantly localized at the soma and axon hillock of pyramidal neurons (DeFelipe et al. 2001; Hoyer et al. 2002; Czyrak et al. 2003) and is widely pharmacologically targeted for depression, anxiety, and migraine (Lanfumey and Hamon 2004). In line with its controversial expression in cortical interneurons (Palchaudhuri and Flugge 2005), we revealed a very weak expression of the 5-HT_{1A}R mRNA in deep L5PN-targeting interneurons (see Fig. 7). Surprisingly, while an expected increase in excitatory inputs was observed after 5-HT_{1A}R blockade, inhibitory inputs were also increased in the same proportion (see Fig. 4*C*). This apparent discrepancy must be accounted for the specificity of the stimulated network. Indeed, because 90% of the I received by the recorded L5PN are disynaptic (Le Roux et al. 2008), the increase in inhibitory inputs is likely due to the upstream depolarization of excitatory networks targeting inhibitory interneurons that project on the recorded L5PN. This is a functional evidence for a lack of direct effect of the 5-HT_{1A}R in cortical inhibitory networks recruited by electrical stimulation of layers 2/3 or 6 because otherwise the increase in inhibitory inputs should have been stronger than the excitatory ones (after WAY 100635 perfusion). Moreover, because similar effects were observed with both stimulation sites (layer 2/3 or 6, see Fig. 4*C*), 5-HT_{1A}Rs should be homogeneously distributed in superficial and deep layers of primary visual cortex as observed elsewhere in cingulate cortex (Czyrak et al. 2003). Regarding the recurrent axonal projections between excitatory and inhibitory neurons in cortical columns (Bannister 2005), we bring here new functional data suggesting that 5-HT_{1A}Rs can strongly break the output of excitatory cortical networks (Amargos-Bosch et al. 2004) without changing the E–I balance in L5PNs.

Bidirectional and Afferent-Specific Tuning of the E–I Balance by 5-HT_{2A}Rs

The 5-HT_{2A}R is heavily expressed in L5PN soma and dendrites (especially in the proximal part, Bockaert et al. 2006), and its activation mediates E both in vitro and in vivo (Ali et al. 1999; Zhou and Hablitz 1999; Amargos-Bosch et al. 2004; Beique et al. 2004; Villalobos et al. 2005; Beique et al. 2007). Spontaneous inhibitory postsynaptic currents are also increased in pyramidal neurons following 5-HT_{2A}R activation (Zhou and Hablitz 1999). Nonetheless, it still remains hazardous to predict consequences of 5-HT_{2A}R activation on the E–I balance.

First, our results corroborate recent findings (Beique et al. 2007) showing that 5-HT_{2A}–mediated E in L5PNs depends on the activation of deep L5PN-targeting pyramidal neurons (see, in Fig. 5*B*, the discrepancy of intgE modulation between layer 2/3 and 6 stimulation). Activity of this deep L5PN population was most probably reduced in the presence of MDL 11939. If so, then a slightest disynaptic activation of deep interneurons projecting on L5PNs should also occur in these conditions. Indeed, we report a marked decrease of the inhibitory conductance when layer 6 was stimulated (Fig. 5*B*). This result also suggests the presence of 5-HT_{2A}Rs on a subpopulation of deep interneurons whose activity has decreased following 5-HT_{2A}R blockade (intgI is more decreased than intgE). In agreement with this, we found that 5-HT_{2A} mRNA is expressed in many layer 6 interneurons which are thought to be basket cells and Martinotti interneurons targeting L5PNs' soma and dendrites (see single-cell RT-PCR results), as previously proposed (Santana et al. 2004).

In contrast, the 5-HT_{2A}R should only be weakly expressed in layer 2/3 bipolar and double-bouquet interneurons (Markram et al. 2004) because this subtype is specifically expressed in parvalbumin- and calbindin-positive cells but not in calretinin cells (Jakab and Goldman-Rakic 2000; de Almeida and Mengod 2007). Both of these interneuron classes provide the vast majority of inhibitory inputs received by the apical dendrite of L5PNs and originating from superficial cortical layers (Markram et al. 2004). The unexpected increase in I reported after 5-HT_{2A}R blockade with layer 2/3 stimulation is thus consistent with a lack of 5-HT_{2A}R–mediated change in inhibitory afferent inputs onto L5PNs' apical dendrite (intgI would have decreased in the presence of MDL 11939 otherwise). Conversely, this latter result underlies a postsynaptic upregulation of inhibitory currents in L5PNs' apical dendrite (we showed that more than 70% of single L5PNs express the 5-HT_{2A}R mRNA) probably due to a decreased protein kinase C-dependent phosphorylation of dendritic $GABA_A$ receptors consecutive to 5-HT_{2A}R blockade (Feng et al. 2001). To conclude, we report distinct and layer-dependent actions of the 5-HT_{2A}R that strongly support a functional relevance of its specific distribution in a sensory circuit, and we propose a model for 5-HT_{1A}–5-HT_{2A} interaction

in dendritic integration (see Fig. 9) on the basis of the former proposal by Amargos-Bosch et al. (2004).

5-HT$_7$Rs Tune the E–I Balance Independently of the Stimulated Afferents

Up to now, very little information is known about the functional role of the 5-HT$_7$R in cortical processes (Hedlund and Sutcliffe 2004). Here, we report that blockade of this subtype produced a decrease of the E–I balance, due to a predominant increase of the I received by the recorded L5PN compared with a small increase of E. We also showed that a large proportion of layer 6 interneurons (43%) and more than 30% of single L5PNs expressed the 5-HT$_7$R mRNA (Fig. 7). Thus, due to the disynaptic organization of I in the stimulated network, the strong increase in I recorded in the L5PN after 5-HT$_7$R blockade is likely due to a combination of effects affecting both excitatory and inhibitory networks targeting L5PNs. Contrary to the 5-HT$_{2A}$ and 5-HT$_3$ subtypes that showed afferent-specific modulations, the modulatory effects mediated by the 5-HT$_7$ subtype appear unspecific of the stimulated afferents as expected, given its broad expression in various cortical layers, in both pyramidal cells and interneurons (Vanhoenacker et al. 2000; Neumaier et al. 2001). To conclude, the 5-HT$_7$R distribution in cortical networks appears functionally relevant in such a way that it should permit a broad modulation of the inhibitory drive received by the L5PN in response to synaptic activations in either superficial or deep cortical layers.

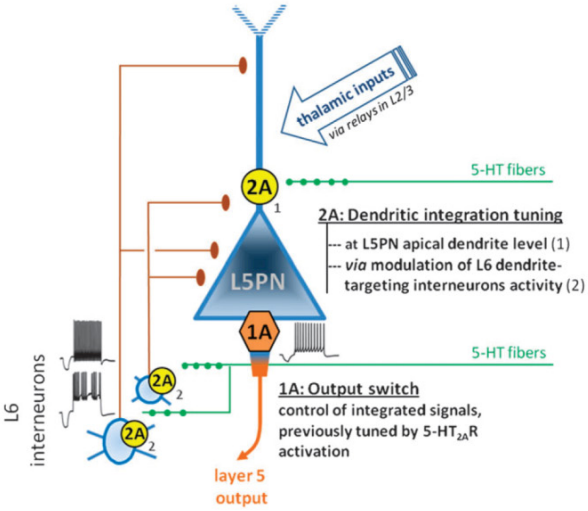


Figure 9. The 5-HT$_{1A}$–5-HT$_{2A}$ module in dendritic integration. The following model includes 4 experimental data: 1) both 1A and 2A subtype mRNAs are coexpressed in 63% of L5PNs, 2) the 2A subtype is highly expressed in layer 6 interneurons which are thought to be dendrite-targeting Martinotti and basket cells, 3) the 5-HT$_{2A}$ subtype allows a dual modulation of the E–I balance in L5PNs depending on the stimulated layer, and 4) the 5-HT$_{1A}$ subtype is not able to change the E–I balance in L5PNs but breaks glutamatergic transmission in pyramidal neurons. It is then assumed that 5-HT$_{2A}$R activation (yellow symbols) can tune the dendritic integration of thalamic inputs in L5PNs, directly at the L5PN apical dendrite level (1) and, indirectly, via the modulation (2) of the activity of deep interneurons targeting L5PN dendrites (Silberberg 2008). On the contrary, 5-HT$_{1A}$R activation (orange symbol) can act, downstream input integration, as an output switch of integrated signals without changing L5PN excitability. Thus, this functional scheme could be selectively activated by serotoninergic fibers originating from distinct raphe nuclei to decrease the local excitability of L5PN dendrites and break L5PN outputs (deep green fibers) or to increase L5PN excitability (upper green fibers) and finally to tune the input–output function of L5PN.

5-HT$_3$Rs Provide a Strong and Afferent-Specific Way to Decrease the E–I Balance in L5PNs

It is now well accepted that 5-HT$_3$Rs are preferentially expressed on interneurons (Puig et al. 2004; Palchaudhuri and Flugge 2005; Chameau and van Hooft 2006) and mainly restricted to cholecystokinin/calretinin/vasoactive intestinal peptide (VIP)-positive and somatostatin/parvalbumin-negative GABAergic cells (Morales and Bloom 1997; Ferezou et al. 2002). 5-HT$_3$Rs should therefore be restricted to bipolar cells and double-bouquet cells in upper cortical layers (Markram et al. 2004). Here, we bring the first functional evidence for a specific distribution of 5-HT$_3$Rs in superficial cortical layers (neither change in excitatory nor inhibitory conductances was observed after 5-HT$_3$R blockade when layer 6 was stimulated, Fig. 8) that match with the distribution of most 5-HT$_3$Rs in cortical layers 1, 2, and 3 (Puig et al. 2004). Thus, the decrease in I observed after 5-HT$_3$R blockade in upper layers (layer 2/3 stimulation) is most probably due to a decreased activity of bipolar and double-bouquet interneurons. As for the surprising increase in excitatory inputs, it is linked to the decrease in GABAergic shunting I, which normally attenuates distal inputs received by the apical dendrite of L5PNs. Indeed, the *M* factor is increased after 5-HT$_3$R blockade, and this should be mostly supported by the decreased activity of bipolar and double-bouquet interneurons which axons target the proximal part of L5PNs' apical dendrite (Markram et al. 2004) where the shunting I is the most efficient. Finally, these data reveal that the critical localization of the 5-HT$_3$R permits an efficient modulation of specific L5PN-targeting inhibitory networks, and this allows a fine-tuning of both E and I received by L5PN apical dendrite.

Functional Segregation of 5-HTRs and Cortical E–I Balance Fine-Tuning

Cortical inhibitory system must be highly regulated to match E regardless of the intensity and complexity of stimuli (Markram et al. 2004). Here, we revealed that serotonin and specific 5-HTR subtypes (5-HT$_{1A}$R excepted) predominantly tune inhibitory networks' activity and/or inhibitory input processing in L5PNs (modulations of the inhibitory drive of the stimulus-locked composite responses are always stronger compared with excitatory drive ones) and, via modulations of the shunting I, regulate excitatory input integration at the proximal part of L5PN apical dendrite (Semyanov et al. 2003, 2004), that is, before output editing at somatic level. Altogether, we highlight complex 5-HT modulations that resulted in a fine-tuning of the E–I balance around the 20–80% set point contrary to the partial blockade of GABA$_A$ receptors which enhances the E–I balance to a 40–60% ratio (Le Roux et al. 2008), a value which is discrepant with a normal cortical activity. Thus, we suggest that the functional segregation of various 5-HTR subtypes in excitatory circuits, in specific domains of L5PNs (dendrite, soma, or axon hillock), and in distinct populations of GABAergic interneurons allows the serotoninergic system to finely balance E and I while keeping the sensory responsiveness of L5PNs in a functional range (i.e., avoiding hyper- or hypoactivity) and so ensures a dynamic control of layer 5 output processing in cortical sensory networks. This also

questions the specificity of serotoninergic projections from various rhythmic raphe nuclei (Molliver 1987) that can lead to a continuous activation of some 5-HTRs on specific neuronal populations and therefore allowing a refine control of L5PN outputs in response to complex stimuli in vivo (Puig et al., 2005), in keeping with this view, understanding how the concerted action of multiple 5-HTR subtypes step in active cortical circuits seems critical to elucidate the pleiotropic functions of serotonin in normal and pathological states.

Supplementary Material

Supplementary materials can be found at http://www.cercor.oxfordjournals.org/.

Notes

We are grateful to Dr Michel Hamon for his helpful comments. Confocal microscopy imaging was performed on "The Imaging and Cell Biology facility" of the IFR87 (Gif sur Yvette, France). *Conflict of Interest*: None declared.

Address correspondence to Dr Philippe Fossier, CNRS, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif sur Yvette Cedex, France. Email: fossier@nbcm.cnrs-gif.fr.

References

Ali AB, Bannister AP, Thomson AM. 1999. IPSPs elicited in CA1 pyramidal cells by putative basket cells in slices of adult rat hippocampus. Eur J Neurosci. 11:1741–1753.

Amargos-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F. 2004. Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. Cereb Cortex. 14:281–299.

Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. 2007. Serotonin and epilepsy. J Neurochem. 100:857–873.

Bannister AP. 2005. Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. Neurosci Res. 53:95–103.

Beique JC, Campbell B, Perring P, Hamblin MW, Walker P, Mladenovic L, Andrade R. 2004. Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)1A, 5-HT2A, and 5-HT7 receptors. J Neurosci. 24:4807–4817.

Beique JC, Imad M, Mladenovic L, Gingrich JA, Andrade R. 2007. Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci USA. 104:9870–9875.

Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. 2006. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. Cell Tissue Res. 326:553–572.

Borg-Graham LJ, Monier C, Fregnac Y. 1998. Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. Nature. 393:369–373.

Bunin MA, Wightman RM. 1998. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. J Neurosci. 18:4854–4860.

Bunin MA, Wightman RM. 1999. Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. Trends Neurosci. 22:377–382.

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.

Chameau P, van Hooft JA. 2006. Serotonin 5-HT(3) receptors in the central nervous system. Cell Tissue Res. 326:573–581.

Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL. 2005. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. Nat Neurosci. 8:1059–1068.

Czyrak A, Czepiel K, Mackowiak M, Chocyk A, Wedzony K. 2003. Serotonin 5-HT1A receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. Brain Res. 989:42–51.

Dahlstrom A, Fuxe K. 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. Experientia. 20:398–399.

de Almeida J, Mengod G. 2007. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT(2A) receptors in human and monkey prefrontal cortex. J Neurochem. 103:475–486.

DeFelipe J, Arellano JI, Gomez A, Azmitia EC, Munoz A. 2001. Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. J Comp Neurol. 433:148–155.

Dori I, Dinopoulos A, Blue ME, Parnavelas JG. 1996. Regional differences in the ontogeny of the serotonergic projection to the cerebral cortex. Exp Neurol. 138:1–14.

Edagawa Y, Saito H, Abe K. 2001. Endogenous serotonin contributes to a developmental decrease in long-term potentiation in the rat visual cortex. J Neurosci. 21:1532–1537.

Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z. 2001. Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. J Neurosci. 21:6502–6511.

Ferezou I, Cauli B, Hill EL, Rossier J, Hamel E, Lambolez B. 2002. 5-HT3 receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. J Neurosci. 22:7389–7397.

Gu Q, Singer W. 1995. Involvement of serotonin in developmental plasticity of kitten visual cortex. Eur J Neurosci. 7:1146–1153.

Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA. 2006. Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. J Neurosci. 26:4535–4545.

Hedlund PB, Sutcliffe JG. 2004. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. Trends Pharmacol Sci. 25:481–486.

Higley MJ, Contreras D. 2006. Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. J Neurosci. 26:448–457.

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

Jakab RL, Goldman-Rakic PS. 2000. Segregation of serotonin 5-HT2A and 5-HT3 receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. J Comp Neurol. 417:337–348.

Jones BJ, Blackburn TP. 2002. The medical benefit of 5-HT research. Pharmacol Biochem Behav. 71:555–568.

Kehrer C, Maziashvili N, Dugladze T, Gloveli T. 2008. Altered excitatory-inhibitory balance in the NMDA-hypofunction model of schizophrenia. Front Mol Neurosci. 1:6.

Koch C, Douglas R, Wehmeier U. 1990. Visibility of synaptically induced conductance changes: theory and simulations of anatomically characterized cortical pyramidal cells. J Neurosci. 10:1728–1744.

Kornum BR, Licht CL, Weikop P, Knudsen GM, Aznar S. 2006. Central serotonin depletion affects rat brain areas differently: a qualitative and quantitative comparison between different treatment schemes. Neurosci Lett. 392:129–134.

Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, Walker MC. 2005. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? Prog Biophys Mol Biol. 87:33–46.

Lanfumey L, Hamon M. 2004. 5-HT1 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 3:1–10.

Larkman A, Mason A. 1990. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. J Neurosci. 10:1407–1414.

Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P. 2006. Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. Eur J Neurosci. 24:3507–3518.

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Baux G, Fossier P. 2008. Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks. Eur J Neurosci. 27:3244–3256.

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Fossier P. 2007. Involvement of NR2A- or NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in the

potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage. Eur J Neurosci. 26:289–301.
Lucas-Meunier E, Monier C, Amar M, Baux G, Fregnac Y, Fossier P. 2009. Involvement of nicotinic and muscarinic receptors in the endogenous cholinergic modulation of the balance between excitation and inhibition in the young rat visual cortex. Cereb Cortex. doi: 10.1093/cercor/bhn258.
Luparini MR, Garrone B, Pazzagli M, Pinza M, Pepeu G. 2004. A cortical GABA-5HT interaction in the mechanism of action of the antidepressant trazodone. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 28:1117–1127.
Marino J, Schummers J, Lyon DC, Schwabe L, Beck O, Wiesing P, Obermayer K, Sur M. 2005. Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. Nat Neurosci. 8:194–201.
Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci. 5:793–807.
Mason A, Larkman A. 1990. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. J Neurosci. 10:1415–1428.
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.
Mitchell SJ, Silver RA. 2003. Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. Neuron. 38:433–445.
Mody I. 2005. Aspects of the homeostaic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. J Physiol. 562:37–46.
Molliver ME. 1987. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. J Clin Psychopharmacol. 7:3S–23S.
Monier C, Chavane F, Baudot P, Graham LJ, Fregnac Y. 2003. Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. Neuron. 37:663–680.
Monier C, Fournier J, Fregnac Y. 2008. In vitro and in vivo measures of evoked excitatory and inhibitory conductance dynamics in sensory cortices. J Neurosci Methods. 169:323–365.
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.
Nathan T, Jensen MS, Lambert JD. 1990. The slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal CA1 neurones is blocked by intracellular injection of QX-314. Neurosci Lett. 110:309–313.
Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M. 2001. Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. J Chem Neuroanat. 21:63–73.
Palchaudhuri M, Flugge G. 2005. 5-HT1A receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. Cell Tissue Res. 321:159–172.
Poea-Guyon S, Amar M, Fossier P, Morel N. 2006. Alternative splicing controls neuronal expression of v-ATPase subunit a1 and sorting to nerve terminals. J Biol Chem. 281:17164–17172.
Priebe NJ, Ferster D. 2005. Direction selectivity of excitation and inhibition in simple cells of the cat primary visual cortex. Neuron. 45:133–145.
Puig MV, Artigas F, Celada P. 2005. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. Cereb Cortex. 15:1–14.
Puig MV, Santana N, Celada P, Mengod G, Artigas F. 2004. In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT3 receptors. Cereb Cortex. 14:1365–1375.
Roberts E. 1984. GABA-related phenomena, models of nervous system function, and seizures. Ann Neurol. 16(Suppl):S77–S89.
Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. 2004. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. Cereb Cortex. 14:1100–1109.
Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM. 2003. GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. Nat Neurosci. 6:484–490.
Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. 2004. Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. Trends Neurosci. 27:262–269.
Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA. 2003. Turning on and off recurrent balanced cortical activity. Nature. 423:288–293.
Silberberg G. 2008. Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. Curr Opin Neurobiol. 18:332–337.
Small DH. 2007. Neural network dysfunction on Alzheimer's disease: a drug development perspective. Drug News Perspect. 20:55763.
Staley KJ, Mody I. 1992. Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. J Neurophysiol. 68:197–212.
Thomson AM, Bannister AP. 1998. Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex. Neuroscience. 84:669–683.
Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE. 2000. 5-HT7 receptors: current knowledge and future prospects. Trends Pharmacol Sci. 21:70–77.
Villalobos C, Beique JC, Gingrich JA, Andrade R. 2005. Serotonergic regulation of calcium-activated potassium currents in rodent prefrontal cortex. Eur J Neurosci. 22:1120–1126.
Vu DH, Tork I. 1992. Differential development of the dual serotoninergic fiber system in the cerebral cortex of the cat. J Comp Neurol. 317:156–174.
Wehr M, Zador AM. 2003. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. Nature. 426:442–446.
Wehr M, Zador AM. 2005. Synaptic mechanisms of forward suppression in rat auditory cortex. Neuron. 47:437–445.
Wilent WB, Contreras D. 2004. Synaptic responses to whisker deflections in rat barrel cortex as a function of cortical layer and stimulus intensity. J Neurosci. 24:3985–3998.
Zhou FC, Xu Y, Bledsoe S, Lin R, Kelley MR. 1996. Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain. Brain Res Mol Brain Res. 43:267–278.
Zhou FM, Hablitz JJ. 1999. Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. J Neurophysiol. 82:2989–2999.

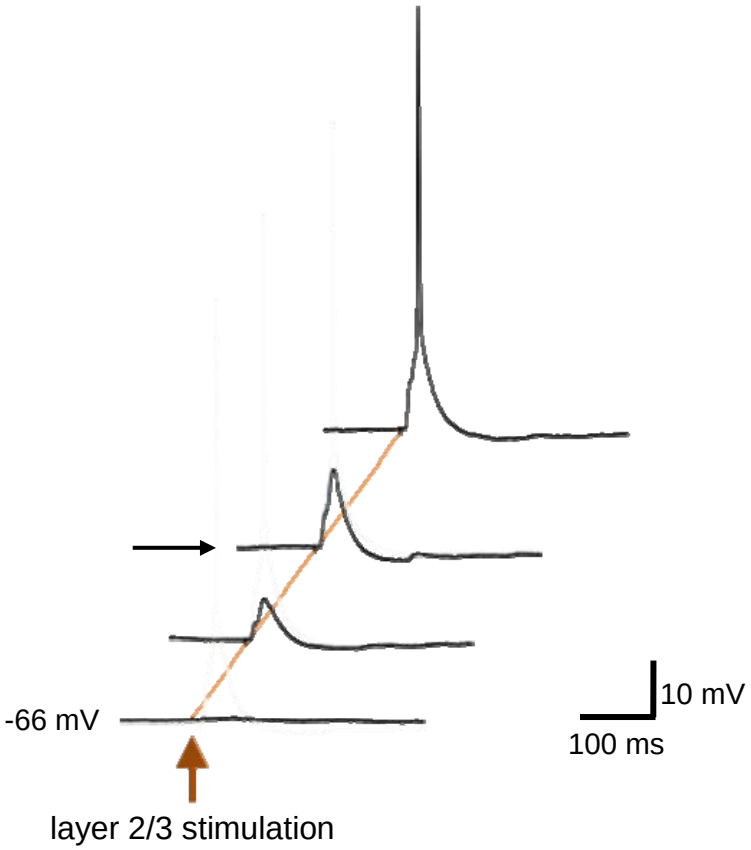


Fig. S1. Current clamp recordings of L5PN somatic response following layer 2/3 stimulation with different intensities of stimulation.

Voltage responses mainly exhibited two components: a fast depolarization followed by long-lasting hyperpolarization. Stimulation intensity was always set to 2-3 times the amplitude of the stimulation necessary to induce a detectable response in current clamp and was weak enough to avoid the initiation of action potential in the recorded L5PN. Black arrow represents the selected level of stimulation in all experiments.

Similar responses were obtained with layer 6 stimulation.

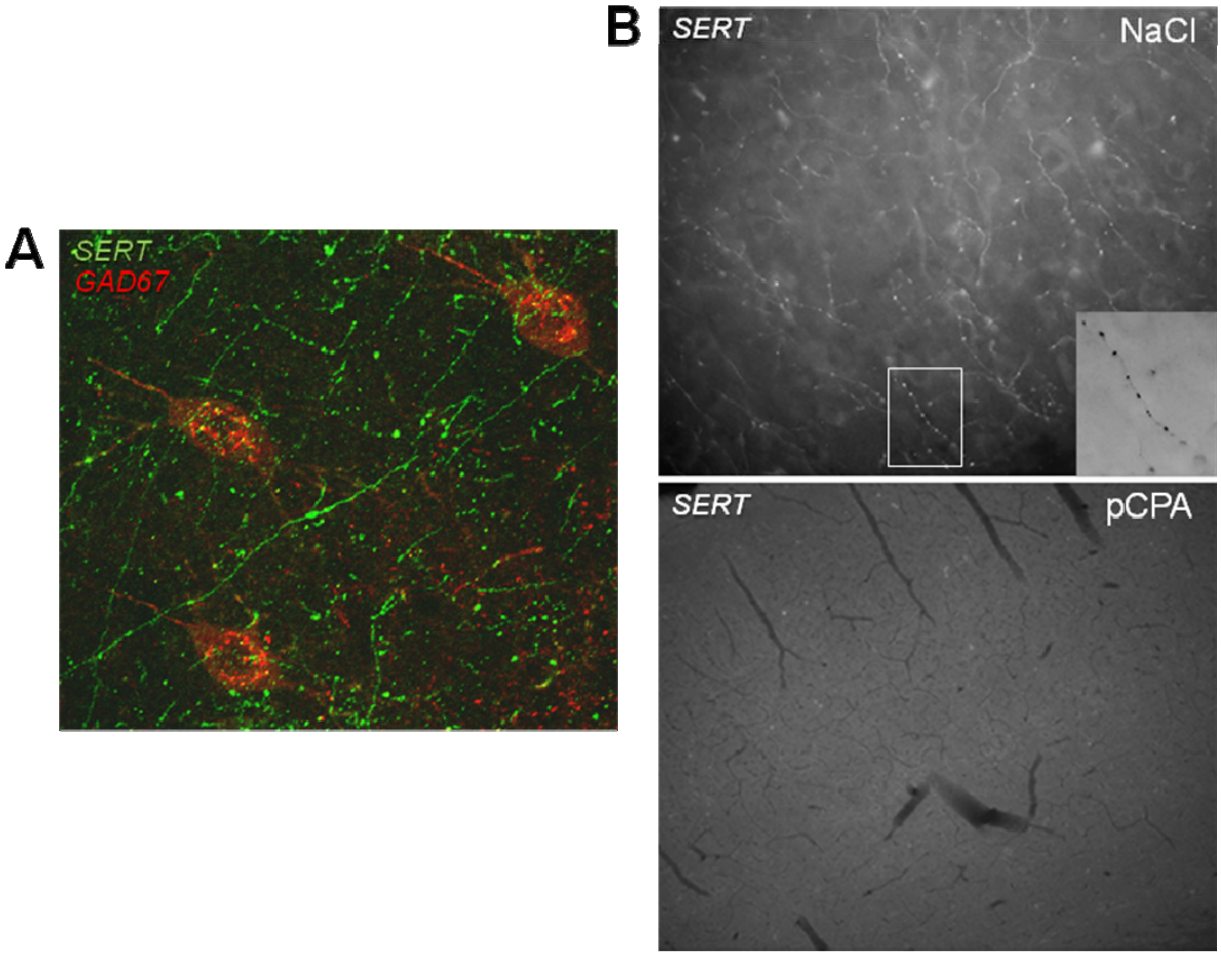
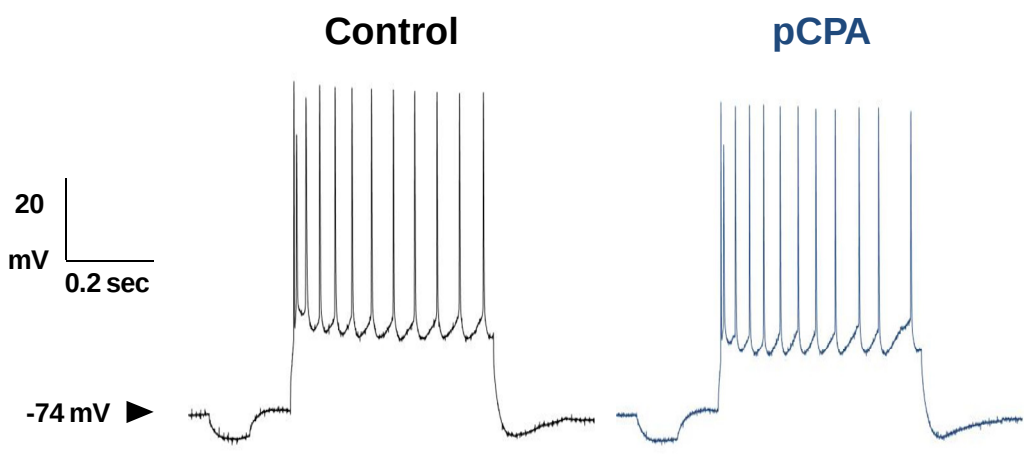


Fig. S2. 5-HT fibers in control and pCPA visual cortical slices.

A. Double staining confocal image illustrating cortical 5-HT fibers (SERT antibody, green) and GABAergic interneurons (GAD67 antibody, red) in a 25µm visual cortical slice.

B. Epifluorescence image of cortical 5-HT fibers in visual cortical slices obtained from NaCl-injected and pCPA-injected animals. The extensive 5-HT fibers networks observed in control animals are totally depleted in pCPA animals.



mAPs threshold:	**-41.2 ± 3.7 mV**	**-37.4 ± 3.1 mV***
mAPs amplitude:	**69.2 ± 7.9 mV**	**68.1 ± 5.2 mV**
mAPs width:	**3.2 ± 0.4 ms**	**3.4 ± 0.6 ms**

Fig. S3. L5PN spiking profiles recorded in control and pCPA slices.

The excitability behavior of each neuron was characterized by the discharge pattern in response to test depolarizing current pulses (+250 pA here). The mean resting potential (-75.1 ± 0.6 mV) and mean resting membrane resistance (255.3 ± 14.2 MΩ) of L5PNs recorded in 5-HT depleted slices (14 pCPA-injected rats, 75 neurons) did not differ significantly from those of the 27 control neurons (NaCl-injected, 4 animals): -74.6 ± 0.7 mV and 264.2 ± 18.9 MΩ, respectively. The mean spike amplitude and width did not change significantly after pCPA treatment, whereas the spiking threshold was slightly decreased in pCPA slices (see value under spiking profile, *$p < 0.05$, U-test). mAPs: mean of action potentials.

In control slices (isotonic NaCl-injected animals), the quantification and decomposition of the input conductance, evoked by layer 2/3 electrical stimulation, in excitatory and inhibitory components showed that the integers of total (intgT), excitatory (intgE) and inhibitory (intgI) conductance changes were equal in average to 369.5 ± 31.3, 74.3 ± 6.7 and 295.2 ± 27.4 a.u. (arbitrary units) respectively. For layer 6 stimulation, intgT, intgE and intgI values were in average 321.4 ± 23.7, 63.6 ± 5.3 and 257.8 ± 19.7 a.u respectively.

The somatic E-I balance in L5PNs, determined as the ratio between intgE (or intgI) and intgT, was thus similar with both stimulation locations: 20.1%/79.9% (layer 2/3) and 19.8%/80.2% (layer 6).

In 5-HT depleted slices (pCPA-injected animals), ingT, intgE and intgI values were: 473.7 ± 34.7, 64.4 ± 4.1 and 409.3 ± 28.4 a.u (layer 2/3 stimulation) or 409.3 ± 35.8, 51.9 ± 4.6 and 357.4 ± 31.9 (layer 6 stimulation) respectively. The somatic E-I balance determined in 5-HT-depleted slices was thus equal to 13.6%-86.4% (layer 2/3 stimulation) or 12.7%-87.3% (layer 6 stimulation).

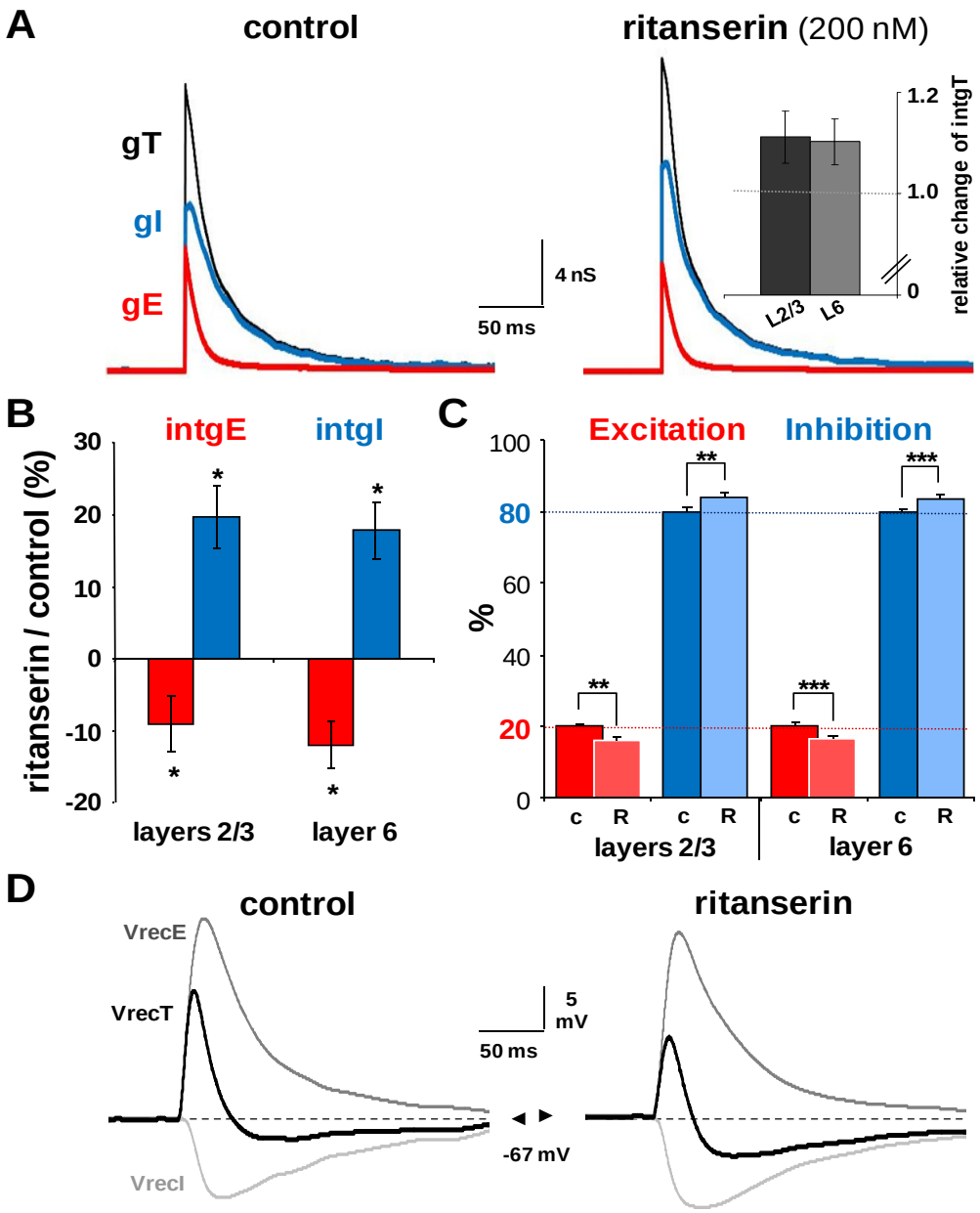


Fig. S4. Unselective blockade of 5-HT2 receptors simultaneously decreases excitation and increases inhibition.

A. Blockade of 5-HT2A, 2B and 2C receptors with ritanserin (200nM) increased both total (gT, black line) and inhibitory (gI, blue line) conductance changes but decreased gE (red line). Inset: Relative variations of intgT after 5-HT2Rs blockade, for stimulation in layer 2/3 or in layer 6. Similar results were obtained with both stimulation locations.

B. Ritanserin perfusion produced a decrease of the integer of excitation (intgE, red bars) by 9.1 ± 3.8 % or -12.3 ± 3.3 % and an increased of intgI by 19.7 ± 4.3 % or 17.9 ± 4.0 %, for layer 2/3 or 6 stimulation respectively ($n = 14$, $p < 0.05$ in all cases).

C. The E-I balance, illustrated as percent of the total conductance change (red bars for excitation and blue bars for inhibition), was decreased from 19.8%-80.2% to 15.9%-84.1% (layer 2/3, $p < 0.05$) or from 20.2%-79.8% to 16.4%-83.6% (layer 6, $p < 0.001$). c: control; R: in presence of ritanserin.

D. Reconstructed voltage drive (VrecT, black line) of the response evoked by layer 2/3 stimulation in control and ritanserin conditions showing that the excitatory drive of the voltage response is decreased after 5-HT2Rs blockade in favour of a larger inhibitory drive. The shunting inhibition weakly increased after ritanserin perfusion when layer 2/3 was stimulated (M decreased from 0.69 to 0.64, $p < 0.05$) but was unchanged when layer6 was. VrecE: contribution of the unique excitation drive (top grey line). VrecI: contribution of the unique inhibition drive (bottom grey line).

Single cell reverse transcriptase-PCR

Stable patch clamp recordings were obtained with the following RNase-free recording solution: 140 mM KMeSO4, 2 mM MgCl2, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.2 with KOH. Pipette glass was made RNase free by heating at 200°C for 2h, and both electrode holder and silver chloride wire were treated with RNAseAway (Molecular BioProducts, Inc., San Diego, CA). The electrode contents (containing ~3µL of the recording solution) were expelled into PCR Eppendorf tubes maintained in glass and containing 3 µL of the following 2X RT-mix: 12U RNasin, 60 ng of random hexamers (both Promega, France), 0.5 mM dNTP, 5mM DTT, 60U of Superscript III and 2X First-Strand Buffer and sterile DEPC water (Invitrogen, France). Complete expulsion of the electrode content was achieved by gently breaking the tip on the Eppendorf tube wall while applying positive pressure. The cDNA was synthesized as per the instruction of the manufacturer (25°C for 5min, 52°C for 60min, 70°C for 15min). Two rounds of PCR amplification were then performed to minimize problems associated with template abundance and PCR products were separated by electrophoresis in ethidium bromide-stained 3% agarose gels.

First, a multiplex PCR was performed. in a final volume of 60 µL by directly adding in the Eppendorf tube containing the cDNA product the following mix: 10 mM Tris/HCL, 50 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 0.5 µM dNTP, 0.5 mM of 5-HT_{1A} primers, 0.4 mM of 5-HT_{2A} primers, 0.7 mM of 5-HT_7 primers, and 2.5 U of Fast Start Taq DNA polymerase (Roche Applied Science, France). For the first-round PCR, the thermal cycler (Eppendorf Mastercycler ep gradient) was set as follows: 98°C for 30sec, 57°C for 30sec and 72°C for 25sec for 32 cycles. The second-round PCR was specific for each 5-HTR subtype and was performed by adding 1µL of the first multiplex PCR to Eppendorf tubes containing 10 mM Tris/HCL, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 µM dNTP, 0.5 mM of the specific primer and 1U of GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, France). Final products were obtained with 40 amplification cycles: 95°C for 30sec, 60°C for 30sec and 72°C for 30sec. Ten microliters of the the second-round PCR were separated by electrophoresis in ethidium bromide-stained 3% agarose gels.

Restriction digest used PvuII for the 5-HT_{1A}, XhoI for the 5-HT_{2A} and NcoI for the 5-HT_7 receptors (all enzymes were purchased from New England Biolabs, UK). Parallel control experiments in which the cellular template for the RT-PCR reaction was replaced by water were invariably negative. Additional control experiments where the cytoplasm harvest step was replaced by passing the recording electrode tip through the slice tissue were also negative.

2.2) Rôle modulateur du récepteur 5-HT$_4$ sur la balance E-I

Je me suis également intéressé au rôle d'un cinquième sous-type de récepteur 5-HT, le récepteur 5-HT$_4$. Ce récepteur possède d'intéressantes propriétés modulatrices des courants GABA$_A$ dendritiques dans les neurones pyramidaux de couche 5 et son activation tend à augmenter l'activité spontanée excitatrice dans le cortex (voir le Tableau 1 page 71). Sa localisation fine n'étant pas connue, j'ai tout d'abord réalisé l'immunomarquage de ce récepteur avec un anticorps commercial (Novus Biological) sur des tranches de cortex visuel de rat (figure 38, A-D), avant d'en déterminer l'action modulatrice sur la balance E-I (figure 38, E-F).

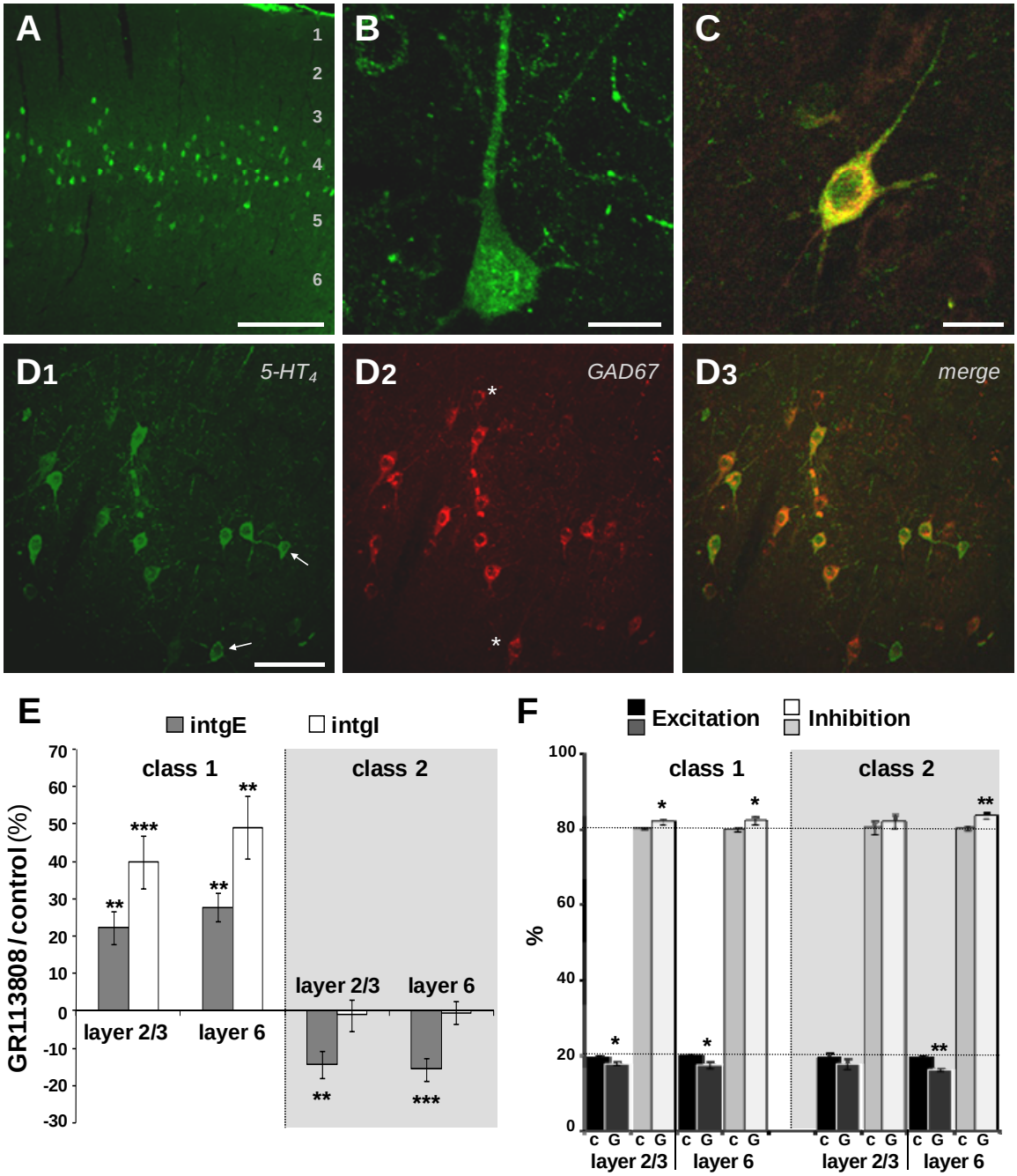


Figure 38. 5-HT$_4$ receptors are expressed in both pyramidal neurons and GABAergic interneurons and their blockade decreases the E-I balance

(**A**) 5-HT_4R labelling in a rat visual cortex slice. The white numbers indicate the different layers. (**B-C**), Max projection confocal images of 5-HT_4R immunoreactivity in a L5PN (B) or in a layer 4 interneuron (**C**) expressing GAD67 (not shown). **D1-D2**, Immunolabelling of 5-HT_4R (red) and GAD67 (green) in the layer 4. White arrows indicate non-GABAergic neurons expressing 5-HT_4R. White stars indicate GABAergic interneurons which do not exhibit 5-HT_4-IR. **D3**, Merged images of D1 and D2 showing 5-HT_4-containing GABAergic interneurons. Scale bars: A, 150 µm; B-C, 15 µm; D1-3, 25 µm. (**E**) Relative change of intgE (grey bar) and intgI (white bar) in a layer 5 pyramidal neuron after perfusion of GR113808 (500 nM) in response to layer 2/3 or 6 stimulations. Results are presented for two distinct classes of L5PNs, segregated on the basis of intgE variations. IntgE is increased (class 1) or decreased (class 2) after 5-HT_4R blockade. (**F**) Bar graph displaying the E-I balance (black bars: excitation, light grey bars: inhibition) for both classes (c: control; G: presence of GR113808). Error bars represent SEM. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

Conclusions :

- le récepteur 5-HT_4 est exprimé en grande quantité dans les interneurones GABAergiques des couches 3 et 4, et sur certains neurones non GABAergiques (très probablement glutamatergiques) de ces mêmes couches. Sa localisation apparait être à la fois somatique et dendritique.

- une proportion non négligeable de neurones pyramidaux de couche 5 exprime le récepteur 5-HT_4, avec un enrichissement au niveau de la dendrite apicale.

- le blocage du récepteur 5-HT_4 a des effets modulateurs bidirectionnels sur les entrées excitatrices et inhibitrices enregistrées dans les neurones pyramidaux de couche 5. Lors de l'analyse, deux classes d'effets ont été distinguées : augmentation de l'inhibition et de l'excitation (moins marquée) d'une part, et légère baisse de l'excitation sans effet sur l'inhibition d'autre part. Dans les deux cas, la balance E-I est modifiée en faveur de plus d'inhibition. Aucune modification significative du facteur M n'a été observée.

- les deux classes d'effets pourraient souligner l'existence de deux populations de neurones pyramidaux de couche 5 connectées différemment avec les neurones exprimant le récepteur 5-HT_4. Comme c'est le cas pour la régulation des récepteurs $GABA_A$ dendritiques (Cai et al., 2002), cet effet bidirectionnel pourrait aussi être du à des variations de l'activité basale (faible ou élevée) de la PKA (principal effecteur intracellulaire du récepteur 5-HT_4) dans les neurones pyramidaux de couche 5 enregistrés. Un niveau élevé, ou bas, de la PKA déterminerait alors, au niveau cellulaire, le type de modulation induite par l'activation des

récepteurs 5-HT_4 membranaires (*e.g.* régulation positive ou négative de certains récepteurs-canaux postsynaptiques et de l'excitabilité neuronale).

Perspectives :

- afin de vérifier cette hypothèse les expériences devront être reconduites en présence d'un inhibiteur ou d'un activateur de la PKA dans la pipette d'enregistrement. Si la direction de la modulation dépend effectivement de la variation de l'activité basale de la PKA, le blocage ou la sur-activation de cette dernière devrait favoriser l'un ou l'autre des effets observés. Ces expériences permettraient éventuellement de différencier un effet sur l'intégration dendritique d'un effet modulateur sur les réseaux corticaux en amont.

- dans ce sens, le blocage partiel des récepteurs $GABA_A$ du neurone pyramidal de couche 5 (par ajout de DNDS dans la pipette d'enregistrement) pourrait aider à différencier les effets sur les réseaux inhibiteurs afférents, des effets sur la régulation des récepteurs $GABA_A$ postsynaptiques.

- le récepteur 5-HT_4 pouvant avoir une activité constitutive (Claeysen et al., 1999), il serait enfin intéressant de réaliser des expériences de sur-activation du récepteur (application d'agoniste). A l'inverse, la mesure de la balance E-I devra être effectuée chez des souris invalidées pour le gène codant le récepteur 5-HT_4. Ceci pourrait renseigner sur l'existence d'un éventuel signal modulateur 5-HT_4 « tonique » dans la tranche cortical.

II. Implication du système sérotoninergique dans le contrôle homéostatique de la balance E-I

1) Position du problème

La première partie des résultats a révélé l'action complexe et multiple de la sérotonine sur les réseaux neuronaux corticaux et sur l'intégration des signaux qu'ils génèrent dans les neurones pyramidaux de couche 5. Les modulations sérotoninergiques de la balance E-I observées après le blocage de plusieurs sous-types de récepteurs 5-HT ont toujours été dans une gamme proche du « set-point » préalablement défini (20% d'excitation et 80% d'inhibition, Le Roux et al., 2006), et aucune modification drastique n'a été reportée (contrairement au blocage partiel des récepteurs $GABA_A$ qui augmente fortement la balance E-I à 60%-40%, Le Roux et al., 2008b). La sérotonine serait alors capable de maintenir l'excitabilité des neurones pyramidaux de couche 5 proche de son « set-point » tout en modulant, si nécessaire, l'intégration des entrées thalamiques (variation autour du set-point, voir la partie I de cette section). Dans ce cas, le système sérotoninergique serait impliqué dans la régulation homéostatique de la balance E-I.

Afin de vérifier cette hypothèse, des protocoles de HFS ont été appliqués en couche 2/3 (*voir la section Méthode*), pour induire des phénomènes de plasticité à long terme de type LTP au sein du réseau cortical stimulé, dans différentes conditions expérimentales : contrôle, déplétion sérotoninergique, blocage de la recapture de 5-HT ou blocage du récepteur $5\text{-}HT_{1A}$ (*voir la figure 42 p.156 pour un résumé de ces différentes expériences*).

Dans ces conditions, les protocoles HFS permettent de dépolariser suffisamment le neurone pyramidal de couche 5 pour le faire décharger (trains de potentiels d'action). Dans ce cas, et à la différence des résultats de la partie I, les boucles récurrentes entre le neurone pyramidal de couche 5 et les micro-circuits excitateurs et inhibiteurs en amont sont activées. Il devient alors très intéressant de déterminer le rôle modulateur de la sérotonine sur ces boucles de rétrocontrôle, rôle qui n'a pu être appréhendé lors de l'analyse des réponses sous-liminaires (voir la *partie I des Résultats*).

La mesure des conductances évoquées par la stimulation des couches 2/3, avant et après application du protocole HFS, renseignera tout d'abord sur l'impact des conditions expérimentales sur l'induction et le maintien de la LTP (sur une fenêtre d'une heure).

Puis la décomposition de la conductance totale en ses composantes excitatrice et inhibitrice permettra de déterminer si la sérotonine est impliquée, ou non, dans le contrôle homéostatique de la balance E-I.

2) Résultats

Selon le protocole illustré par la figure 39 ci-dessous (*voir aussi le paragraphe 2.2 p.113 dans la section Méthode*), j'ai en premier lieu appliqué des protocoles de stimulation à haute fréquence (HFS, pour induire une plasticité à long terme) en condition contrôle (perfusion des tranches corticales avec le liquide céphalorachidien artificiel seul). Les protocoles HFS ont toujours été appliqués en couche 2/3, et cela pour deux raisons. La première est liée à l'organisation des projections entre la couche 2/3 et les neurones de couche 5, à la fois directes et très bien caractérisées. En effet, la stimulation des neurones et des afférences des couches 2/3 permet d'activer le troisième relais cortical de traitement des informations thalamiques (*voir en Introduction, le paragraphe 1.3.1 p.24 et la figure 4 p.27*), pendant lequel l'intégration dendritique réalisée par les neurones de couche 5 est cruciale. Le contrôle homéostatique de l'activité des réseaux corticaux concernés étant établi (Le Roux et al., 2006), il m'est apparu essentiel d'en étudier la modulation. La deuxième raison concerne les boucles de rétrocontrôle récurrentes entre la couche 5 et la couche 2/3 qui semblent être indispensables au contrôle homéostatique de l'activité des neurones pyramidaux de couche 5 (Le Roux et al., 2008b), et qui seront recrutées par la stimulation choisie.

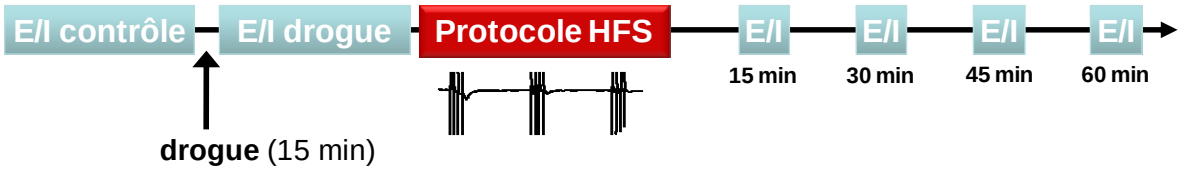


Figure 39. Protocole expérimental de plasticité homéostatique

La balance E-I est déterminée avant et après la perfusion de la drogue d'intérêt (stimulation de 0,2 ms à 0,05 Hz). Afin d'étudier l'effet modulateur de la drogue sur le contrôle homéostatique de la balance E-I, un protocole de stimulation à haute fréquence (HFS) est ensuite appliqué (en couche 2/3 uniquement), puis la balance E-I est de nouveau déterminée (stimulation de 0,2 ms à 0,05 Hz) après 15, 30, 45 et 60 minutes.

Afin de vérifier que la stimulation HFS est bien restreinte aux réseaux corticaux d'intérêt, la balance E-I a été déterminée en couche 2/3 puis en couche 6, suite à l'application du protocole HFS en couche 2/3 uniquement. Comme attendu (Le Roux et al., 2006), les résultats obtenus montrent une potentiation homéostatique (d'environ 50%) des entrées excitatrices et inhibitrices évoquées par la stimulation des couches 2/3 (figure 40A), et aucun effet significatif sur les réponses évoquées par la stimulation en couche 6 (figure 40B). Dans les deux cas, la balance E-I est maintenue au niveau de son set-point « 20%-80% » (figure 40C).

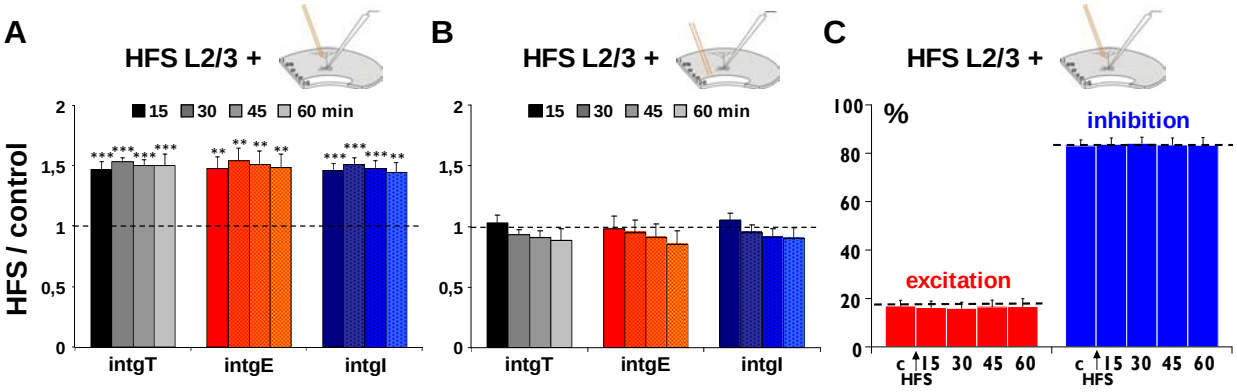


Figure 40. Homeostatic potentiation in layer 5 pyramidal neurons depends on the activation of local cortical networks

(**A**) Relative change of the integers of total (black), excitatory (red) and inhibitory (blue) conductances evoked by layers 2/3 stimulation 15, 30, 45 and 60 min after HFS protocol application in layers 2/3 (n = 23). Note that both E and I inputs received by layers 5 pyramidal neurons are potentiated on the same proportion. (**B**) As in *A*, the HFS was applied in layers 2/3 but the composite responses was evoked in layer 6 instead of layers 2/3 (n = 11). No change in excitatory or inhibitory conductances is observed under these conditions. (**C**) Bar histogram representing the E-I balance determined after HFS protocol application in layer 2/3 (cf. *A*). Note that the E-I ratio remained unchanged. A similar result was observed with layer 6 stimulation and HFS application in layer 2/3.

Les résultats de la figure 40 validant l'approche utilisée, j'ai en premier lieu déterminé l'effet global de la 5-HT sur le contrôle homéostatique de la balance E-I par la déplétion pharmacologique du système sérotoninergique (injections intrapéritonéales de pCPA, *voir le matériel et méthode dans Moreau et al., 2009*). Dans ces conditions, l'application d'un protocole HFS induit une forte potentiation des entrées inhibitrices sur le neurone pyramidal de couche 5, et une faible potentiation (non maintenue) des entrées excitatrices (figure 41A). Au contraire, une potentiation typique des entrées excitatrices et inhibitrices (en même proportion) est observée sur des tranches corticales de rats ayant reçu des injections de sérum physiologique (n = 19, NaCl isotonique à 0,9% – non figuré).

Alors que la balance E-I est inchangée pour le groupe contrôle (NaCl) après induction du protocole HFS, elle est significativement diminuée chez le groupe déplété en sérotonine (pCPA, figure 41B), ce qui renforce la prépondérance de l'inhibition déjà observée sur tranches pCPA (*i.e.* sans HFS, *voir la figure 3 dans Moreau et al., 2009*). Le contrôle homéostatique de la balance E-I est donc perdu après déplétion du système sérotoninergique, et cette dérégulation est toujours observée 60 minutes après l'application du protocole HFS (figure 41C).

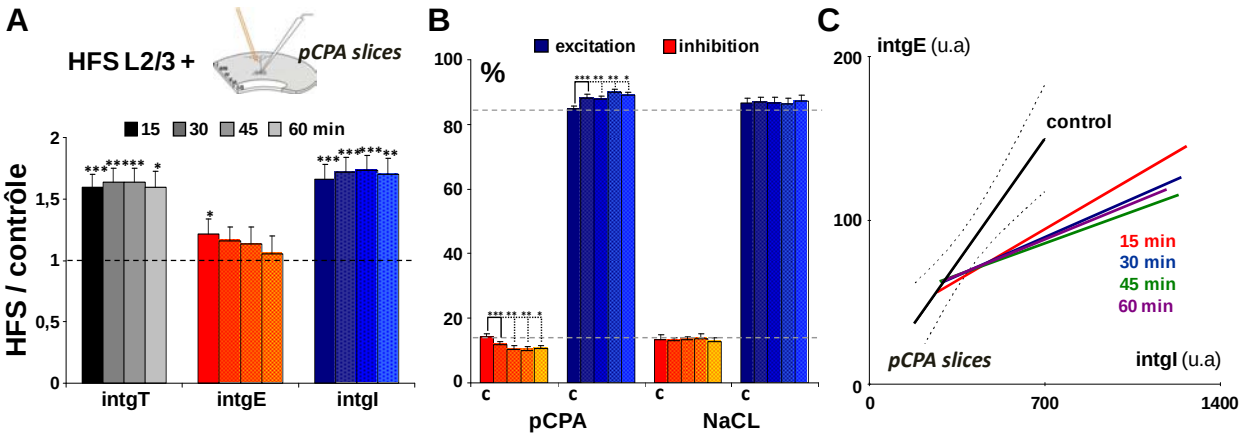


Figure 41. Serotonin depletion disrupts the E-I balance homeostatic regulation

(**A**) Relative variation of the integers of total (black), excitatory (red) and inhibitory (blue) conductance changes evoked by layers 2/3 stimulation, 15, 30, 45 and 60 min after HFS protocol application in layers 2/3, in 5-HT depleted slices (n =17 ; pCPA-injected rats, 200 mg/kg). (**B**) Bar histogram representing the E-I balance that was determined after HFS protocol application in layer 2/3 (cf. *A*), in pCPA or control (NaCl-injected rats) slices. c : E-I balance value before HFS induction ; each other bar corresponds to 15, 30, 45 and 60 min (as in *A*). (**C**) Relationship between intgE and intgI for each recorded neuron and corresponding linear regretion (pCPA condition). The control linear regression (before HFS induction) and its 95% confidence interval (dotted lines) are represented in black. The linear regretions calculated 15 (red), 30 (blue), 45 (green) and 60 (violet) min after the HFS induction are excluded of the 95% confidence interval of the control regretion.

Pour déterminer l'origine de la perte du contrôle homéostatique, j'ai tout d'abord voulu savoir si l'augmentation de la concentration de 5-HT extracellulaire (endogène), et donc l'activation de l'ensemble des récepteurs sérotoninergiques de la tranche corticale, avaient un effet significatif. Pour cela, le citalopram, un bloqueur sélectif du transporteur membranaire de la 5-HT (SERT, *voir le chapitre 2 p.56 dans la partie II de l'Introduction*) a été perfusé sur les tranches corticales. Dans ces conditions, aucune potentiation n'a été possible, que ce soit pour les entrées excitatrices ou inhibitrices (figure 42A-B, condition citalopram) et la balance E-I n'a pas été modifiée (non figuré). Au contraire, le protocole HFS semble provoquer une

légère dépression des entrées synaptiques, même si cet effet n'est pas significatif (figure 42A, tracé bleu). Ce résultat confirme l'effet globalement inhibiteur de la sérotonine sur la LTP corticale (Egadawa et al., 2001), mais ne permet pas de conclure sur le rôle des récepteurs 5-HT dans le contrôle homéostatique de la balance E-I.

C'est pourquoi, j'ai ensuite réalisé le même type d'expérience en présence d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{1A}, le WAY 100635. Les résultats obtenus montrent une perte de la régulation homéostatique de la balance E-I (figure 42B, condition WAY 100635) qui se traduit par une forte potentiation de l'inhibition associée à une potentiation nettement plus faible de l'excitation. Cet effet est similaire à celui observé sur tranches pCPA (bien que la légère potentiation de l'excitation soit ici maintenue) et conduit à une augmentation significative de la balance E-I (non figuré). La sous-activation, ou un défaut d'activation, du récepteur 5-HT_{1A} semble donc altérer le contrôle homéostatique de la balance E-I dans le cortex visuel.

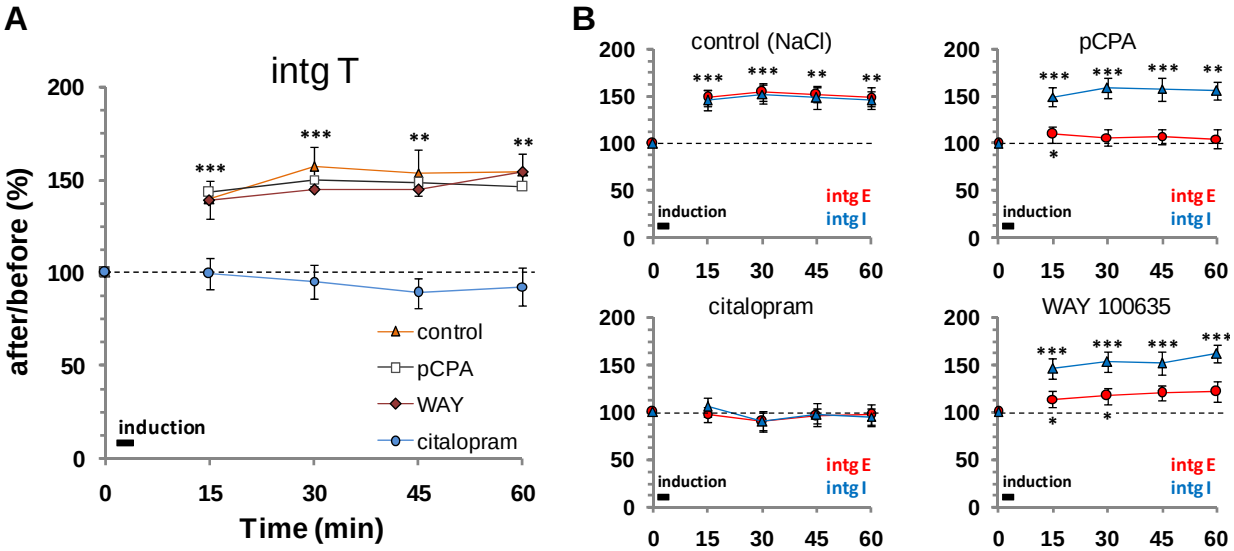


Figure 42. The 5-HT_{1A}R is required for the E-I balance homeostatic regulation

(**A**) Relative change of the total integer of the composite response (intgT) recorderd in layer 5 pyramidal neurons, after HFS induction in layer 2/3, under the following experimental conditions : NaCl-injected animals (control, orange triangle), 5-HT depleted slice (pCPA, 200 mg/kg ; white boxes), 5-HT_{1A} blockade (red diamons) or SERT blockade (citalopram, 10 µM ; blue circles). Dashed line represents the relative value of intgT before HFS induction. (**B**) Decomposition of the relative changes of intgT shown in *A*, in their exitatory (intgE, red) and inhibitory components (intgI, blue). Axis' captions are the same than in *A*. Dashed lines represent the relative value of intgE and intgI before HFS induction.

Les résultats présentés dans cette seconde partie seront discutés dans la section Discussion & Perspectives.

III. Rôle de l'interaction Nck2/PAK3 dans la modulation de la transmission synaptique excitatrice

1) Position du problème

La kinase PAK3, ou "p21-activated kinase 3", est une serine/thréonine kinase qui est activée par sa liaison aux petites GTPases (Cdc42, Rac1), et qui est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette neuronal et dans la dynamique des épines dendritiques.

Au niveau du système nerveux central, la kinase PAK3 neuronale a un rôle important dans la plasticité synaptique et dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Chez l'Homme, la mutation du gène *PAK3* peut être, à elle seule, à l'origine du retard mental non syndromique. L'invalidation du gène *PAK3* chez la souris conduit, par exemple, à une altération de la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe, à une diminution de la signalisation dépendante du facteur CREB et à des défauts cognitifs (Meng et al., 2005). La surexpression de certaines formes de PAK3 portant les mutations responsables du retard mental, dans des neurones en culture, provoque des anomalies de structure des épines dendritiques (Boda et al, 2004 ; Kreis et al., 2007). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces effets sont toutefois inconnus.

En 1999, des travaux réalisés chez la drosophile ont révélé que l'interaction de PAK avec les protéines Nck est indispensable pour le guidage axonal correct des axones des photorécepteurs de la rétine (Hing et al., 1999). Il est désormais établi que l'interaction PAK/Nck est essentielle à l'organisation des cascades de signalisation dépendantes des kinases PAK. Bien que les adaptateurs Nck aient un rôle central dans la régulation du cytosquelette d'actine, leurs implications dans le contrôle de l'activité neuronale sont méconnues. Parmi les membres de la famille Nck, l'adaptateur Nck2 est fortement exprimé dans le néocortex (Lein et al., 2007; Cahoy et al., 2008) et est impliqué dans la régulation de la plasticité neuronale (Segura et al., 2007 ; Guan et al., 2007 ; Xu et Henkemeyer, 2009).

C'est pourquoi, en collaboration avec le groupe de Jean-Vianney Barnier, j'ai étudié le rôle de l'interaction entre PAK3 et son adaptateur Nck2 dans la transmission synaptique glutamatergique. Une fois les évidences biochimiques de l'interaction PAK3/Nck2 acquises, nous avons conduit deux approches électrophysiologiques complémentaires.

La première a consisté à observer les effets de la surexpression d'une forme sauvage, ou d'un mutant d'interaction de PAK3, sur l'amplitude et la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs miniatures (mEPSCs), enregistrés dans des neurones d'hippocampe de souris en culture. La mutation utilisée dans ce cas (PAK3-P12A) est connue pour empêcher spécifiquement l'interaction de PAK3 avec Nck2. Chaque forme de PAK3 a été étiquetée avec une protéine GFP pour permettre l'identification des neurones transfectés. Les mEPSCs ont été enregistrés en présence de bicuculine et de TTX dans le bain de perfusion. La TTX bloque le déclenchement des potentiels d'action et permet de s'affranchir des libérations évoquées par l'activité du réseau.

La seconde approche a été menée sur tranches de cortex visuel de rat, et a permis de déterminer, de façon plus précise, le rôle de l'interaction PAK3/Nck2 dans la régulation des courants excitateurs enregistrés dans les neurones pyramidaux de couche 5 (suite à une stimulation des réseaux corticaux afférents des couches 2/3). Pour cela, un peptide inhibiteur de l'interaction PAK3/Nck2 (mimétique de la première région riche en prolines de PAK3) a été injecté dans les neurones de couche 5 *via* la pipette de *patch clamp* (des expériences de co-immunoprécipitation ayant confirmé l'efficacité du peptide d'un point de vue biochimique). Il est important de noter que la première approche nous a permis d'explorer le rôle de l'interaction PAK3/Nck2 à moyen terme (après au minimum deux jours de transfection) alors que la seconde approche renseigne sur des effets rapides (moins d'une heure).

2/ Résultats

"p21-activated kinase 3 regulates AMPA receptor-dependent synaptic transmission through interaction with the Nck2/Grb4 Adaptor"

Emmanuel Thévenot, Alexandre William Moreau, Olivier Goupille, Véronique Rousseau, Muriel Amar, Patricia Kreis, Philippe Fossier, and Jean-Vianney Barnier

Article soumis, et en cours de modification

Dans cet article (voir ci-après), j'ai réalisé les expériences de la figure 4 et de la figure 6 et participé à la rédaction.

Principales conclusions :

La surexpression de PAK3-wt (sauvage) dans les cultures de neurones provoque une diminution significative de l'amplitude des mEPSCs sans en affecter la fréquence (Fig. 4). Cet effet n'étant pas observé avec la surexpression de la forme mutée PAK3-P12A (qui ne lie plus Nck2), nous avons conclu qu'il dépend de l'interaction de PAK3 avec son adaptateur Nck2. Comme nous l'attendions, l'absence de modification de la fréquence des mEPSCs suggère que l'effet modulateur du complexe PAK3/Nck2 sur la transmission synaptique dépend d'une signalisation postsynaptique.

Cette modulation est apparue indépendante d'une modification morphologique des épines dendritiques (Fig. 5) et pourrait, au contraire, impliquer une action directe du complexe PAK3/Nck2 sur les récepteurs AMPA postsynaptiques.

Cette hypothèse a été validée par le blocage de l'interaction PAK3/Nck2 dans la dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5 (par dialyse du peptide inhibiteur dans la pipette d'enregistrement). L'injection d'une molécule fluorescente (polymère de Dextran-FITC de 3 kDa) dans les mêmes conditions a permis, d'estimer la vitesse de diffusion du peptide inhibiteur utilisé (seulement 1,7 kDa), et de s'assurer qu'il diffuse jusque dans la partie distale de la dendrite apicale (en une vingtaine de minutes, non figuré). Nous avons observé que l'amplitude des courants synaptiques excitateurs (de type AMPA/kaïnate), évoqués par la stimulation des couches 2/3 et enregistrés au niveau somatique après intégration dendritique, augmente progressivement après la dialyse du peptide dans le cytoplasme. L'augmentation se stabilise ensuite autour d'un plateau correspondant à +40 % de l'amplitude initiale (l'effet apparaît en 20-30 minutes) (Fig. 6, peptide « wt »). Au contraire, aucune modification de l'amplitude des courants n'a été observée lorsque les neurones ont été dialysés avec un peptide muté qui n'interagit pas avec Nck2 (Fig. 6, peptide « P12A »).

L'ensemble de ces résultats montre que la kinase PAK3 est impliquée dans une régulation négative des courants excitateurs de type AMPA dans le cortex, et que cette régulation requiert l'interaction spécifique de la kinase avec son adaptateur moléculaire Nck2

Perspectives :

Ces résultats ont révélé l'effet inhibiteur de PAK3 sur les courants AMPA dans un cortex sensoriel, comme cela avait été suggéré dans l'hippocampe (Boda et al., 2004). Néanmoins, les mécanismes moléculaires de régulation des récepteurs AMPA sous-jacents ne sont pas connus. Ils pourraient impliquer leur dimérisation, leur phosphorylation ou leur trafic intracellulaire et leur internalisation (Isaac et al., 2007 ; Essmann et al., 2008), ce qui modifierait leur activité ou leur nombre au niveau de la densité postsynaptique. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives de modulation de la transmission excitatrice dans le cerveau, par une interaction entre les kinases, leurs adaptateurs moléculaires, et les différents systèmes postsynaptiques de régulation de la transmission excitatrice.

p21-activated kinase 3 Regulates AMPA Receptor-dependent Synaptic Transmission
through Interaction with the Nck2/Grb4 Adaptor

Abbreviated title: PAK3 regulates synaptic transmission through Nck2

Authors: Emmanuel Thévenot, Alexandre William Moreau, Olivier Goupille, Véronique Rousseau, Muriel Amar, Patricia Kreis, Philippe Fossier, and Jean-Vianney Barnier

Address: CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Gif sur Yvette, France. O.G. present address: CNRS, Institut Pasteur, Génétique Moléculaire de la Morphogenèse, Paris, France. P.K. present address: King's College London, MRC Centre for Developmental Neurobiology, London, United Kingdom

Corresponding author: Jean-Vianney Barnier, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS, 1 avenue de la terrasse, 91198, Gif-sur-Yvette, France ; Email : barnier@nbcm.cnrs-gif.fr

Keywords: Dendritic spine; Synaptic transmission; AMPA receptor; Kinase; Peptide; Perfusion

Acknowledgments

We thank Wei Li for Nck plasmids and Dominique Muller for the PSD95-DsRed2 plasmid. We also thank Annie Lamouroux for the help in Q-PCR, Julie Perroy for advice in mouse neuronal cultures, Sandrine Poëa-Guyon for help in confocal imaging, and Gérard Sadoc for the electrophysiological recording software. We thank Seana O'Regan for helpful comments on the manuscript. This work was supported in part by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-MNP-2009), the Fondation Jérôme Lejeune, and by a fellowship from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (E.T.)

Abstract

Mutations in the p21-activated kinase 3 gene are responsible for mental retardation and the PAK3 protein plays a major role in synaptic plasticity and in learning and memory. Indeed PAK3-null mice show cognitive defects, LTP alteration, and a decreased phospho-CREB signalling whereas expression of proteins bearing mental retardation mutation in hippocampal neurons leads to dendritic spine anomalies. The molecular mechanisms underlying its functions remain however unknown. We report here a specific interaction between PAK3 and the Nck2/Grb4 adaptor. We showed that, in contrast to PAK1, active and inactive PAK3 proteins interacted with Nck adaptors since the serine 20 residue which is the major regulation site for PAK1 interaction, is not autophosphorylated. A single point mutation in PAK3 at proline 12 residue totally abolished this interaction. Expression of wild-type PAK3 in these neurons decreased the amplitude of AMPA receptor-dependent miniature EPSCs whereas the expression of PAK3-P12A did not. The PAK3 modulation on synaptic transmission is not due to modification in the dendritic spine architecture. Perfusion of a PAK3/Nck2 competing peptide into layer 5 pyramidal neurons specifically increased evoked AMPA receptor-dependent currents. These results suggest that PAK3 down regulates AMPA receptor-dependent synaptic transmission through an undescribed interaction between PAK3 and Nck2.

Introduction

Mental retardation is the most frequent human cognitive disease and several genes responsible for mental retardation have been identified. Among these genes, *PAK3* located on the X chromosome, encodes for a p21-activated kinase (PAK) of group I which also includes PAK1 and PAK2 (Allen et al., 1998). PAKs are effectors of Rac1 and Cdc42 GTPases and play an important role in the regulation of cytoskeleton dynamics (Bokoch, 2003). Recent data demonstrate their role in synaptic plasticity and in spinogenesis (Kreis & Barnier, 2009). Indeed, knockout of PAK3 leads to anomalies in long-term potentiation (LTP) and deficiencies in learning and memory (Meng et al., 2005), and expression of PAK3 genes with kinase-dead or mental retardation mutations in hippocampal neurons alters spinogenesis (Boda et al., 2004; Zhang et al., 2005; Kreis et al., 2007). Nevertheless, how PAK3 regulates synaptic plasticity is still largely unknown (Boda et al., 2006; Humeau et al., 2009; Kreis & Barnier, 2009).

PAK proteins need to be recruited to the membrane to be activated by Rac1 and Cdc42 GTPases. One mechanism for the membrane-recruitment is led by the Nck proteins (Nck1/Nckα and Nck2/Nckβ/Grb4) each containing one SH2 domain and three SH3 domains (Bagrodia et al., 1995; Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996; Lu et al., 1997). They link membrane-localized phosphotyrosine residues to proline-rich domain (PRD)-containing proteins implicated in cytoskeleton regulation (Buday et al., 2002). The Nck/PAK interaction is crucial for PAKs signaling. Indeed, a mutation which abrogates Nck interaction generates defects of photoreceptor axon pathfinding in drosophila (Hing et al., 1999). Moreover the phosphorylation-dependent regulation of the PAK1/Nck1 interaction was shown to control cell spreading, polarization, and migration (Zhao et al., 2000; Zhou et al., 2003; Fryer et al., 2006). Recent data show that Nck1 and Nck2 play different roles in spinogenesis and synaptic plasticity (Pilpel & Segal, 2005; Segura et al., 2007; Xu & Henkemeyer, 2009). Interestingly, Nck2 is implicated in dendritic spine morphogenesis upstream to EphrinB signaling (Segura et al., 2007) which also regulates AMPA receptor

trafficking (Essmann et al., 2008). Thus the notion that interaction between PAK3 and Nck adaptors may play a role in synaptic signaling is particularly attractive.

Here, we report the analysis of the interaction of PAK3 with the Nck adaptors. In contrast to PAK1 forming a complex with Nck1, we found that PAK3 interacts preferentially with Nck2. Using two distinct methods of quantification, we show that Nck2 is significantly more abundant in brain than Nck1 defining a potentially strong neuronal PAK3/Nck2 complex. In order to study the physiological effects of the disruption of the PAK3/Nck2 interaction, we identified a non-interacting PAK3 mutant. Expression of this mutant in hippocampal neurons did not modify spine morphology, but modulated synaptic transmission. Perfusion of a competing peptide which inhibits interaction in cortical slice pyramidal neurons strongly modified AMPA receptor-dependent synaptic transmission. Our results uncovered new aspects of PAK3 function in neuronal signaling through a specific complex with the Nck2 adaptor.

Materials and Methods

Plasmid constructs. The following plasmids were previously described (Rousseau et al., 2003): the pHA-PAK3-wt plasmid encodes the mouse HA-tagged wild type PAK3 protein, the pHA-PAK3-ca plasmid encodes the T421E mutant which displays constitutive high kinase activity and the pHA-PAK3-kd plasmid encodes the K297L kinase-defective mutant. New mutants and constructs were prepared from pHA-PAK3 plasmid with *Pfu* polymerase (Promega) using procedures based upon the QuickChange protocol (Stratagene) and confirmed by sequencing. The mutant of the PAK3 first proline-rich domain (P12A) was created using the oligonucleotide set (5’-GCTTGGATAACGAAGAAAAACCCGCGGC TCCCCCACTGAGGATGAAC-3’ and 5’-GTTCATCCTCAGTGGGGG AGCCGCGGG TTTTTCTTCGTTATCCAAGC-3’). The mutant of the PAK3 serine 20 (S20E) was created using the oligonucleotide set (5’-GCTCCCCCACTGAGGATGAACGAGAACAA CCGAGACTCTTCAGC-3’ and 5’- GCTGAAGAG TCTCGGTTGTTCTCGTTCATCCTC AGTGGGGGAGC-3’).

All the Flag-tagged PAK3 constructs (wt, kd and P12A) were obtained by *KpnI/XbaI* digestion of the corresponding pHA-PAK3 plasmids and the inserts were ligated into the p3X-Flag-CMV-24 vector (Sigma-Aldrich). The *BamHI/XbaI* fragments of the different HA-tagged PAK3 constructs described above were subcloned into the *BamHI/XbaI* linear pEGFP vector (Clontech), in order to obtain Green fluorescent protein (GFP)-tagged PAK3 plasmids named pGFP-PAK3-wt and pGFP-PAK3-P12A.

The sequence coding for peptide covering PAK3 amino-acids 2-49 fused to the glutathione S-transferase (GST) moiety were amplified with the oligonucleotide set (5’-CAGGATCCTCTGACAGCTTGGAT AACG-3’ and 5’-GCCTCGAGTCAGCGAAGCCTGGCTTTCTTATTCTTCTC-3’), and the PCR products were *BamH*I/*Xho*I subcloned into pGEX-6P (GE Healthcare), leading to the pGST-PAK3-(2-49) constructs (wt and S20E). pGST-PAK3-S4G and pGST-PAK3-S4G/S20E constructs were prepared from pGST-PAK3-(2-49)-wt and pGST-PAK3-(2-49)-S20E plasmids respectively with *Pfu* polymerase (Promega) using procedures based upon the QuickChange protocol (Stratagene), using the oligonucleotide set (5'-CAGGGGCCCCTGGGATCCTCT GACGGCTTGGATAACGAAGAAAAACCCCCAG-3' and 5'-CTGGGGGTTTTTCTTCG TTATCCAAGCCGTCAGAGGATCCCAGGGGCCCCTG-3') and confirmed by sequencing.

The pGST-Nck2-$(SH3)_2$ plasmid was obtained by amplification of the second SH3 domain of human Nck2 with the oligonucleotide set (5'-CGCGGATCCGCCGACCGCATCTACGACC-3' and 5'-CCGGAATT CAGTCCACCTCCTCCAA GACG-3'), and *BamHI/EcoRI* cloning into the pGEX-6P3 vector. The pRK5-HA-Nck1 and the pRK5-HA-Nck2 plasmids were a gift from W. Li (University of Southern California, Los Angeles, California, USA).

Plasmids expressing GFP-fused GTPases (Cdc42-V12 and Cdc42-N17) were a gift from P. Fort (CNRS, CRBM, Montpellier, France) and the DsRed2-PSD plasmid was kindly given by D. Muller (APSIC, University of Geneva, Switzerland)

Antibodies. Immunoblot analyses were performed using anti-HA (12CA5 from Roche Diagnostics), anti-Flag (F7425 from Sigma-Aldrich), anti-GST (27-4590D from GE Healthcare), anti-β-actin (SC1615 from Santa Cruz), anti-Nck1 and anti-Nck2 (07-099 and 07-100 respectively from Upstate/Millipore). The specificity of the anti-Nck was tested (Supplementary Fig. 1*A*). A PAK3 specific rabbit polyclonal antiserum was raised against the synthetic peptide CASPAAPNKEDIPPSAENA conjugated to keyhole limpet hemocyanin (Neosystem). This peptide corresponds to a mouse PAK3 internal sequence (211-229) which does not display any identity with other PAKs sequences. Antibodies were affinity-purified by Ultralink column chromatography (Perbio Science) after covalent attachment of the corresponding peptide, following the manufacturer's instructions. This antibody is specific of PAK3 and cannot detect or immunoprecipitate other members of the PAK family (Supplementary Fig. 1*B*). Rabbit TrueBlot secondary antibody, which do not recognize denatured IgG, were purchased from eBioscience.

COS-7 cell culture and transfection. COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). Plasmid DNA (10 µg) was transfected into 3.10^6 COS-7 cells using the electroporation method with an electroporator (Biorad) as described in Rousseau et al. (2003).

Pull down assay and coimmunoprecipitation. The GST-fused proteins were expressed in *E. Coli BL21* and purified on glutathione-agarose beads as described by the manufacturer (GE Healthcare). Pull down assays were performed as previously described (Rousseau et al., 2003). Briefly, COS-7 cells were transfected with constructs expressing HA-PAK3 (wt, kd, ca, P12A, S20E) with or without GFP-Cdc42 (V12 or N17). Forty hours later, cells were washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1 mM orthovanadate and lyzed in 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 15 mM NaF, 2 mM EDTA and protease inhibitor mixture. After 15 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 20,000g for 15 min. Cleared cell extracts were incubated with 10 µg of GST or GST-Nck2-$(SH3)_2$ recombinant proteins, immobilized on glutathione beads, for 2 h at 4°C. The beads were washed with the lysis buffer and affinity precipitated proteins were analyzed by Western blotting using the appropriate antibodies. For coimmunoprecipitation, cell lysates in modified Robert's lysis buffer (0.1% Triton X100, 10% glycerol, 20 mM Tris, pH 8.0, 137 mM NaCl, 50 mM NaF supplemented with protease and phosphatase inhibitors mixture) were immunoprecipitated overnight at 4°C, with anti-HA agarose-conjugate (Sigma-Aldrich). Immune complexes were separated by electrophoresis and transferred to PVDF membranes, before Western blotting analysis, with appropriate antibodies to detect. Expression of transfected proteins was checked in each experiment by Western-blotting of Total Cell Lysate (TCL) sample. For brain coimmunoprecipitation, 13 days embryonic mouse brains were dissected and, as described above, were washed in ice cold PBS, homogenized in lysis buffer and incubated for 15 min on ice. Lysate was cleared by centrifugation at 20,000g for 15 min.

After clarification with protein-G-agarose (Sigma-Aldrich) for 2 hours at 4°C, 10 µl of anti-PAK3 antibody or pre-immune serum and 50 µl of protein G-agarose were added for overnight incubation at 4°C. Immune complexes were analyzed by Western blotting, with appropriate antibodies.

Immunoblotting. For Western blot analysis, protein samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Immunodetection was performed using the SuperSignal chemiluminescent reagent (Pierce Science). Quantification was performed after acquisition with a CCD camera (SynGene) and quantification software (GeneSnap and GeneTools, SynGene). Statistical analyses were performed using the Student's t test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). All data shown are representative of a typical experiment from three independent experiments or more.

RT-Quantitative real-time PCR. cDNAs were synthesized using the M-MLV reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega) from 2 µg of total RNA. Quantitative PCR was performed with a Lightcycler (Roche Diagnostics) using the FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I detection protocol as described in Grima et al (2002). The reaction mixture was subjected to real-time PCR cycling by hot start followed by multiple cycles of denaturing at 95°C for 5 s, annealing at 60°C for 5 s and extension at 72°C for 8 s. Mouse -Actin, Nck1, Nck2 and PAK3 primers sets utilized for real-time quantification were obtained from Qiagen (QuantiTect Primer Assay) and used following the manufacturer's instructions. The analysis of fluorescence was carried out using LC software version 3.01 (Roche Diagnostics).

Kinase assay. For Cdc42-dependent activation, cells were transfected with 10 µg of HA-PAK3-wt plasmid. To activate the kinase, cleared cell extracts were incubated with increasing amounts of recombinant Cdc42-V12 in the presence of 25 µM ATP during 30 min at room temperature. Extracts were then immunoprecipitated by incubating them with 4 µl of 12CA5 anti-HA antibody and 50 µl of protein G-agarose (Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. After washing the immunocomplexes, aliquots were subjected to immunoblotting to ensure that PAK proteins were correctly expressed and immunoprecipitated. For PAK3-N-ter phosphorylation by CaMKII, 10 µg of N-ter portion of PAK3 mutants fused to GST were incubated with 50 U of recombinant αCaMKII(1-325) (New England Biolabs) for 45 min at 30°C, in the presence of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 1.2 mM calmodulin, 2 mM $CaCl_2$, 5 µCi/tube of γ^{32}P-ATP (4500 Ci/mmol, ICN), 10 µM ATP.

Tryptic digestion and phosphopeptides mapping. After autophosphorylation or CaMKII kinase assays, full-length protein and the N-ter portion of PAK3 were separated on 10% and 15% acrylamide gels respectively. Gels were dried between two cellophane sheets and radioactive bands corresponding to PAK3 were detected by autoradiography. Each band was excised and washed 3 times in 45% methanol/10% acetic acid and 3 times in 50% methanol. Bands were then resuspended in 25 mM ammonium bicarbonate pH 7.5, containing 25 units of trypsin (Promega) for 14h at 37°C. Two dimensional phosphopeptide migrations of tryptic peptides were performed as previously described (Konig et al., 2001). Briefly, the lyophilized samples were resuspended in 10% acetic acid (5000-10000 cpm/µl), spotted onto 100 µm cellulose coated plates (Kodak Chromagram Sheet, Kodak) in 1 µl aliquots, and electrophoresed for 3h at 400V in a horizontal electrophoresis unit in pH 3.5 electrophoresis buffer (acetic acid 10% and pyridine 1%). Plates were air-dried and chromatographed in buffer containing 30% pyridine, 20% butanol and 6% glacial acetic acid until the mobile

phase rich the top of the plate. ^{32}P-labeled tryptic peptides were detected by autoradiography on Kodak Biomax film for up to 3 days.

Dissociated hippocampal neurons culture and dendritic protrusions imaging. Primary cultures of dissociated hippocampal neurons were prepared from embryonic day 17 (E17) mice. Briefly, 300-400 cells/mm² were plated on 18 mm coverslips previously coated with 0.5 mg/ml poly-L-ornithine and grown in B27-supplemented Neurobasal medium (Invitrogen). Cultures were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) at 16 or 18 days *in vitro* (DIV16 or DIV18) with GFP-constructs with or without pDsRed2-PSD95 (De Roo et al., 2008). Two days later, neurons were fixed and imaged with a Zeiss LSM 510 confocal microscope using the 488 nm band of an argon laser and the 561 nm band of a diode-pumped solid-state laser for excitation of GFP or DsRed2, respectively. Healthy and well-differentiated transfected neurons were selected and cells with a high expression of the transgene were excluded. Images were acquired using a 63x objective (1.4 numerical aperture), using a frame size of 1024x1024 pixels. For morphometric analysis of spines, we used an optic zoom which generated a 50x50 µm cropped image. Because spine density could be variable close or far from the soma, dendritic segments were acquired at a distance restricted between 50 to 150 µm of the soma. Furthermore, we took z series stacks of 1.8 – 3 µm (typically 5 – 8 frames) from the bottom to the top of dendrites and used Image J software (NIH) to generate image projections. All images were acquired and analyzed blind to experimental condition. A minimum of 8 independent cells were analyzed for each construct, corresponding to more than 1500 µm of dendrites and 1400 protrusions measured. The parameters analyzed were protrusion density and length, measured from the limit of the dendrite to the tip of the protrusion using SimplePCI image analysis software (Hamamatsu Inc.). The classification of dendritic protrusions, i.e. filopodia versus spine, was verified at the same time, using the 3D image stack. Statistical comparisons of spine length and density were done using the Student's t test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). All data are expressed as mean ± SEM.

Electrophysiology recording. As described in Seeburg et al. (2008), electrophysiological recordings of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in mouse hippocampal cultures were performed in a recording chamber mounted on the X-Y translation stage of an upright microscope (Zeiss Axioscop 2 FS+) and perfused (~ 2ml/min) at room temperature (~25°C) with the following bath solution (in mM) : 119 NaCl, 2.5 KCl, 2.8 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 1 NaH_2PO_4, 11 Glucose, 0.01 bicucullin, gassed with 5% CO_2/95% O_2 at pH 7.4, TTX (1 µM) was added to block action potentials. Cells were visualized using video-enhanced differential interference contrast optics and 40X long-working distance water-immersion lens. Stable whole-cell voltage clamp recordings were performed using a Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments) after 5 min of patch stabilization and during roughly 5 min in order to obtain at least 100 events per cell. Patch pipettes (3-5 MΩ) were filled with an internal solution containing (in mM) : 115 cesium methansulfonate, 20 CsCl, 10 HEPES, 2.5 $MgCl_2$, 4 ATP disodium salt, 0.4 GTP trisodium salt, 10 sodium phosphocreatine, and 0.6 EGTA, at pH 7.25. Data were filtered at 2 KHz by a low-pass Bessel filter and sampled at 4 KHz using a Digidata 1322A acquisition board (Axon Instruments). Analysis and quantifications were performed off-line with the specialized Elphy™ software (Gérard Sadoc, Biologic UNIC–CNRS, France), blind to experimental conditions. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Peptides perfusion, and patch clamps analysis in cortical slices. In accordance with the guidelines of the American Neuroscience Association, 18 to 23-day-old Wistar rats were decapitated and their brain quickly removed. A hemisection of the left hemisphere was removed, attached to the stage of a Vibratome tissue slicer (Campden Instrument) and immersed in ice-cold artificial cerebrospinal extracellular solution containing (in mM): 126 NaCl, 26 $NaHCO_3$, 10 Glucose, 2 $CaCl_2$, 1.5 KCl, 1.5 $MgSO_4$ and 1.25 KH_2PO_4 (pH 7.5, 310-330 mOsm). 250 µm parasagittal slices containing primary visual cortex were cut and transferred to a holding chamber filled with the extracellular solution, continuously bubbled with 95% O_2/5% CO_2 and maintained at 36°C. Electrical stimulations (1-10 A, 0.2 ms, every minute) were applied in the layer 2/3 using 1 MΩ impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT, WPI, Hertfordshire, England) and whole-cell voltage clamp recordings of the evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) were obtained in layer 5 pyramidal neurons 10 min after patch stabilization, in the same conditions as described above. Stimulation intensity was set to obtain subliminar eEPSCs and cells were held at -80 mV. This value is the reversal potential for inhibition in our experimental conditions (Le Roux et al., 2006), in such a way that we record only excitatory responses. Furthermore, this was checked by CNQX perfusion, the specific inhibitor of AMPA-Kaïnate excitatory receptors (Le Roux et al., 2008). Patch pipettes contained 100 µM of either the wt inhibitory peptide (EEKP**P**APPLRMNSNN) or the P12A mutant peptide (EEKP**A**APPLRMNSNN), diluted in the following internal solution (in mM): 140 K-gluconate, 10 HEPES, 4 ATP, 2 $MgCl_2$, 0.4 GTP and 0.5 EGTA (pH 7.3 adjusted with KOH, 270-290 mOsm). The synthetic peptides used in the present study were purchased from Genecust at >90% purity and dialyzed against patch pipette solution. In order to monitor response stability during the experiments, a control recording was systematically performed at the same time in a surrounding layer 5 pyramidal neuron using a patch pipette that did not contain the inhibitory peptide. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Results

The PAK3/Nck2 interaction is predominant in brain

Over the last few years, Nck1 properties to interact with PAKs have been well studied and characterized (Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996; Zhao et al., 2000; Zhou et al., 2003; Fryer et al., 2006). However, the interaction of PAK proteins with Nck2, the second member of the family, was poorly documented, despite numerous recent data describing specific neuronal functions for Nck2 (Segura et al., 2007; Xu & Henkemeyer, 2009). Here, we quantified the capacity of the two adaptors to interact with PAK3.

In a first step, we analysed the interaction in COS-7 cells cotransfected with either HA-Nck1 or HA-Nck2 expressing vectors together with PAK3. We found that PAK3 is coimmunoprecipitated four times more with Nck2 than Nck1 (Fig. 1*A,B*), showing that Nck2 is likely to be the preferential partner of PAK3. Since PAK3 is highly expressed in brain, we analyzed the expression of the two Nck adaptors in different tissues including the brain. We compared the expression at the RNA level using the quantitative RT-PCR approach with specific primers for each adaptor (Fig. 1*C*). Interestingly, we found that Nck2 transcripts are more abundant that Nck1 transcripts in brain. Thus, we analyzed the protein amount of each adaptor in mouse brain using antibodies strictly specific for Nck1 or Nck2 proteins and showing the same detection efficiency (Fig. 1*D*, left). The amounts of the two proteins are very different (Fig. 1*D*, right). Indeed, Nck1 expression is very weak in brain,although the

Nck2 protein amount is notably higher. Both of these analyses show that Nck2 is the most abundant Nck protein in brain.

To identify the PAK3/Nck2 complex *in vivo*, we next performed coimmunoprecipitation in mouse embryonic brain (E13) extracts (Fig. 1*E*). We made a highly specific mouse serum directed against PAK3 (see Methods and Supplementary Fig. 1) that was used to immunoprecipitate mouse brain PAK3 proteins (Fig. 1*E*, upper panel). It was extremely difficult to identify coimmunoprecipitation of Nck protein since these proteins of 47 kDa comigrate with immunoglobulin heavy chains (Chen et al., 1998). Nevertheless, we clearly observed a band of 47 kDa, specifically detected by Nck2 antibodies, and which was not coimmunoprecipitated with the preimmune serum. Nck1 western blot did not show any Nck1 coimmunoprecipitation in brain extract (data not shown). Altogether, these results suggest that PAK3/Nck2 complex is the major complex present in brain.

The PAK3/Nck2 interaction is not dependent on PAK3 kinase activity

Several data report that PAK1 binding to Nck1 is dependent on its kinase activity (Zhao et al., 2000; Zhou et al., 2003). To analyze whether the PAK3/Nck2 interaction is regulated in a similar way, COS-7 cells were cotransfected with the Flag-tagged PAK3 wild-type protein or the kinase dead (kd) mutant (PAK3-K297L), together with HA-Nck2. To activate PAK3-wild-type in the cells, we cotransfected the constitutively active Cdc42-V12 GTPase or as negative control the inactive Cdc42-N17 mutant. Expression level of GTPases was controlled by western blot on cell lysates (data not shown). Surprisingly, we found that the Cdc42-V12-activated PAK3 protein coimmunoprecipitated with Nck2 (Fig. 2*A*). The presence of a kinase dead mutation did not modify this interaction. Furthermore, the coexpression of a dominant negative N17 form of the Cdc42 did not increase coimmunoprecipitation of PAK3 with Nck2. To confirm this result, we also analyzed the affinity-precipitation of different PAK3 mutants with the GST-immobilized second SH3 domain of Nck2 which is necessary and sufficient to interact with the PAK kinases (Fig. 2*B*) (Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996). COS-7 cells were transfected with HA-tagged wild-type (wt), kinase-dead (kd) and T421E constitutively active (ca) PAK3 constructs. All the PAK3 constructs were equally affinity-precipitated by SH3 domains of Nck2, as revealed by HA-immunoblotting. We also observed that *in vivo* activation of PAK3 protein by coexpressing Cdc42-V12 did not modify Nck2 interactions in a pull-down assay (data not shown). Altogether our results clearly indicate that PAK3 interacts with the Nck2 adaptor independently of its kinase activity.

The activation-dependent autophosphorylation of PAK1 serine 21 has previously been shown to be responsible for suppression of the PAK1/Nck1 interaction (Zhao et al., 2000). Interestingly, the sequence surrounding this serine inside the well conserved PPxPPxRxxS consensus sequence for SH3 domain binding (Zhao et al., 2000) is PAK isoform specific (Fig. 2*C*). Furthermore, the PAK3 amino-acid sequence of the proline-rich domain is conserved among all vertebrate for PAK3 proteins (Supplementary Fig. 2). Thus we investigated whether the homologous PAK3 serine 20 residue may be an autophosphorylation site to regulate this interaction. Bidimensional mapping of the autophosphorylated full-length PAK3 protein (Fig. 2*D*), expressed in COS-7 cells and activated by recombinant Cdc42-V12 protein indicated multiple autophosphorylated sites in PAK3. The bidimensional analysis obtained in a similar experiment performed with the full length PAK3-S20E mutant gave the same map suggesting that this serine is not autophosphorylated (data not shown). Using the fact that serine 20 is in a good RXXS consensus sequence for CaMKII, we compared the two maps from wild type and S20E recombinant N-ter peptides phosphorylated, *in vitro*, by CaMKII. These data clearly indicate that the $MNS_{20}NNR$ tryptic peptide is not phosphorylated upon

autophosphorylation (Fig. 2*E*, arrow). This was confirmed by the comigration of peptides from this sample with those obtained from the autophosphorylated wild-type PAK3 (data not shown). Altogether, we concluded that the serine 20 residue is not autophosphorylated upon PAK3 activation (Fig. 2*E*,*F*). We performed similar approaches to demonstrate that the serine 20 residue of PAK3 is not phosphorylated by some previously reported regulatory kinases such as Akt, PKA, CamKII, and suggesting that these kinases do not regulate the PAK3/Nck2 interaction (Supplementary Fig. 2).

P12A mutation in PAK3 protein suppresses binding to Nck2

Mutations of the second proline residue in the first PRD of the different PAK proteins (Fig. 3*A*) were described to suppress PAK functions (Hing et al., 1999; Zhou et al., 2003; Fryer at al., 2006). In PAK1, mutation of the second proline of this PRD ($P\underline{\mathbf{P}}_{13}APPMR_{18}NTS_{21}$) abolished PAK1/Nck1 interaction (Galisteo et al., 1996). Therefore, in order to investigate the role of the PAK3/Nck2 interaction we firstly analyzed the effect of the mutation of the homologous proline 12 (P12A) in complex formation. We performed affinity-precipitation using the second SH3 domain of Nck2 fused to GST (Fig. 3*A*). PAK3-P12A full-length proteins expressed in COS-7 cells did not precipitate with GST-Nck2 baits although the wild-type PAK3 protein did. To confirm this result, we analyzed the *in vivo* Nck2-association of PAK3 and two mutated proteins bearing either the P12A mutation or deleted of the first twenty N-ter amino-acids (PAK3-ΔNter). Coimmunoprecipitation assays were performed in transfected COS-7 cells expressing PAK3 and Nck2 proteins. The HA-tagged Nck2 proteins precipitated the Flag-tagged PAK3 (Fig 3*B*). However, introducing the P12A mutation or the small N-ter deletion dramatically decreased (-86.4% ± 9.3% for P12A mutant and -89.2% ± 4.4% for ΔNter mutant) the interaction of PAK3 with this adaptor (Fig. 3*B*,*C*). Since the Nck adaptors are the only described partners of the PAK first PRD, the P12A mutant of PAK3 is a selective tool to study PAK3/Nck implication in biological processes.

PAK3 expression induced a decreased of mEPSC amplitude through Nck2 interaction

Previous reports suggest that PAK3 may regulate AMPA currents (Boda et al., 2004). We further investigated the functional role of the PAK3/Nck2 interaction in the mammalian brain by analysing miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSCs) which are dependent on AMPA receptors. DIV18 hippocampal neurons were transiently transfected with either GFP-PAK3-wt or GFP-PAK3-P12A plasmids. Three days after transfection, stable whole-cell patch clamp recordings were performed on fluorescent neurons. We used electrophysiological conditions that only allow AMPA receptor-dependent events to be recorded (Le Roux et al., 2006). During each set of experiments, control recordings were performed on non-fluorescent untransfected neurons surrounding the fluorescent cells previously patched. Surprisingly, we found that the expression of the wild-type PAK3 proteins produced a decreased amplitude (-17% ± 0.17%, $p<0.001$, n=15) of the averaged mEPSCs compared to untransfected neurons (Fig. 5*A*-*D*), suggesting that PAK3 overexpression down-regulates AMPA currents. In contrast, the expression of the PAK3-P12A protein in the same conditions did not modify the average amplitude of mEPSCs, indicating that the down-regulation of AMPA currents by overexpressed PAK3 protein is dependent of its interaction with Nck2 (Fig. 5*E*-*H*). In both PAK3-wt and -P12A conditions, no significant change of the mEPSCs frequency was observed suggesting that PAK3 did not modify presynaptic functions (Fig. 5*D*,*H*). These results suggested that PAK3 acts on synaptic transmission through its interaction with Nck2.

PAK3/Nck2 does not modify dendritic spine architecture

In order to determine whether the PAK3/Nck2 modulation observed on synaptic transmission is dependent on dendritic spine morphology alteration, dissociated mouse hippocampal neurons were transfected with GFP-PAK3-wild type or GFP-PAK3-P12A constructs together with the post-synaptic density marker DsRed2-PSD95. The resulting spine morphology was analyzed two days later by confocal microscopy (Fig. 4*A*,*B*). Transfected neurons were healthy and well-differentiated, as previously shown for other expressed PAK3 mutants (Kreis et al., 2007). The P12A mutation did not alter PAK3 protein localization in dendrites and protrusions. PAK3-wt and PAK3-P12A transfected neurons display spines that possess the characteristics of mature synapses with a typical neck and head, and displayed numerous and large post-synaptic densities (Fig. 4*A*,*B*). We did not find any difference between neurons expressing either PAK3-wt or -P12A proteins, in regard to dendrite branching, dendritic spine density and spine morphology. These data suggest that expression of PAK3-P12A in hippocampal neurons does not alter spine maintenance. Recent data suggests that PSD-95 overexpression increases spine formation (Nikonenko et al., 2008). Thus we performed quantitative analyses on hippocampal neurons transfected only with either GFP-PAK3-wt or -P12A constructs. Protrusions were classified into two categories: filopodia defined as long protrusions without head or widening, and spines defined as protrusions with a mushroom-like head or enlargement at the tip (Fig. 4*C*). Statistical analyses revealed that the average length of protrusions was not modified in P12A-mutant expressing neurons when compared to PAK3-wt transfected neurons (Fig. 4*D*). Moreover, no significant difference of the protrusion density was observed between the two constructs (Fig. 4*E*). These results suggested that the PAK3 modulation of synaptic transmision does not due to spine morphology modification.

PAK3/NcK2 interaction modulates eEPSC amplitude in acute cortical slices

Because increasing PAK3 may modify gene expression, the previous outcome on mEPSCs may be indirect (Meng et al., 2005). To investigate the direct effect of the PAK3/Nck2 interaction on synaptic transmission, a 15 amino-acid inhibitory peptide EEKP**P**APPLRMNSNN corresponding to the interacting part of PAK3 necessary and sufficient to bind Nck2 adaptor (Fig. 2*C*), was designed in order to inject patched neurons (Fig. 6*A*). This peptide was homologous to the PAK1 peptide previously reported to inhibit PAK1/Nck1 interaction and to inhibit cell migration, cell spreading and to suppress angiogenesis (Zhao et al., 2000; Kiosses et al., 2002; Zhou et al., 2003; Fryer et al., 2006). We performed this analysis in cortical pyramidal neurons since it was previously reported that inhibition of PAK3 by the autoinhibitory domain is greater in this part of brain compared to the hippocampus, probably due to the lower expression of PAK in visual cortex than in others (Hayashi et al., 2004). The peptide was injected through the patch-clamp pipette into a layer 5 pyramidal neuron of visual cortex slice from 3 weeks-old rat (Fig 6*A*) as described by Lledo et al. (1998). Time course of peptide diffusion was checked by comparison with the diffusion of a fluorescent marker Dextran-FITC polymer of 3000 Da, injected in similar conditions in the recorded neuron (data not shown). Patch stability and access resistance over the whole time of recording was monitored using a 250 pA hyperpolarizing step before the onset of electrical stimulation. Evoked post-synaptic AMPA-receptor-mediated currents were recorded at -80 mV every minute for more than one hour in response to layer 2/3 electrical stimulation (see method). A non-perfused control neuron was recorded on the same slice in order to verify the stability of the evoked postsynaptic response as well as the viability and the neuronal network integrity of the organotypic slice (Fig 6*A*). We found that perfusion of the inhibitory peptide induced after a latency of 20-30 minutes a robust and persistent increase of eEPSCs amplitude (+41.8% ± 7.7% between 50 to 70 min, $p<0.001$) (Fig 6*B*, black squares). This AMPA-receptor dependent effect was validated using the AMPA/kainate antagonist CNQX which totally abolished the eEPSC (data not shown). In order to verify the specificity of the

inhibition, we tested the perfusion of a mutated peptide EEKP**A**APPLRMNSNN corresponding to the same peptide of PAK3 with a mutation of the proline 12 in alanine, and which is homologous to PAK1 peptide previously used as negative control (Kiosses et al., 2002). The perfusion of this mutated peptide failed to produce any change in eEPSC amplitude (Fig 6*C*, open dots). This result strongly suggests that the wild type proline-rich peptide specifically modify synaptic transmission through the inhibition of the interaction between PAK3 and Nck2. Altogether, these results strongly suggest that PAK3 regulates AMPA receptor-dependent currents through the Nck2 adaptor.

Discussion

Among the PAK kinases, PAK3 is the only member for which loss of function is responsible for mental retardation, indicating that PAK3 has specific synaptic functions that cannot be compensated by the other PAK proteins. The proline-rich domain of PAK3 which interacts with the Nck adaptors has an amino-acid sequence that is specific to the vertebrate PAK3 isoform. We thus analyzed whether the interaction with Nck may support PAK3 specific functions. Firstly, we report here a stronger *in vivo* interaction of PAK3 with Nck2 than with Nck1, whereas PAK1 interacts similarly with the two adaptors (Braverman & Quilliam, 1999). Interestingly we demonstrated that the regulatory mechanism of this complex is different from that of PAK1, since the key serine residue of the proline-rich domain of PAK3 is not autophosphorylated. We also show that Nck2 is more abundant than Nck1 in brain, in accordance with independent analyses such as the Allen brain atlas and the neuron transcriptome (Lein et al., 2007; Cahoy et al., 2008). Together, these data indicate that PAK3 forms a complex with Nck2 in brain which may support specific PAK3 function.

We thus investigated how this complex participates in PAK3 signaling. Whereas invalidation of the Nck1 or Nck2 gene suggests a large redundancy of both protein functions (Bladt et al., 2003; Fawcett et al., 2007), several recent data demonstrate specific roles for each adaptor (Guan et al., 2007). In neurons, the specific recruitment of each Nck adaptors is associated with the bidirectional signaling of Eph/EphrinB. Nck1 recruitment to Ephrin receptor activates JNK and may be involved in WAVE activation (Stein et al., 1999; Pilpel & Segal, 2005) whereas reverse signaling of EphrinB engagement is specifically mediated by Nck2 recruitment on the carboxy-terminal phosphotyrosine of EphrinB (Cowan & Henkemeyer, 2001). In particular, the EphrinB/Nck2 association permits synapse recruitment of the scaffold protein GIT1 to promote synaptogenesis (Segura et al., 2007). An attractive hypothesis is that the different PAK isoforms act at different Eph/Ephrin pathways based on their specific interaction with the two Nck adaptors. Interestingly, whereas the second SH3 domain of Nck2 may interact with several partners, the first PRD of PAK3 protein mainly interacts with Nck2 suggesting that PAK3 may be the key downstream element in the EphrinB/Nck2 signaling pathway in synaptic regulation. By demonstrating a strong link between Nck2 and PAK3, our data suggest that the EphrinB/Nck2/PAK3 signaling pathway may support specific synaptic functions of PAK3.

To specifically analyze the role of the PAK3/Nck2 complex in neuronal signaling, we did experiments based on previously used approaches demonstrating the role of the interaction of Nck1 with PAK1 (Zhao et al., 2000; Kiosses et al., 2002; Zhou et al., 2003; Fryer et al., 2006). The inhibition of the PAK3/Nck2 interaction by a competing peptide rapidly modulates synaptic transmission in less than 30 minutes. This result clearly indicates that the PAK3/Nck2 complex is implicated in a fast signaling response. Therefore, protein synthesis and gene transcription do not appear to be implicated, while phosphorylation, trafficking or

anchoring events seem more likely within this timescale. A first hypothesis is that PAK3 may regulate synaptic transmission through actin regulation. Indeed PAK3 is an effector of the Cdc42 GTPase (Kreis et al., 2008) and may act as an activator of the Lim Kinase/Cofilin pathway controlling the actin cytoskeleton (Edwards et al., 1999). Moreover, several proteins encoded by X-linked mental retardation genes are also involved in actin cytoskeleton regulation and patients with mental retardation display strong spine anomalies, supporting the current hypothesis that spine defects may be responsible for cognitive disability in these patients (Purpura, 1974; Isaac et al., 2007; Humeau et al., 2009). However neurons expressing the wild-type PAK3 protein or the Nck2 non-interacting mutant of PAK3 display the same dendritic spine characteristics, indicating that the PAK3/Nck2 interaction is not implicated in actin remodelling and spine regulation. Although the PAK3 kinase activity was shown to be implicated in synapse formation and synaptic plasticity (Boda et al., 2004), mice invalidated for the PAK3 gene did not display spine defects (Meng et al., 2005). This suggests a complex relationship between spine dynamics, synaptic plasticity, and X-linked mental retardation. The question arises whether PAK3-dependent mental retardation is due to a spine defect leading to abnormal synaptic transmission as a secondary event, or whether a first defect in synaptic transmission could then generate dendritic spine anomalies.

We report here that expression of the wild-type PAK3 protein in hippocampal neurons led to a decrease of mEPSC amplitude. We did not observe any modification in mEPSCs frequency indicating a normal presynaptic spontaneous neurotransmitter release. High frequency stimulation in cortical slices indicated a normal NMDA-R response and treatment by the AMPA/kainate antagonist CNQX indicated a strictly AMPA-R dependent response. These results indicate that PAK3 is involved in the down regulation of AMPA currents. Interestingly, this regulation requires the interaction with Nck2 since expression of the P12A protein in the same conditions does not modify synaptic currents. The perfusion of the competing peptide that inhibits PAK3/Nck2 interaction increases the amplitude of evoked EPSC confirming the role of PAK3 in down regulation of AMPA currents and the Nck2 dependency for this regulation. These results reveal a hitherto unappreciated role of the PAK3/Nck2 complex in synaptic transmission. In PAK3 knock-out mice synaptic responses mediated by AMPA and NMDA receptors are normal (Meng et al., 2005) suggesting a possible compensatory adaptation during development. However, in acute slice hippocampal neurons, expression of a mutated truncated PAK3 protein led to a decrease of AMPA currents (Boda et al., 2004), in accordance with our results. The precise mechanism by which AMPA-R functions are regulated is still unknown and may implicate dimerization, phosphorylation and interaction mechanisms to regulate trafficking and transmission efficiency (Isaac et al., 2007). Recent data also showed that EphrinB2 regulates internalization of synaptic AMPA receptors (Essmann et al., 2008). It may be an interesting hypothesis that this pathway regulates synapse function through the recruitment of the PAK3/Nck2 complex. These results open new questions as to how the PAK3/Nck2 interaction is regulated and how this complex acts on the dynamic of excitatory synaptic transmission in the brain.

References

Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. Nat Genet 20:25-30.

Bagrodia S, Taylor SJ, Creasy CL, Chernoff J, Cerione RA (1995) Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. J Biol Chem 270:22731-22737.

Bladt F, Aippersbach E, Gelkop S, Strasser GA, Nash P, Tafuri A, Gertler FB, Pawson T (2003) The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. Mol Cell Biol 23:4586-4597.

Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. J Neurosci 24:10816-10825.

Boda B, Nikonenko I, Alberi S, Muller D (2006) Central nervous system functions of PAK protein family: from spine morphogenesis to mental retardation. Mol Neurobiol 34:67-80.

Bokoch GM (2003) Biology of the p21-Activated Kinases. Annu Rev Biochem 27:27.

Bokoch GM, Wang Y, Bohl BP, Sells MA, Quilliam LA, Knaus UG (1996) Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). J Biol Chem 271:25746-25749.

Braverman LE, Quilliam LA (1999) Identification of Grb4/Nckbeta, a src homology 2 and 3 domain-containing adapter protein having similar binding and biological properties to Nck. J Biol Chem 274:5542-5549.

Buday L, Wunderlich L, Tamas P (2002) The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. Cell Signal 14:723-731.

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. J Neurosci 28:264-278.

Chen M, She H, Davis EM, Spicer CM, Kim L, Ren R, Le Beau MM, Li W (1998) Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. J Biol Chem 273:25171-25178.

Cowan CA, Henkemeyer M (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. Nature 413:174-179.

De Roo M, Klauser P, Mendez P, Poglia L, Muller D (2008) Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. Cereb Cortex 18:151-161.

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. Nat Cell Biol 1:253-259.

Essmann CL, Martinez E, Geiger JC, Zimmer M, Traut MH, Stein V, Klein R, Acker-Palmer A (2008) Serine phosphorylation of ephrinB2 regulates trafficking of synaptic AMPA receptors. Nat Neurosci 11:1035-1043.

Fawcett JP, Georgiou J, Ruston J, Bladt F, Sherman A, Warner N, Saab BJ, Scott R, Roder JC, Pawson T (2007) Nck adaptor proteins control the organization of neuronal circuits important for walking. Proc Natl Acad Sci U S A 104:20973-20978.

Fryer BH, Wang C, Vedantam S, Zhou GL, Jin S, Fletcher L, Simon MC, Field J (2006) cGMP-dependent protein kinase phosphorylates p21-activated kinase (Pak) 1, inhibiting Pak/Nck binding and stimulating Pak/vasodilator-stimulated phosphoprotein association. J Biol Chem 281:11487-11495.

Galisteo ML, Chernoff J, Su YC, Skolnik EY, Schlessinger J (1996) The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. J Biol Chem 271:20997-21000.

Grima B, Lamouroux A, Chelot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B, Rouyer F (2002) The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. Nature 420:178-182.

Guan S, Chen M, Woodley D, Li W (2007) Nckbeta adapter controls neuritogenesis by maintaining the cellular paxillin level. Mol Cell Biol 27:6001-6011.

Hayashi ML, Choi SY, Rao BS, Jung HY, Lee HK, Zhang D, Chattarji S, Kirkwood A, Tonegawa S (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. Neuron 42:773-787.

Hing H, Xiao J, Harden N, Lim L, Zipursky SL (1999) Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in Drosophila. Cell 97:853-863.

Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N (2009) X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. J Neurochem.

Isaac JT, Ashby M, McBain CJ (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. Neuron 54:859-871.

Kiosses WB, Hood J, Yang S, Gerritsen ME, Cheresh DA, Alderson N, Schwartz MA (2002) A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. Circ Res 90:697-702.

Kreis P, Barnier JV (2009) PAK signalling in neuronal physiology. Cell Signal 21:384-393.

Kreis P, Rousseau V, Thevenot E, Combeau G, Barnier JV (2008) The four mammalian splice variants encoded by the p21-activated kinase 3 gene have different biological properties. J Neurochem 106:1184-1197.

Kreis P, Thevenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier JV (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. J Biol Chem 282:21497-21506.

Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. Eur J Neurosci 24:3507-3518.

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Baux G, Fossier P (2008) Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks. Eur J Neurosci 27:3244-3256.

Lein ES, et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. Nature 445:168-176.

Lledo PM, Zhang X, Sudhof TC, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. Science 279:399-403.

Lu W, Katz S, Gupta R, Mayer BJ (1997) Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. Curr Biol 7:85-94.

Meng J, Meng Y, Hanna A, Janus C, Jia Z (2005) Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. J Neurosci 25:6641-6650.

Nikonenko I, Boda B, Steen S, Knott G, Welker E, Muller D (2008) PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. J Cell Biol 183:1115-1127.

Pilpel Y, Segal M (2005) Rapid WAVE dynamics in dendritic spines of cultured hippocampal neurons is mediated by actin polymerization. J Neurochem 95:1401-1410.

Purpura DP (1974) Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. Science 186:1126-1128.

Rousseau V, Goupille O, Morin N, Barnier JV (2003) A new constitutively active brain PAK3 isoform displays modified specificities toward Rac and Cdc42 GTPases. J Biol Chem 278:3912-3920.

Seeburg DP, Feliu-Mojer M, Gaiottino J, Pak DT, Sheng M (2008) Critical role of CDK5 and Polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity. Neuron 58:571-583.

Segura I, Essmann CL, Weinges S, Acker-Palmer A (2007) Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. Nat Neurosci 10:301-310.

Stein E, Savaskan NE, Ninnemann O, Nitsch R, Zhou R, Skutella T (1999) A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. J Neurosci 19:8885-8893.

van Galen EJ, Ramakers GJ (2005) Rho proteins, mental retardation and the neurobiological basis of intelligence. Prog Brain Res 147:295-317.

Xu NJ, Henkemeyer M (2009) Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. Nat Neurosci.

Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, Horwitz AF (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. J Neurosci 25:3379-3388.

Zhao ZS, Manser E, Lim L (2000) Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. Mol Cell Biol 20:3906-3917.

Zhou GL, Zhuo Y, King CC, Fryer BH, Bokoch GM, Field J (2003) Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. Mol Cell Biol 23:8058-8069.

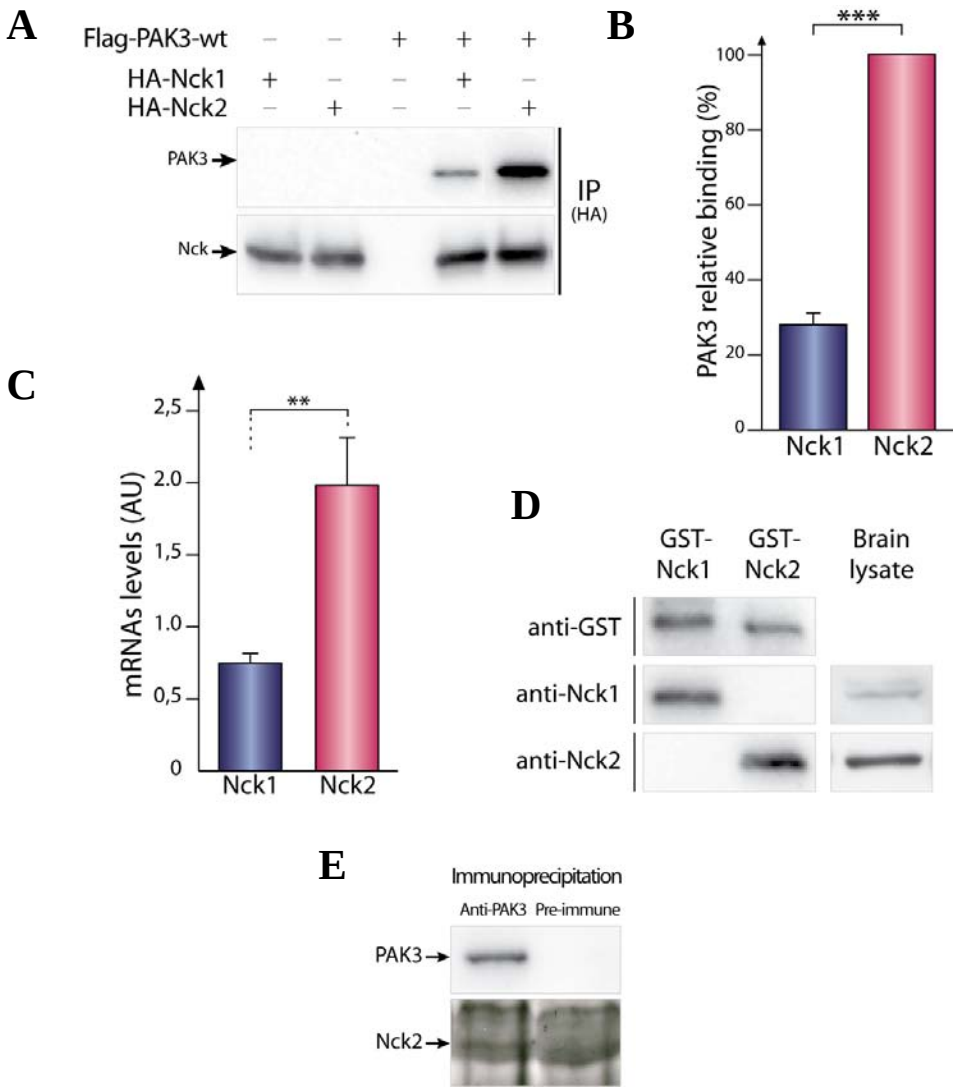


Figure 1. Preferential binding of PAK3 with Nck2 *in vivo*. **A**, Interaction between PAK3 and the Nck adaptors. COS-7 cells were cotransfected with plasmids coding for HA-tagged Nck1 or Nck2 with Flag-PAK3-wt. Nck proteins were HA-immunoprecipitated (IP-HA) and visualized after immunoblotting (middle). The PAK3 coimmunoprecipitation was revealed by anti-Flag blotting (upper). Protein expression levels in total cell lysates were controlled (not shown). **B**, Quantified relative binding of PAK3 to Nck adaptors. **C**, mRNAs quantification of Nck1, Nck2 in brain. Total mRNAs extracts from adult brain were subjected to quantitative RT-PCR. Same hybridation efficiency was obtained for Nck1 and Nck2 primers. **D**, Nck1 and Nck2 protein abundance in brain. The specificity of two antibodies designed against Nck1 and Nck2 was tested using recombinant proteins. The anti-Nck1 antibody only recognized the GST-Nck1-(96-205) protein (left, middle panel) and the anti-Nck2 antibody specifically recognized the GST-Nck2-(101-210) protein (left, lower panel). Simultaneous detection using an anti-GST antibody (left, upper panel) verified that both antibodies detected their specific isoforms with the same efficiency. Proteins levels of Nck1 or Nck2 adaptors were tested in brain in the same experimental conditions with specific Nck1 and Nck2 antibodies. **E**, Nck2 interacts with PAK3 in mouse brain. Compared with pre-immune serum, immunoprecipitation

of PAK3 from mouse brain lysate, allows detecting Nck2 in immunocomplexes. *B*, *C*, Comparison with Student's t test: **, p<0.01; ***, p<0.001, n=4. Error bars indicate the SEM.

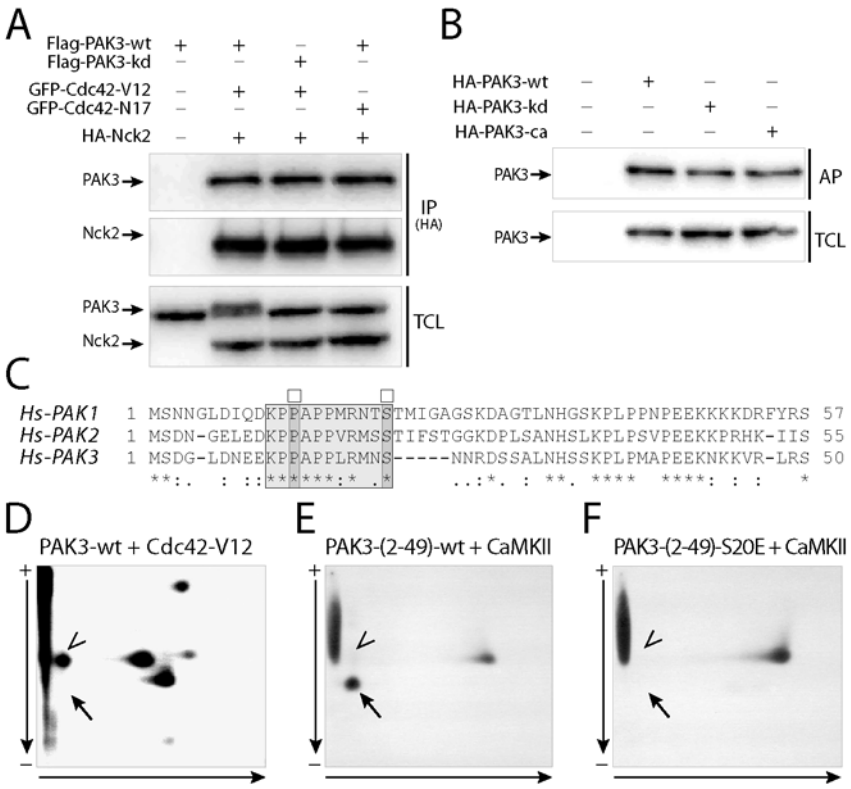


Figure 2. PAK3/Nck2 interaction is not regulated by autophosphorylation. **A**, Interaction between Nck2 and PAK3. COS-7 cells were cotransfected with plasmids coding for Flag-PAK3-wt or Flag-PAK3-kd (kinase dead), with either inactive N17 or active V12 mutants of GFP-Cdc42 vectors, and with HA-tagged Nck2 plasmid. Nck2 proteins were HA-immunoprecipitated (IP-HA) and visualized after HA immunoblotting (middle). PAK3 proteins in immune complexes were revealed by anti-Flag immunoblotting (upper). Protein levels in total cell lysates (TCL) were controlled by anti-Flag and anti-HA immunoblotting (lower) as GTPase expression using anti-GFP antibody (data not shown). Note that coexpression of Cdc42-V12 induced an electrophoretic shift of PAK3-wt protein, indicating its activation (Kreis et al., 2007). **B**, Interaction of various PAK3 mutants with the second SH3 domains of Nck2. Wt, constitutively active T421E (ca) and kd forms of HA-PAK3 proteins expressed in COS-7 cells were incubated with recombinant GST-proteins fused to the second SH3 domain of Nck2. Affinity-purified PAK3 proteins (AP) and proteins in TCL were revealed by immunoblotting with HA antibodies. **C**, Amino-acids alignment of the N-terminal region of human PAK proteins of group I ("*" for identical, ":" for conserved substitutions and "." for semi-conserved substitution). The PRD of PAK proteins (shaded box) is conserved but not totally identical. The two critical residues for Nck interaction (Zhao et al., 2000) are indicated with squares. **D-F**, Bidimensional mapping of full length PAK3 (**D**) or PAK3-(2-49) (**E, F**) tryptic phosphopeptides. Vertical arrows indicate the electrophoretic direction, horizontal arrows the chromatography migration. Inclined black arrows indicate the serine 20-corresponding peptide and the arrows-heads show an undefined phosphorylation

peptide. All data shown are representative of a typical experiment from three independent experiments.

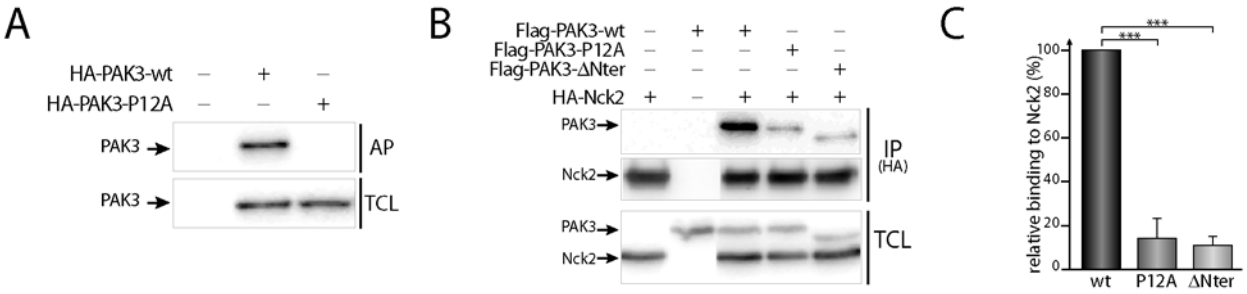


Figure 3. The mutation of the proline 12 of PAK3 abolished the interaction with Nck2. **A**, *In vitro* interaction of various PAK3 mutants with the second SH3 domains of Nck2. -wt, -P12A and -S20E HA-PAK3 proteins were expressed in COS-7 cells and lysates were incubated with recombinant GST proteins fused to the second SH3 domain of Nck2. Affinity-purified PAK3 proteins (AP) and COS-7 expressed PAK3 proteins (TCL) were revealed by western blotting with anti-HA antibodies. **B**, *In vivo* interaction between Nck2 and PAK3 mutants. COS-7 cells were cotransfected with plasmids coding for HA-tagged Nck2 with vectors coding for 3xFlag-PAK3 wild-type (wt), P12A corresponding to the substitution of the proline 12 by an alanine (P12A), and ΔNter which corresponds to the deletion of the first 20 amino-acids of PAK3 encompassing the proline-rich domain implicated in the interaction with the Nck adaptors (ΔNter). Nck2 protein was HA-immunoprecipitated (IP-HA) and revealed after HA immunoblotting (middle panel). The presence of PAK3 protein in the immune complexes was revealed by anti-Flag western blotting (upper panel). Levels of Flag-PAK3 and HA-Nck2 proteins in total cell lysates (TCL) were controlled by anti-Flag and anti-HA immunoblotting (lower panel). **C**, Relative binding of PAK3 proteins to Nck2, quantified from four independent experiments and averaged after acquisition of the chemiluminescence with a charge-coupled device camera. Comparison with Student's t test: ***, $p<0.001$, $n=4$. Errors bars indicate the SEM. Data shown in the figures *A* and *B* are representative of a typical experiment from four independent experiments.

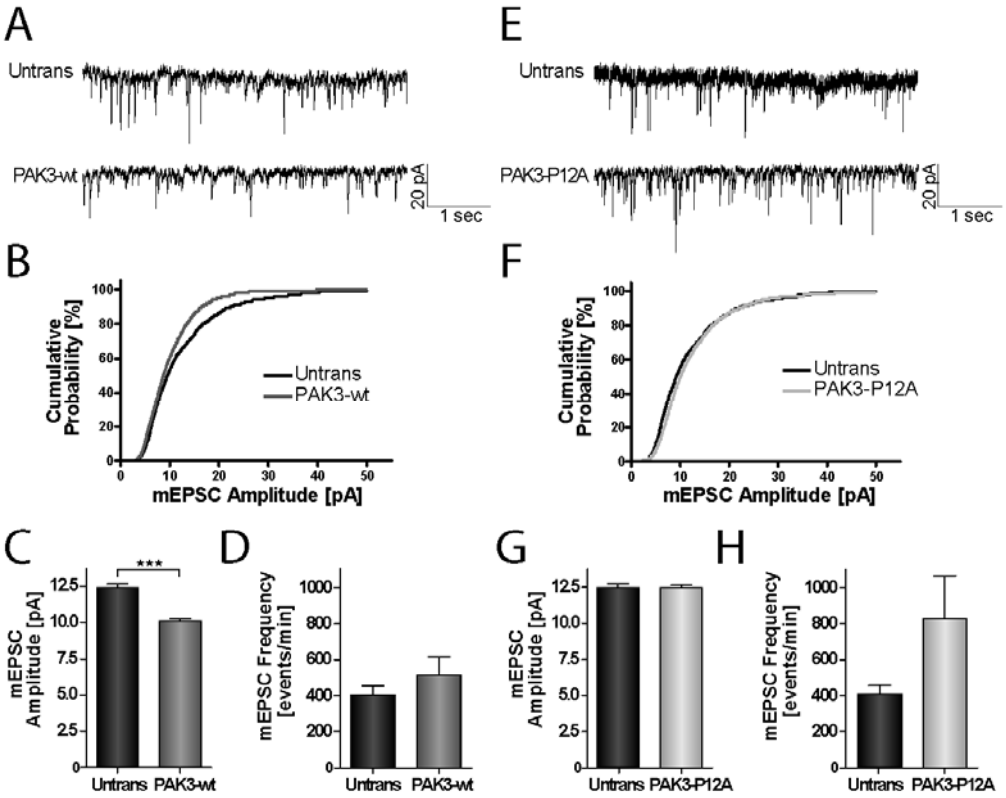


Figure 4. mEPSC amplitudes in hippocampal neurons are differentially modulated by expression of PAK3-wt and P12A non-interacting mutant. **A**, Representative sample traces of 5 s recording of mEPSCs of untransfected or GFP-PAK3-wt transfected neurons. Scale bars: 20 pA and 1 s. **B**, Cumulative distribution plots, assembled from the first 100 events from each cell recorded (n=15 for each condition). **C**, Quantification of mean mEPSC amplitude (mean ± SEM). *D*, Quantification of mean mEPSC frequency (mean ± SEM). Results are not statistically significant. **E-H**, Samples traces, cumulative distribution and quantification of mEPSC amplitude and frequency (mean ± SEM) of untransfected neurons and neurons transfected with PAK3-P12A construct. n = 15 cells per condition, ***, p<0.001, Mann Whitney test.

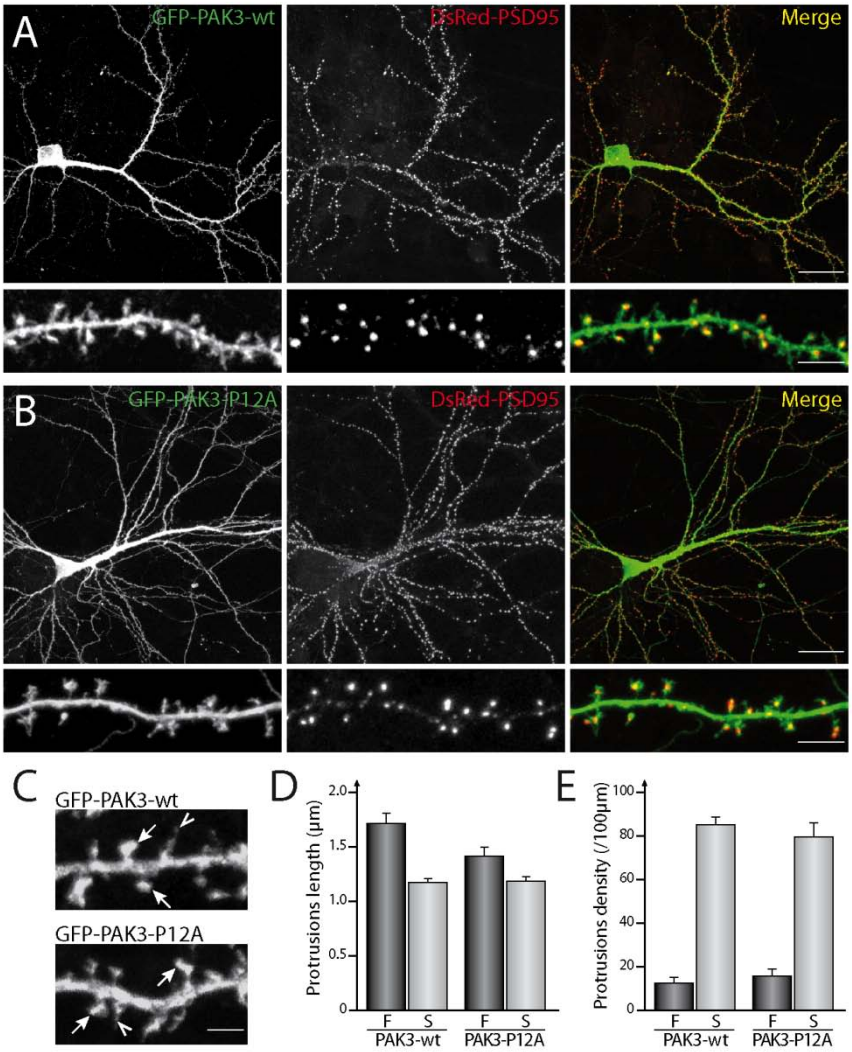


Figure 5. Expression of PAK3-P12A did not modify dendritic spinogenesis. **A,B**, Mouse hippocampal neurons cotransfected with either GFP-PAK3-wt (**A**) or -P12A (**B**), and DsRed2-PSD95 present mature spines at DIV18. Confocal images showed transfected neurons (PAK3 proteins in green and PSD95 in red) with normal dendritic differentiation and accumulation of PSD95 in mature spines. Scale bars represent 30 µm (whole neurons) and 5 µm (enlargements). **C-E**, Single transfection of GFP-PAK3-wt or -P12A constructs in hippocampal neurons allowed classification (**C**) of mature spines (arrows) and filopodia (arrowheads). Scale bar represents 2 µm. Quantitative analysis of protrusions length (**D**) or density (**E**). No significant differences for filopodia (F) or spines (S) between the two expressed constructs. Data are means ± SEM of measurements obtained from 8-15 cells (length of dendrite analyzed: 50-250 µm/cells).

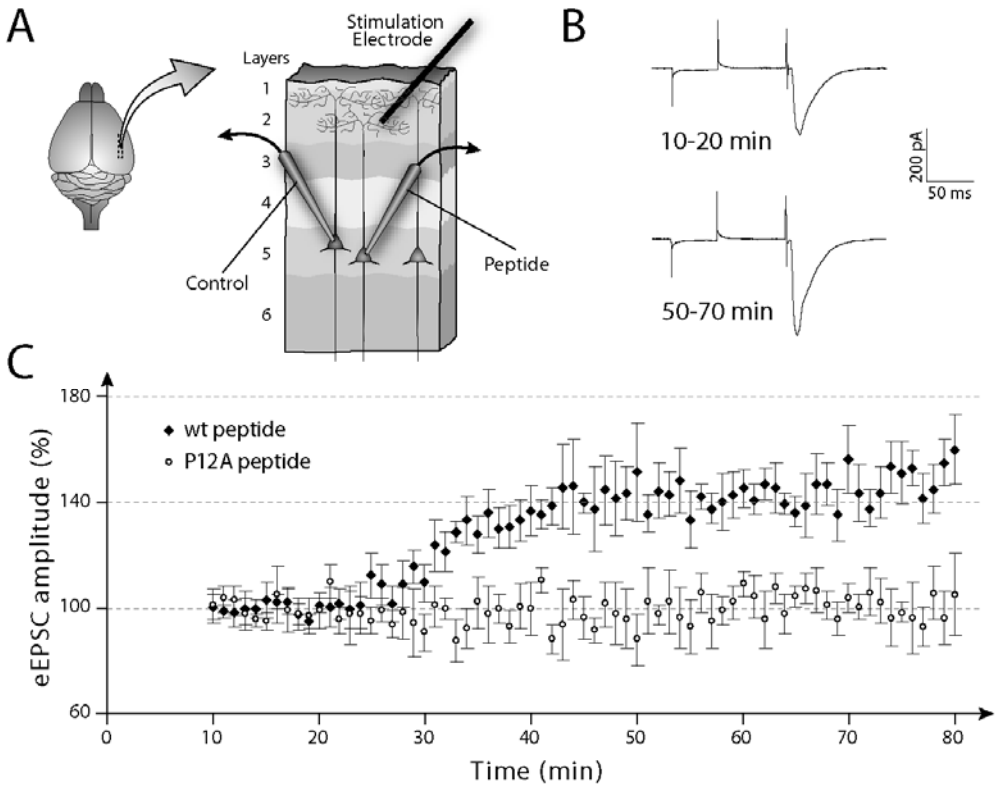


Figure 6. Inhibition of PAK3/Nck2 interaction by perfusion of an inhibitory peptide enhances evoked AMPA receptor-dependent transmission. **A**, Schematic representation of simultaneous patch-clamp recording. Pyramidal neurons from parasagittal slices of rat primary visual cortex were patched on the layer 5 by two pipettes, one of them containing the inhibitory peptide whereas the second consists of control recording. The evoked ESPC recording followed the electrical stimulation in layers 2/3. **B**, Significant representation of eEPSC response at two different phases. Scale bars: 200 pA and 50 ms. **C**, Perfusion of PAK3-wt peptide increases evoked EPSC recorded in neurons of the layer 5 visual cortex. Post-synaptic inhibition of the PAK3/Nck2 interaction by perfusion of the inhibitory peptide induced an increase of more than 40% of evoked ESPC amplitude. Control using a non-interacting peptide (P12A) led to unmodified amplitudes during more than one hour. (n = 3 cells per condition, $p<0.001$; Mann Whitney test)

IV. Rôle de la sous-unité a1 de la v-H^+ATPase dans la libération de neurotransmetteur : hypothèse du pore de fusion protéique

1) Position du problème

La transmission synaptique évoquée par l'activité neuronale requiert une libération rapide et synchrone de neurotransmetteur (NT) dans la fente synaptique. Ce processus est assuré par la fusion de vésicules contenant le NT avec la membrane des terminaisons présynaptiques, suite à une augmentation rapide et transitoire de la concentration cytosolique de Ca^{2+}. Le consensus dégagé par la communauté scientifique (pour revue : Jahn et Scheller, 2006) suggère que l'étape finale de fusion des vésicules présynaptiques (*i.e.* après leur amarrage, ou « docking », à la membrane) dépend uniquement d'un complexe d'interaction entre protéines SNARE vésiculaires (« v-SNARE ») et protéines SNARE membranaires (« t-SNARE »). Une autre hypothèse, suggère que l'étape finale de libération des NT est assurée par la formation d'un pore de fusion protéique, qui serait constitué par la superposition de deux domaines V0 (vésiculaire et membranaire) de la v-ATPase (Morel et al., 2001, Peters et al., 2001 ; Morel, 2003 ; figure 43b). L'implication de la v-ATPase dans la formation du pore de fusion serait alors indépendante de sa fonction, très bien établie, de transport de protons. En effet, l'activité « pompe à protons » de la v-ATPase génère le gradient électrochimique nécessaire au transport (antiport) des NTs dans les vésicules présynaptiques, en amont de l'étape finale de libération (figure 43a).

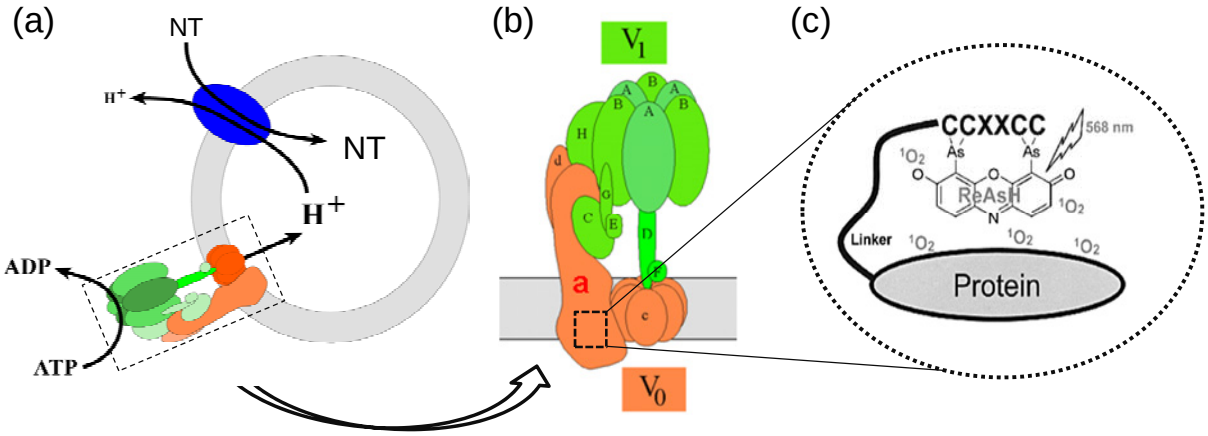


Figure 43. Structure et fonction de la v-H^+ATPase et motif tétra-cystéine

(**a**) Le gradient de protons généré par l'activité de la v-ATPase est essentiel au remplissage des vésicules synaptiques en neurotransmetteur (NT).
(**b**) Structure schématique de la v-ATPase montrant les deux domaines fonctionnelles : le domaine membranaire (orange) qui est enchâssé dans la membrane vésiculaire et le domaine cytoplasmique (vert) qui est orienté vers le cytoplasme des terminaisons présynaptiques. Le domaine V1 est essentiel pour l'activité de transport de protons de la v-ATPase.

(**c**) Description du motif tétracystéine fusionné à la sous-unité a1 par un « linker ». Le composé ReAsH contenant deux atomes d'arsenic se fixe sur le motif tétracystéine. Un flash lumineux induit la production d'espèces réactives de l'oxygène provenant de la transformation photochimique du composé biarsenique. Ces espèces réactives dénaturent localement la protéine d'intérêt.

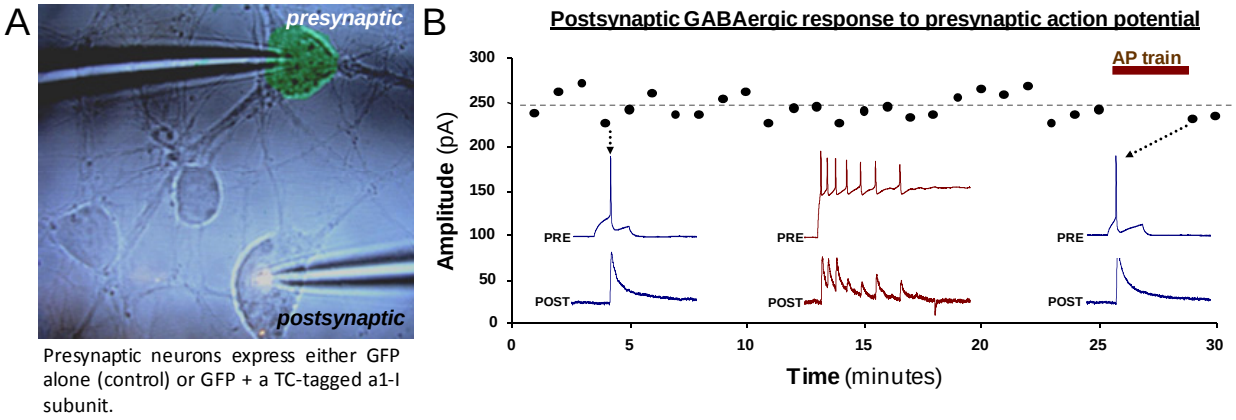
Plus précisément, des évidences récentes ont suggéré que le domaine V0 contenant la sous-unité « a » (figure 43b) est impliqué dans la formation du pore de fusion protéique (Hiesinger et al., 2005 ; Liégeois et al., 2006). C'est pourquoi, après avoir montré que la sous-unité a1-I du domaine V0 est spécifiquement adressée dans les terminaisons synaptiques (Morel et al., 2003 ; Poëa-Guyon et al., 2006), le groupe du Dr Nicolas Morel a développé une approche de photoinactivation de cette sous-unité dans des cultures de neurones hippocampaux ou corticaux. Cette approche à trois avantages fondamentaux : elle permet de s'affranchir des problèmes de compensation fonctionnelle généralement rencontrés dans les modèles d'inactivation génique, elle offre un contrôle interne à l'expérience (avant *vs* après photoinactivation) et surtout, elle permet, grâce à sa résolution temporelle, de différencier un effet « pore de fusion » d'un effet « pompe à protons ». Le blocage de la pompe à protons a un effet lent et progressif, qui apparaît au fur et à mesure que s'épuisent les réserves de NT présynaptiques (Cavelier et Attwell, 2007). Le blocage du « pore de fusion » devrait au contraire être quasi immédiat, dans la mesure où il concerne uniquement les vésicules déjà amarrées à la membrane et prêtes à libérer leur NT.

La sélectivité de la photoinactivation, autrement connue sous le nom de « CALI » (« Chromophore-Associated Light Inactivation), a été validée sur la synaptotagmine chez la drosophile (diminution de la transmission glutamatergique évoquée sans effet sur la libération spontanée, Marek et Davis, 2002). Sa résolution spatiale étant de quelques Å et sa résolution temporelle étant inférieure à la minute, la photoinactivation est parfaitement adaptée à l'étude du rôle d'une seule sous-unité protéique, dans un processus rapide, de libération de neurotransmetteur.

Pour permettre la photoinactivation de la sous-unité a1-I, une étiquette (« tag ») photosensible a été fusionnée à l'extrémité N- ou C-terminal de la sous unité a1-I (figure 43c) ainsi qu'à la sous-unité « A » de V1. Cette dernière construction a pour but de vérifier que le domaine V1 (et donc l'activité de transport de protons) n'est pas impliqué dans la formation du pore de fusion (au contraire, l'hypothèse considère qu'il se désolidarise de V0 pendant l'exocytose).

L'étiquette photosensible, que l'on appellera « tag tétracystéine » (tag-TC), est formée par 2 fois 2 résidus cystéines séparés par 2 acides aminés. La fixation d'un composé chimique bi-arsenique (figure 43c) sur le tag-TC de la protéine recombinante rend ce dernier sensible à la lumière (contrairement au schéma de la figure 43c, nous avons utilisé un composé « FlAsH », dérivé de la fluorescéine et sensible à la lumière bleue). Après perfusion du réactif sur la préparation, un flash lumineux (de 30s à 1min) à la longueur d'onde appropriée permet la transformation photochimique du complexe TC-réactif bi-arsenique, ce qui provoque une production de dérivés réactifs de l'oxygène. Ces derniers vont ensuite dénaturer, localement, la protéine d'intérêt.

Des plasmides bicistroniques codant pour une protéine GFP et la sous-unité a1-I (ou A) taguée avec le motif TC et un motif « Flag » (ce dernier permet de vérifier le bon adressage de la construction dans les terminaisons axonales) ont été produits. Des neurones d'hippocampe ou de cortex de rat en culture ont ensuite été transfectés avec une de ces constructions (l'expression de la GFP permet ici d'identifier des neurones transfectés). A partir de 48 heures de transfection, l'enregistrement électrophysiologique de couples synaptiques a permis de mesurer la transmission synaptique glutamatergique ou GABAergique, avant et après la photoinactivation de la protéine d'intérêt. L'étude de la transmission synaptique GABAergique a été privilégiée étant donné la stabilité et la forte amplitude des réponses postsynaptiques par rapport à des synapses glutamatergiques (Figure 44). Il est important de noter que chaque expérience réalisée a, dans ces conditions, son propre contrôle interne (*i.e.* avant photoinactivation).



Presynaptic neurons express either GFP alone (control) or GFP + a TC-tagged a1-I subunit.

Figure 44. Dual recording of GABAergic currents in neuronal culture

(**A**) Image illustrating the dual recording configuration with the presynaptic neuron expressing GFP in green. Action potentials are induced in the presynaptic cell with the left recording pipette (current clamp mode) and the evoked current responses are recorded in the postsynaptic cell under voltage clamp (bottom right pipette). (**B**) Continuous stimulation of a GFP-transfected presynaptic cell leads to a robust and stable current response in the postsynaptic cell. Postsynaptic cell is clamped at -50 mV ($GABA_A$ current). AP: action potential.

2) Résultats

Dans le cadre de cette étude, j'ai (**i**) réalisé les contrôles électrophysiologiques préliminaires aux expériences de photoinactivation, (**ii**) développé les conditions expérimentales de la photoinactivation et (**iii**) réalisé les premières expériences de photoinactivation.

(**i**) Dans un premier temps, nous avons vérifié que la transfection n'affecte pas la transmission synaptique. Pour cela, des neurones ont été transfectés avec la GFP seule (n = 19) ou avec la sous-unité a1 recombinante fusionnée à la GFP (n = 33). Aucun changement significatif n'a été observé dans ces deux cas, par rapport aux neurones non-transfectés (non figuré). Nous nous sommes également assuré que la GFP n'est pas sensible au flash lumineux (généré avec une lampe à mercure), en illuminant des neurones exprimant fortement la GFP. Aucune modification des potentiels d'action présynaptiques, ni de l'amplitude des réponses postsynaptiques, n'a été observée (n = 13, non figuré). Ces résultats montrent que l'expression de la sous-unité a1 « taggée » ne perturbe pas la libération évoquée de NT.

Afin de s'assurer, sur le plan de leur cinétique, qu'un éventuel effet « pore de fusion » (après photoinactivation de a1-I) ne soit pas confondu avec un effet « pompe à protons », un inhibiteur sélectif des pompes à protons des v-ATPases vésiculaires (la concanamycine) a été perfusé sur les cultures de neurones non-transfectés (n = 17). Cette drogue bloque le remplissage des vésicules et conduit à la déplétion des terminaisons présynaptiques en NT « libérable », lorsqu'elles sont stimulées en continue.
Lorsque le neurone présynaptique est stimulé toute les 30 secondes (*i.e.* la fréquence utilisée lors des expériences de photoinactivation), la concanamycine (2 µM) n'a pas d'effet rapide sur la libération évoquée par les potentiels d'action présynaptique. En effet, l'amplitude des réponses postsynaptiques reste constante, en présence de la drogue, pendant 10 minutes (figure 45a) ou 5 minutes (figure 45c, synapse « pré-déplétée » dans ce cas). Ensuite, l'amplitude des réponses commence à diminuer progressivement, comme attendu (Cavelier et Attwell, 2007). L'augmentation de la fréquence de stimulation présynaptique à 1 Hz puis à 2 Hz entraine une chute irréversible de l'amplitude des réponses postsynaptiques jusqu'à 0 pA, signifiant que les réserves vésiculaires présynaptiques de NT ont été totalement vidées. Au contraire, lorsqu'une stimulation rapide est appliquée avant l'ajout de concanamycine, la diminution de l'amplitude des réponses postsynaptiques est réversible (figure 45c).

L'effet « dépléteur » de la concanamycine peut être observé, avec une stimulation à 2 Hz, après seulement 4 minutes de perfusion, ce qui suggère une action rapide de cet inhibiteur dans notre préparation (figure 45b).

L'ensemble de ces résultats apporte un argument fondamental qui valide l'approche de photostimulation utilisée ci-après. En effet, la dénaturation de la sous-unité a1 de la v-ATPase entrainera une perte de la fonction « pompe à protons » d'une part, et de la formation, pour le moment hypothétique, du pore de fusion V0-V0 d'autre part. Il était donc essentiel de s'assurer qu'un probable effet inhibiteur de la photostimulation ne soit pas lié à une déplétion des réserves présynaptiques. Dans ce sens, les expériences de concanamycine montrent que l'effet dépléteur, consécutif à l'inhibition de la pompe à protons des v-ATPase, n'apparait qu'à partir de 10 minutes de perfusion (avec une stimulation basse fréquence, en sachant que la drogue a une action rapide dans notre préparation). Comme cela a été évoqué précédemment, un blocage du pore de fusion devrait au contraire être quasi immédiat dans la mesure où les vésicules présynaptiques ne pourront plus libérer leur NT.

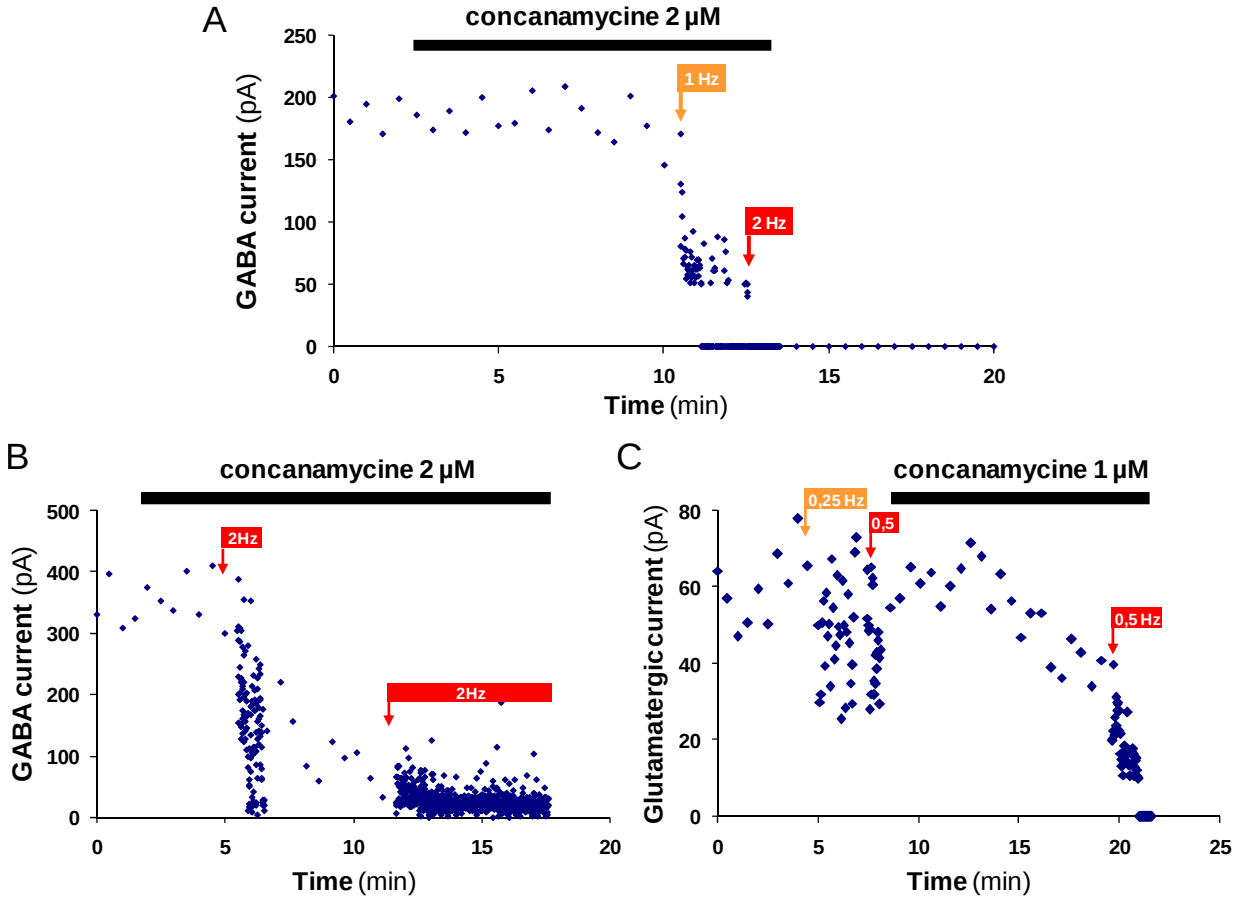


Figure 45. The inhibitory effect of v-ATPase H^+-pump blockade on the synaptic transmission appears 10 minutes after drug perfusion

(**A**) v-ATPase H^+-pump function blockade by concanamycine has no effect on the amplitude of postsynaptic currents before 10 minutes of drug perfusion (with two stimulations of the presynaptic cell per minute). Increasing the presynaptic stimulation frequency to 1 or 2 Hz permits to deplete presynaptic stores. This effect was irreversible. (**B**-**C**) Same experiments with various combinations of drug concentration and presynaptic stimulation frequency. A, B and C are representative experiments.

(**ii**) Les agents chimiques utilisés pour les expériences de photoinactivation n'ont jamais été testés sur des neurones de mammifères. C'est pourquoi il a été nécessaire de vérifier qu'ils n'affectent pas la libération de NT. L'expérience présentée sur la figure 46a montrent que le réactif bi-arsenique (« lumio ») et le composé nécessaire à l'élimination du bruit de fond (« BAL », agent réducteur permettant de limiter la fixation non spécifique du « lumio »), n'ont pas d'effet significatif sur la transmission synaptique (n = 9).

Dans les premières expériences de photoinactivation, nous avons observé une modification de la forme du potentiel d'action présynaptique après le flash lumineux, qui suggérait un effet non sélectif du flash lumineux sur les terminaisons. Il a donc fallu trouver les conditions expérimentales optimales (*i.e.* ratio lumio/BAL, en termes de concentration et de durée de perfusion) qui permettent d'éliminer les effets non sélectifs sur le potentiel d'action tout en rendant possible la dénaturation de la protéine portant l'étiquette TC. Ainsi, les concentrations de lumio et de BAL ont été fixées empiriquement à 2 µM et à 0,5-1 µM, respectivement ; et le flash lumineux a été appliqué après 5 minutes de perfusion du lumio suivie de 10 minutes de perfusion du BAL.

(**iii**) Les résultats obtenus avec les neurones transfectés avec la sous-unité a1-I étiquetée en N-terminal (figure 46b) montrent que la photoinactivation entraine une réduction très rapide, d'environ 50 %, de l'amplitude des réponses postsynaptiques (l'effet apparaît en moins de 2 minutes, contrairement aux effets lents de la concanamycine à la même fréquence de stimulation, décrits précédemment). Un résultat similaire a été observé avec un étiquetage en C-terminal (non figuré) et la photo-inactivation de la sous-unité A de V1 n'a pas eu d'effet significatif sur la transmission synaptique (non figuré).

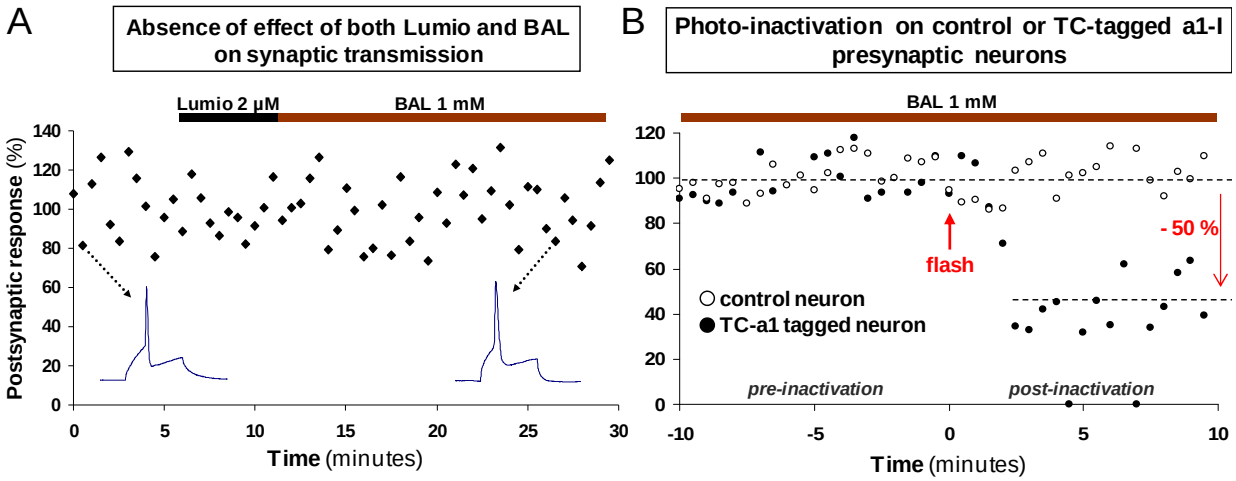


Figure 46. Photoinactivation of the a1-I subunit in the presynaptic neuron decreases action potentiel-evoked synaptic transmission

(**A**) The two chemicals required for photoinactivation experiments (see *D*) have no effects on presynaptic action potentials and on postsynaptic current responses. Representative experiment.
(**B**) Brief blue light flash (30s) applied on the preparation decreases the postsynaptic current response when the presynaptic cell overexpresses the photosensible a1 protein (TC-a1 tagged neuron, black circles). No change is observed when the presynaptic cell is transfected with GFP alone (control neuron, white circles). Representative experiment. This result was triplicated.

Conclusions et perspectives **:**

Cette série d'expérience montre pour la première fois que la photoinactivation de la sous-unité a1 du domaine V0 de la v-H^+ATPase altère la transmission synaptique (qu'elle soit glutamatergique ou GABAergique), cet effet étant indépendant du remplissage des vésicules présynaptiques en NT. L'absence d'effet observée après la photoinactivation de la sous-unité A du domaine V1 confirme l'absence d'implication de ce domaine, et donc du transport de protons, dans la formation du pore de fusion. Ceci va dans le sens d'une éventuelle dissociation de V1 dans l'étape finale de libération des NT, comme le considère l'hypothèse du pore de fusion membranaire (Peters et al., 2001).

La diminution d'environ 50% des réponses postsynaptiques suggère qu'une fraction du pool de vésicules présynaptique continue de libérer correctement le NT, après le flash lumineux. Cette fraction pourrait correspondre aux vésicules contenant la sous-unité a1-I endogène mais n'exprimant pas la sous-unité recombinante (tag-TC), ce qui renforce par ailleurs la sélectivité de l'approche utilisée.

La transfection des différentes sous-unités recombinantes dans des neurones pyramidaux de tranches corticales (par balistique) et la mesure de la transmission synaptique dans des synapses identifiés (*e.g.* entre un neurone pyramidal de couche 2/3 et un neurone pyramidal de couche 5 ; *voir la description de la colonne corticale dans la partie I de l'Introduction, page 24*), pourront apporter une confirmation des résultats obtenus avec les cultures de neurones, dans un système natif complexe.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Dans cette discussion générale, j'aborderai les points importants qui n'ont pas été discutés dans les parties I et II des Résultats. Puis je conclurai sur les perspectives de mon travail de thèse et sur le projet de recherche que je souhaite développer à court terme.

∴

I - Discussion générale

1) Interactions entre systèmes neuromodulateurs

La déplétion du système sérotoninergique a conduit à une forte diminution de la balance E-I, de 20%-80% à 14%-86%, qui est due en partie à une forte augmentation de l'inhibition évoquée dans le réseau cortical (suite à la stimulation des couches 2/3 ou 6) (*voir la figure 3 dans Moreau et al., 2009*). A ce niveau, il est difficile de savoir si l'effet observé est la conséquence d'une réduction de l'activité des neurones glutamatergiques, d'un renforcement de l'activité des interneurones GABAergiques ou d'une action complexe sur ces deux populations neuronales. Néanmoins, la perfusion de 5-HT sur les tranches pCPA a davantage réduit les entrées inhibitrices sur le neurone pyramidal de couche 5, que les entrées excitatrices. Bien que ceci suggère un rôle majeur de la 5-HT corticale dans la régulation des systèmes inhibiteurs, des effets modulateurs, secondaires à la déplétion sérotoninergique et impliquant d'autres systèmes neuromodulateurs, ne peuvent être exclus. La déplétion pharmacologique du système sérotoninergique peut par exemple stimuler la génération de neurones dopaminergiques (Rodriguez-Pallares et al., 2003) ou conduire à une augmentation de l'expression de la NO synthase neuronale (nNOS) dans le cortex de rat (Tagliaferro et al., 2003). Bien que le blocage de la nNOS n'ait pas d'effet direct à court terme sur la balance E-I (Le Roux et al., 2009), il se peut qu'une modification de la signalisation NO neuronale pendant la période critique postnatale (*i.e.* pendant les 4 jours d'injection de pCPA avant P21) ait eu un effet sur la balance E-I. En accord avec cet argument, la nNOS est préférentiellement exprimée par les interneurones GABAergiques du cortex de rat (Seress et al., 2005) et un donneur de NO peut augmenter la fréquence des courants inhibiteurs spontanés et miniatures, enregistrés dans des cultures de neurones (Zanelli et al., 2009). Par ailleurs, la déplétion néonatale du système noradrénergique provoque une désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A} (Dabrowska et al., 2008), suggérant une interaction entre sérotonine et noradrénaline.

De façon plus générale, de nombreux travaux ont révélé que la sérotonine module le fonctionnement du système dopaminergique (Di Pietro et Seamans, 2007) qui peut diminuer, ou augmenter, la transmission synaptique entre interneurones « Fast-Spiking », ou « non Fast-Spiking » et neurones pyramidaux (Gao et al., 2003) ; ceci pourrait par conséquent influencer le fonctionnement intégré des microcircuits corticaux. La sérotonine module aussi le fonctionnement du système cholinergique (Cassel et Jeltsch, 1995) et la libération d'acétylcholine dans le cortex conduit à une diminution de la balance E-I dans les neurones pyramidaux de couche 5 (Lucas-Meunier et al., 2009). Enfin, le système sérotoninergique semble pouvoir interagir avec le système des opiacés (Lopez-Gimenez et al., 2008). Dans ce dernier exemple, les auteurs ont montré que l'activation du récepteur 5-HT_{2A}, dans des tranches corticales de souris, favorise la désensibilisation du récepteur aux opiacés de type *mu*, provoquée par la morphine.

2) Déplétion sérotoninergique et connectivité corticale

La perfusion de 5-HT exogène sur les tranches déplétées en sérotonine endogène n'a permis de restaurer que partiellement la balance E-I vers son « set-point ». Ce résultat peut s'expliquer par l'éventuelle redistribution des récepteurs sérotoninergiques (liée à la diminution de libération de 5-HT), mais cette hypothèse semble infirmée par les résultats obtenus après blocage de la recapture de sérotonine (*voir la figure 2 dans Moreau et al., 2009*). En effet, l'augmentation de la concentration de sérotonine extracellulaire a provoqué une diminution des entrées excitatrices et inhibitrices (sur le neurone pyramidal de couche 5) de façon similaire à ce qui a été observé avec la perfusion de sérotonine exogène sur tranches pCPA. Le « schéma » d'activation (globale dans ces conditions) des récepteurs 5-HT ne semble donc pas être modifié par la déplétion. Au contraire, et ceci pourrait expliquer le caractère partiel de la restauration de la balance E-I, la déplétion a pu entrainer des modifications irréversibles de la connectivité entre neurones excitateurs et inhibiteurs du réseau cortical stimulé.

En effet, la déplétion du système sérotoninergique pendant la période embryonnaire (par injection de pCPA) peut modifier l'insertion de certains types d'interneurones dans le cortex, et peut aussi altérer la maturation des neurones pyramidaux et des neurones GABAergiques (*e.g.* modification de leurs arborisations dendritiques) des couches 2/3 et 5 (Vitalis et al., 2007). Une déplétion postnatale par une neurotoxine sélective des axones sérotoninergiques altère également l'arborisation des interneurones GABAergiques exprimant la calrétinine

(Durig et Hornung, 2000). Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de sérotonine (par blocage de son transporteur membranaire) induit une augmentation de l'expression d'une protéine d'adhésion neuronale (NCAM, Varea et al., 2007) qui est connue pour son rôle général dans le remodelage cortical chez l'adulte (Kiss et al., 2001).

Ainsi la forte augmentation de l'inhibition observée après la déplétion sérotoninergique pourrait être due à une modification postnatale de l'architecture et du poids des réseaux inhibiteurs corticaux. Dans ce sens, les modulations observées avec le bloqueur de recapture et avec les antagonistes des récepteurs 5-HT sur des tranches non déplétées ont été, dans tous les cas, plus marquées pour les signaux inhibiteurs que pour les signaux excitateurs. Ceci suggère alors des interrelations « préférentielles » entre la sérotonine et les réseaux inhibiteurs.

Enfin, la perte du contrôle homéostatique de la balance E-I sur tranches déplétées en 5-HT (*voir la partie II des Résultats ainsi que le paragraphe 4 ci-après*) renforce l'idée d'une modification de l'architecture des connexions neuronales dans le réseau cortical stimulé (après déplétion). En effet, le maintien de la balance E-I autour de son « set-point » dépend d'un « pattern » précis de projections entre les différents étages de la colonne corticale (Le Roux et al., 2008a,b), toute modification de ce « pattern » de connectivité pouvant alors altérer le maintien de la balance.

3) Sérotonine et intégration dendritique

3.1) Modulation sérotoninergique de l'inhibition shuntante

Bien que ne comptant que pour 1% des entrées synaptiques sur un neurone pyramidal, l'inhibition proximale est extrêmement puissante et est déterminante dans le contrôle de l'intégration dendritique (Trevelyan et Watkinson, 2005). C'est pourquoi nous avons estimé les modulations de l'inhibition shuntante, ou silencieuse, agissant au niveau proximal de la dendrite apicale des neurones pyramidaux de couche 5 (*voir dans la section Introduction, le paragraphe 1.3.1.2 p.85, et dans la section Méthode, le paragraphe 3.3 p.121*). L'inhibition shuntante (absence de courant ionique hyperpolarisant, mais diminution locale de la résistance membranaire) peut diminuer sensiblement les entrées synaptiques et modifier la fenêtre temporelle d'intégration dendritique (Semyanov et al., 2004), ce qui a pour conséquence de moduler le traitement cortical des informations sensorielles (Mitchell and Silver, 2003).

Nous avons montré que la sérotonine corticale peut, par l'activation de populations d'interneurones spécifiques dans les couches supérieures (stimulation des couches 2/3), diminuer (*via* l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} ou 5-HT_7) ou augmenter (*via* l'activation du récepteur 5-HT_3) l'inhibition shuntante dans les neurones pyramidaux de couche 5. De façon très intéressante, aucune modification de l'inhibition shuntante n'a été observée avec les stimulations de la couche 6, excepté dans le cas du blocage du récepteur 5-HT_{2A} (diminution du shunt). Dans cette dernière configuration, nous supposons que des sous-populations d'interneurones de couche 6, exprimant le récepteur 5-HT_{2A} (*e.g.* interneurone de type "basket cell" ; *voir dans Moreau et al., 2009, les donnés obtenues en RT-PCR sur cellule unique*), libèrent du GABA dans la partie proximale de la dendrite apicale, ce qui modulera l'intégration dendritique. La modulation continue de ces populations d'interneurones par une libération tonique de sérotonine pourrait donc constituer un mécanisme dynamique (*i.e.* selon l'état d'activité des noyaux du raphé) de l'intégration dendritique *in vivo.*

3.2) Sérotonine et potentiels d'action rétropropagés

Les modifications de l'inhibition shuntante (après blocage d'un récepteur 5-HT) ont toujours été associées à un changement significatif de la balance E-I déterminée au niveau du soma des neurones pyramidaux de couche 5. Ceci révèle que l'effet modulateur de la sérotonine − sur les populations d'interneurones ciblant spécifiquement les dendrites proximales, ou directement sur les récepteurs-canaux $GABA_A$ dendritiques − peut avoir un impact important sur l'intégration dendritique de l'ensemble des entrées synaptiques en amont, et finalement sur le niveau d'excitabilité somatique des neurones pyramidaux de couche 5. De plus, des modulations sérotoninergiques locales de la résistance (*i.e.* shunt) ou du potentiel (*i.e.* hyperpolarisation) membranaire dans la partie proximale de la dendrite apicale, pourraient limiter la rétropropagation des potentiels d'action somatiques (Sandler et Ross, 1999 ; *voir dans l'Introduction, le paragraphe 1.3.2.3 p.90*). De telles modulations influenceraient alors, de façon complexe et rétrograde, le fonctionnement de la boucle d'intégration corticale (*voir la figure 31 p.103*). Ceci indique toute l'importance de déterminer le rôle modulateur de la sérotonine sur les populations d'interneurones exprimant certains récepteurs 5-HT (*e.g.* cellules de Martinotti de couche 6 exprimant le récepteur 5-HT_{2A} ou interneurones des couches 2/3 exprimant le récepteur 5-HT_3) et ciblant spécifiquement les dendrites des neurones pyramidaux. Dans ce but, et afin de préciser ces fonctions modulatrices jusqu'alors inexplorées, l'enregistrement électrophysiologique de signaux

excitateurs à différents niveaux de la dendrite, associé ou non à la stimulation de synapses inhibitrices proximales identifiées doit être envisagé.

4) Sérotonine, « set-point » et contrôle homéostatique de la balance E/I

Les résultats décrits dans *Moreau et al. 2009* révèlent que la sérotonine module finement la balance E-I, et que son action requiert l'activation de récepteurs 5-HT spécifiques dans la colonne corticale. Néanmoins, cette approche n'a pas permis d'appréhender les effets modulateurs de la 5-HT sur les rétroprojections établies entre les neurones pyramidaux de couche 5 et les microcircuits des couches 2/3 et 4 en amont. Or, comme cela a été expliqué dans le préambule de la section *Résultats*, le recrutement de ces boucles de rétrocontrôle est d'une part, essentiel pour la régulation homéostatique de la balance E-I atour de son « set-point » et est, d'autre part, très probablement effectif *in vivo* lorsque les neurones de couche 5 sont stimulés (Domenici et al., 1995). L'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence (HFS) en couche 2/3 a permis à la fois, de modifier le poids de certaines synapses dans le réseau cortical stimulé, et de recruter les rétroprojections établies par le neurone pyramidal de couche 5 enregistré (Le Roux et al., 2006). Ces premiers résultats nous ont permis de déterminer le rôle de la sérotonine dans le contrôle homéostatique de la balance E-I et dans la modulation des mécanismes sous-jacents.

En situation de blocage du transporteur membranaire de la sérotonine par le citalopram (pendant l'application du protocole HFS), il n'a pas été possible de potentier les entrées synaptiques sur le neurone pyramidal de couche 5. Cette observation rappelle l'action inhibitrice de la sérotonine endogène sur la LTP, rapportée par Edagawa et al. (2001), mais ne permet pas de conclure sur son rôle dans la régulation homéostatique de la balance E-I. Par contre, la déplétion de la sérotonine endogène (tranches pCPA) a conduit à une perte de la régulation homéostatique de la balance E-I (*voir la figure 41 p.155*). En effet, les entrées synaptiques inhibitrices sont dans ce cas fortement potentiées après le protocole HFS, alors que les entrées excitatrices ne le sont pas. Ainsi, la diminution de la balance E-I observée sur tranches pCPA dans des conditions de stimulations « contrôle » (*voir la figure 3 dans Moreau et al., 2009*) se trouve amplifiée après stimulation à haute fréquence du réseau cortical (HFS).

La sérotonine corticale apparaît donc essentielle pour la détermination de la valeur du « set-point » ainsi que pour la régulation homéostatique de la balance E-I. Considérant que les injections de pCPA ont été réalisées pendant la période critique postnatale (autour de P16,

et sur quatre jours consécutifs), le contrôle sérotoninergique du « set-point » de la balance E-I pourrait être sous-tendu par l'action trophique de la 5-HT sur la mise en place des structures corticales (*voir le paragraphe 2 précédent*).

Le contrôle homéostatique de la balance E-I, ou de tout autre système, requiert des mécanismes effecteurs qui ramènent la balance vers son « set-point » en cas de dérégulation du système (*voir page 108 de l'Introduction, le paragraphe 4*). Parmi ceux-ci, les rétroprojections des neurones pyramidaux de couche 5 sur les microcircuits excitateurs et inhibiteurs en amont pourrait être une cible privilégiée de la 5-HT corticale. Pour préciser cette hypothèse, j'ai appliqué des protocoles HFS en présence d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{1A}. L'expression importante de ce sous-type au niveau du soma et du segment initial de l'axone des neurones pyramidaux de couche 5, en fait un bon candidat pour la modulation sérotoninergique des boucles du rétrocontrôle cortical. Une perte de la régulation homéostatique de la balance E-I a été observée après blocage du récepteur 5-HT_{1A} (*voir la figure 42 p.156*), avec un profil de potentiation des entrées synaptiques quasi similaire à la condition pCPA (forte potentiation de l'inhibition, accompagnée d'une faible potentiation de l'excitation). Ce résultat contraste fortement avec les observations réalisées lors des stimulations sous liminaires en présence d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (*voir la figure 4 dans Moreau et al., 2009*), à savoir une augmentation en même proportion de l'excitation et de l'inhibition, sans modification de la balance E-I. Ce résultat suggère donc (i) que l'activation, ou non, du récepteur 5-HT_{1A} sur les neurones pyramidaux détermine l'état du rétrocontrôle de la couche 5 sur les couches corticales supérieures et (ii) que son rôle dans la régulation homéostatique de la balance E-I est essentiel.

Pour confirmer cette hypothèse, il est maintenant nécessaire d'étudier la régulation homéostatique de la balance E-I sur des souris invalidées pour le récepteur 5-HT_{1A}. Des expériences de co-perfusion du citalopram avec l'antagoniste du récepteur 5-HT_{1A} seraient également un bon complètement, d'autant plus qu'elles reproduiraient – a bien plus court terme toutefois – un des protocoles thérapeutiques utilisé pour le traitement de la dépression (*voir page 76 de l'Introduction, le chapitre 7*).

5) Topographie sérotoninergique corticale

Les effets modulateurs différents observés entre la stimulation des couches 2/3 et la stimulation de la couche 6, après blocage pharmacologique des récepteurs 5-HT_{2A} ou 5-HT_3, constituent deux évidences fonctionnelles qui renvoient à la spécificité des projections sérotoninergiques corticales issues des différents noyaux du raphé. En effet, la ségrégation corticale des récepteurs 5-HT corticaux que nous avons décrite (*voir Moreau et al., 2009*) doit être corrélée à une possibilité d'activation sélective de certaines fibres sérotoninergiques corticales par le raphé. Nous pouvons alors proposer qu'en fonction de leur localisation dans la colonne corticale, les fibres sérotoninergiques afférentes activent des pools de récepteurs 5-HT particuliers et modulent sélectivement, et transitoirement, les différents étages de traitement de l'information dans la colonne corticale (*voir, par exemple, la figure 6 dans Moreau et al., 2009,* et la figure 47 ci-après). Dans cette optique physiologique, il faut considérer que chaque noyau du raphé peut avoir une topographie de projections dans le cortex qui lui est propre, l'activation d'un noyau du raphé particulier pouvant conduire à un effet modulateur spécifique (Amargós-Bosch et al., 2004). C'est par exemple le cas dans l'hippocampe où les terminaisons sérotoninergiques en provenance du raphé médian ne ciblent pas tous les sous-types d'interneurones GABAergiques, mais « sélectionnent » ceux exprimant certains marqueurs biochimiques et en « excluent » autant d'autres (Freund, 1992 ; Papp et al., 1999).

En considérant uniquement le neurone pyramidal de couche 5, des projections spécifiques doivent permettre au système sérotoninergique de moduler les différents compartiments d'intégration des entrées thalamiques et d'émission des réponses neuronales (figure 47) :
- dendrites distales (*via* l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} et/ou 5-HT_7 des cellules de Martinotti des couches profondes et leur projection axonale ascendante),
- dendrite apicale proximale (*via* l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_4 et 5-HT_7 ou du récepteur 5-HT_3 exprimé sur les interneurones des couches 2/3),
- soma (*via* l'activation des sous-types 1A, 2A, 4 et 7 présents sur le neurone pyramidal),
- segment initial de l'axone (*via* l'activation du récepteur 5-HT_{1A}).

A l'échelle des microcircuits inhibiteurs, la modulation sélective de certaines populations d'interneurones corticaux (exprimant des récepteurs 5-HT particuliers) impliquées dans l'inhibition hyperpolarisante ou shuntante (*voir précédemment, le paragraphe 3.1*), semble compliquer les possibilités de contrôle sérotoninergique des signaux de sortie corticaux (Farrant et Nusser, 2005).

In fine, le vaste maillage de fibres sérotoninergiques dans le néocortex et le « pattern » d'activité des noyaux du raphé (*voir en Introduction, les paragraphes 1.2 et 1.3 pages 50 et 53*) pourraient définir *in-vivo*, (i) les aspects spatiaux, (ii) les aspects temporels, et (iii) la sélectivité topographique de la modulation sérotoninergique du fonctionnement de la colonne corticale.

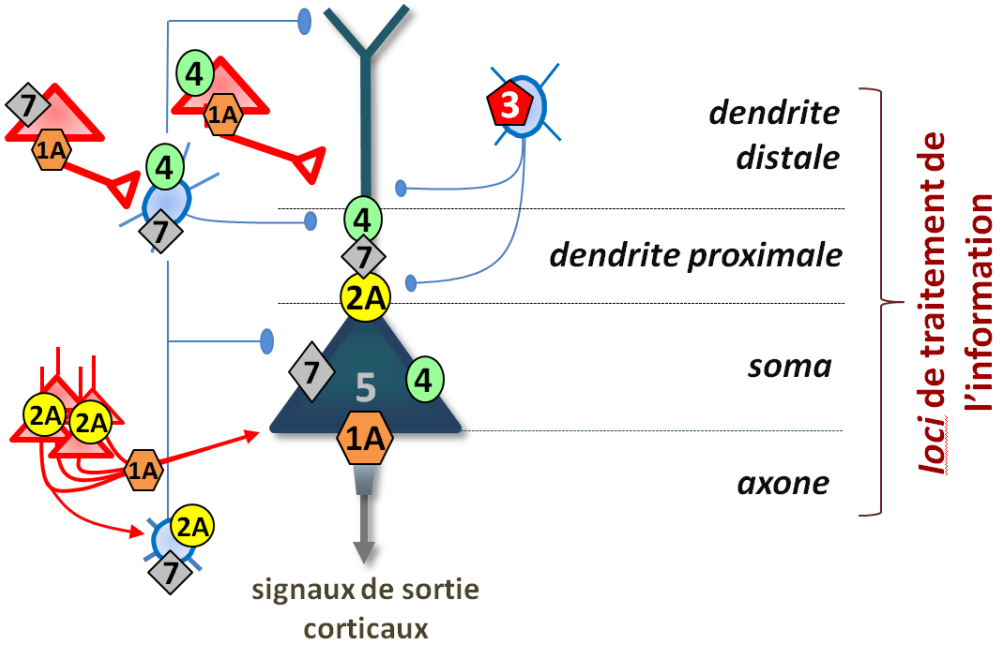


Figure 47. Ségrégation morpho-fonctionnelles des récepteurs 5-HT

Représentation simplifiée de la répartition des différents sous-types de récepteurs 5-HT sur le neurone pyramidal de couche 5, sur les neurones pyramidaux (rouge) et sur les interneurones (bleu) des microcircuits corticaux afférents, présents dans les différents étages de la colonne corticale. Ce schéma tient compte de données histologiques et électrophysiologiques.

6) Modulations fines et « set point » physiologique

Les modulations de la balance E-I obtenues après le blocage des différents récepteurs 5-HT sont contenues autour du « set-point » 20%-80%, avec pour valeur minimale 15%-85% et pour valeur maximale 26%-74%. Les modulations relayées par le système sérotoninergique sont donc fines et sans commune mesure avec la forte augmentation de la balance E-I (*i.e.* 60%-40%) qui peut être observée en présence d'un bloqueur partiel des récepteurs $GABA_A$ de la tranche corticale (Le Roux et al., 2008).

Un tel système neuromodulateur pourra être considéré comme fiable d'un point de vue physiologique si les modulations qu'il provoque sont contenues entre la limite basse et la limite haute de son « set-point » (*i.e.* bornes « pathologiques »). Il devient donc très

intéressant de déterminer ces valeurs au niveau d'un réseau neuronal actif, fonctionnant à fréquence élevée (*i.e.* situation physiologique). En modélisant, dans un réseau neuronal complexe et actif, les propriétés d'intégration, d'émission de potentiels d'action, et d'interaction d'environ 20.000 neurones (15.000 neurones excitateurs et 5000 neurones inhibiteurs, *i.e.* mimant l'organisation corticale), une étude computationnelle récente a montré qu'une diminution – ou une augmentation – de 60% du poids soit des synapses inhibitrices, soit des synapses excitatrices, conduit à une situation pathologique (Vogels et Abbott, 2009). Dans les deux cas, elle correspond à l'émission de potentiels d'action par le réseau neuronal de manière anarchique, et ceci en absence d' « input » stimulateur. Au contraire une diminution de 15% de l'excitabilité des neurones inhibiteurs produit, comme attendue, une augmentation de la réponse du réseau neuronal suite à la « stimulation » sans conduire à la situation pathologique décrite précédemment. A la vue de ces résultats, et considérant les modulations de la balance E-I décrites dans *Moreau et al., 2009*, nous pouvons suggérer que le système sérotoninergique « autorise » des modulations fines de l'excitabilité des neurones pyramidaux de couche 5 dans un domaine physiologique.

Ceci soulève alors la question de l'équilibre entre la modulation dynamique des processus corticaux (dans le but d'adapter la réponse corticale à une situation comportementale donnée) et le maintien, par régulation homéostatique, de l'activité du système au niveau de son « set-point » (dans le but d'éviter des désordres pathologiques). Dans le cas du système sérotoninergique, mes résultats vont dans le sens d'un rôle composite. En effet, la sérotonine pourrait moduler précisément les processus d'intégration des signaux sensoriels *in vivo* – modulation qui dépendrait alors de l'état d'activité des neurones du raphé − tout en évitant les phénomènes pathologiques d'hyper- ou d'hypoexcitabilité (*e.g.* épilepsie), par la régulation homéostatique de l'excitabilité des neurones pyramidaux de couche 5. Nous ne pouvons toutefois pas exclure que les modulations sérotoninergiques constituent aussi un mécanisme, à part entière, de régulation homéostatique. Par ailleurs, l'activation cordonnée des récepteurs 5-HT corticaux pourrait être un processus cortical intrinsèque dont la mise en jeu permettrait d'améliorer l'efficacité de l'intégration réalisée au sein de la colonne corticale.

Pour conclure, et en écho avec la citation placée en exergue de ce manuscrit, la sérotonine corticale pourrait être le « fontenier » évoqué par Descartes, dans la mesure où elle peut, par son action sur les réseaux excitateurs et inhibiteurs, changer l'excitabilité des neurones pyramidaux de couche 5, dont les messages de sortie déterminent la réponse comportementale de l'Homme.

II - Perspectives

Mes résultats ont révélé la grande complexité des modulations sérotoninergiques de la balance E-I et de son contrôle homéostatique, à l'échelle des réseaux neuronaux et sur tranche corticale. Ils ont également révélé la difficulté expérimentale de différencier les modulations des processus d'intégration dendritique réalisés par les neurones pyramidaux de couche 5, des modulations de l'activité des microcircuits interconnectés dans la colonne corticale (et ciblant les neurones pyramidaux de couche 5). Dans ce contexte, différents axes de recherche pourraient être développés pour préciser le rôle complexe du système sérotoninergique :

- étude des modulations sérotoninergiques des réponses évoquées dans les neurones pyramidaux de couche 5 par des stimuli visuels simples ou complexes chez l'animal anesthésié (par enregistrement de l'activité électrophysiologique des neurones en *patch clamp* et visualisation des signaux calciques dendritiques *in vivo*).
- étude des modulations sérotoninergiques à l'échelle d'un réseau cortical entier *in vivo*, avec ou sans stimulation sensorielle (*e.g.* par imagerie bi-photonique du cortex visuel chez l'animal anesthésié, après injection et diffusion d'un rapporteur d'activité neuronal fluorescent de type sonde calcique).
- modulation des mécanismes d'intégration dendritique par la sérotonine sur tranche corticale (par enregistrement dendritiques multiples et visualisation des signaux calciques).
- étude de la modulation par la 5-HT du fonctionnement, et des propriétés de plasticité, de synapses excitatrices ou inhibitrices identifiées (*i.e.* dans la colonne corticale), sur tranche ou *in vivo*.

Afin de comprendre plus précisément, et dans leur ensemble, les mécanismes de neuromodulation des réseaux neuronaux corticaux, il apparait paradoxalement nécessaire d'en étudier, à l'échelle synaptique, les différentes composantes. C'est pourquoi, j'ai choisi de poursuivre ce travail de thèse par l'étude de la modulation sérotoninergique d'un des mécanismes de l'intégration dendritique réalisée par les neurones de couche 5 : la plasticité dépendante de la coïncidence des potentiels d'action rétropropagés (« Spike-Timing-Dependent Plasticity » ou « STDP » – *voir le paragraphe 1.3.2.3 p.90*). Plus précisément, je souhaite m'intéresser à la STDP entre les neurones pyramidaux des couches 2/3 et les neurones pyramidaux de la couche 5, dont les mécanismes fondamentaux ont été intensément étudiés (Sjöström et al., 2001 ; Sjöström et Nelson, 2002 ; Sjöström et Häusser, 2006 ;

Sjöström et al., 2008). Bien que la sérotonine tende à réduire la rétropropagation des potentiels d'action somatiques (Sandler et Ross, 1999), son rôle modulateur sur la STDP n'a jamais été exploré. J'ai donc élaboré un projet de recherche avec le Dr Jesper Sjöström que je compte développer en Post-Doc, dans son laboratoire, à l'University College London (UCL, Department of Neuroscience, Physiology & Pharmacology, Londres).

La faisabilité de ce projet sera déterminée en premier lieu sur tranche de cortex visuel par une approche pharmacologique simple et pouvant être mise en œuvre rapidement : perfusion de sérotonine, d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs 5-HT, ou de bloqueurs de la recapture de la sérotonine, dont j'ai déjà l'expérience.

Pour atteindre un niveau de modulation le plus fin possible, nous utiliserons ensuite la technique de photoactivation de la channelrhodopsine-2 (ChR2, figure 48) (Arenkiel et al., 2007 ; Petreanu et al., 2007 ; Zhang et al., 2007a ; Sohal et al., 2009, et pour revue : Zhang et al., 2007b), ChR2 que nous exprimerons dans les neurones sérotoninergiques. Cette approche, qui permet de s'affranchir des limites habituelles des expériences de neuromodulation (Henderson et al., 2009), va permettre de rendre les terminaisons sérotoninergiques corticales sensibles à la lumière bleue. En effet, un flash lumineux provoquera une dépolarisation sélective des éléments exprimant la ChR2 (ouverture d'un canal cationique non sélectif, figure 48b) et permettra une libération de sérotonine dans notre cas. Les terminaisons de la tranche corticale pourront alors être activées avec une résolution spatiale et temporelle très précise grâce à l'utilisation de la microscopie biphotonique (laser Argon/Krypton à 488 nm), couplée à l'enregistrement électrophysiologique multiple unitaire nécessaire au protocole de STDP (quadruple *patch clamp* de neurones pyramidaux des couches 2/3 et 5, figure 49).

Le rôle modulateur fin de la sérotonine sur la STDP sera d'abord déterminé chez la souris en utilisant deux lignées disponibles : SERT-Cre et lox-ChR2 (le croisement de ces deux lignées permettra l'expression de ChR2 dans les terminaisons 5-HT, Zhuang et al., 2005 ; Murphy et Lesch, 2008). La sérotonine sera libérée de manière localisée dans différents compartiments dendritiques du neurone pyramidal de couche 5 et les modulations de la STDP correspondantes seront déterminées. Pour préciser les mécanismes sous-tendant les modulations observées dans cette deuxième partie du projet, il sera nécessaire de réaliser des enregistrements dendritiques multiples pendant l'application du protocole de STDP. En raison de la difficulté de tels enregistrements électrophysiologiques chez la souris, nous développerons un nouvel outil optogénétique pouvant être utilisé chez le rat.

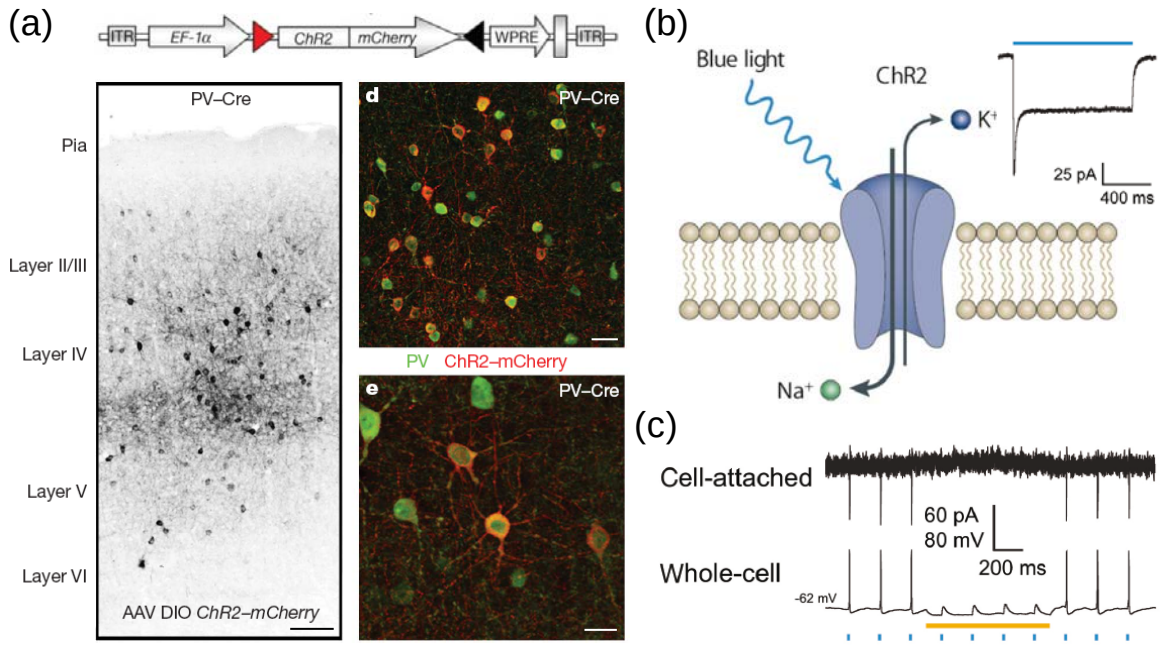


Figure 48. La technologie channelrhodopsin-2 dans le cortex

(**a**) Expression d'une construction ChR2-mCherry sous contrôle d'un promoteur spécifique des interneurones corticaux exprimant la paravalbumine (PV). Les tranches corticales sont visualisées quelques jours après injection stéréotaxique des adénovirus codant pour la construction ChR2-mCherry, dans le cortex de rat.

(**b**) L'activation de la ChR2 par la lumière bleue entraine l'ouverture d'un canal cationique non sélectif et la genèse d'un courant entrant dépolarisant soutenu.

(**c**) L'illumination de la tranche corticale (points bleus) permet de stimuler les neurones exprimant la ChR2 et provoque l'émission de potentiels d'action (*la barre jaune correspond à la stimulation d'une autre construction photosensible qui permet d'hyperpolariser les cellules*).

Adapté d'après Cardin et al. 2009, Nature et d'après Hendersen et al. 2009, Neurosurgery.

Dans ce but, nous souhaitons créer une construction virale permettant l'expression de la ChR2 sous contrôle du promoteur SERT (afin d'adresser la ChR2 dans les terminaisons sérotoninergiques corticales). Cette construction sera réalisée avec des vecteurs de type adénovirus (figure 48a, Cardin et al., 2009) et sera injectée dans le raphé de rat par stéréotaxie *in vivo*. Cette partie du projet sera développée avec l'expertise des laboratoires des Drs. Kittler et Mrsic-Flogel à l'UCL.

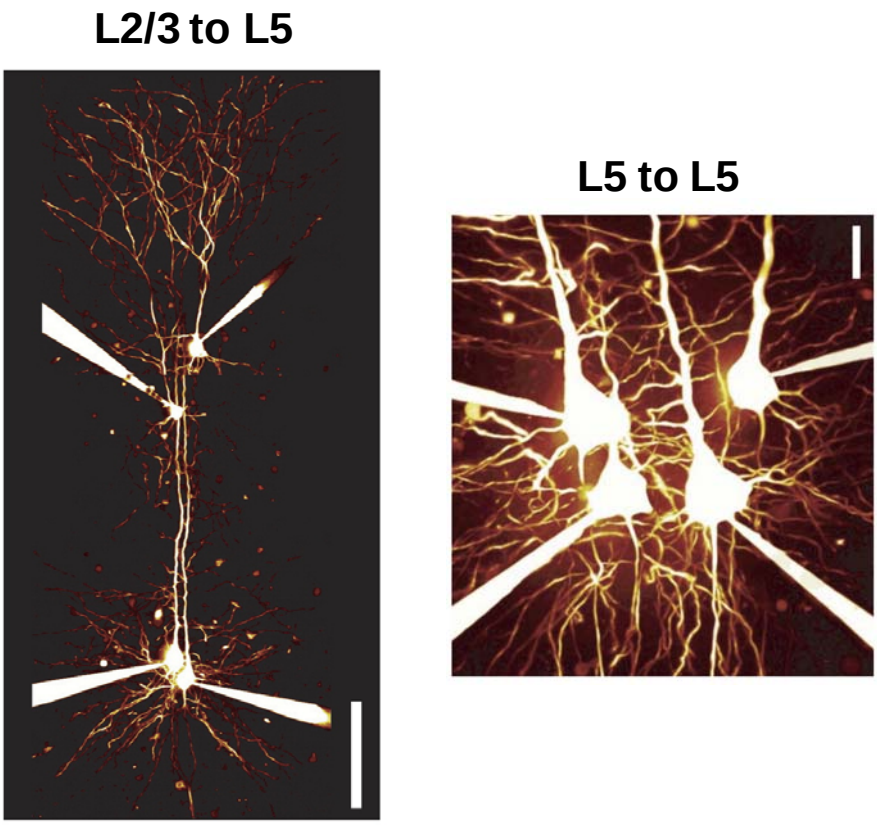


Figure 49. Quadruple *patch clamp* sur tranches corticales

Images obtenues en microscopie biphotonique après diffusion d'une sonde calcique fluorescente dans les neurones pyramidaux enregistrés(en couche 5 ou en couche 2/3).

D'après Sjöström et Häusser 2006, Neuron.

Les mécanismes sous-tendant la modulation sérotoninergique seront alors déterminés en combinant enregistrements électrophysiologiques du soma et de la dendrite apicale du neurone pyramidal de couche 5 (à différentes positions sur l'axe proximodistal) et imagerie biphotonique des transitoires calciques dendritiques évoqués lors de la STDP (Sjöström et Nelson, 2002 ; Sjöström et Häusser, 2006). Ces expériences seront réalisées avec ou sans photoactivation des terminaisons 5-HT corticales et en présence, ou non, d'antagonistes sélectifs de certains récepteurs 5-HT (notamment les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} qui sont fortement exprimés dans les neurones pyramidaux de couche 5). Les déterminants moléculaires de la modulation sérotoninergique seront, le cas échéant, confirmés par l'utilisation de souris invalidées pour les récepteurs d'intérêt (une approche pharmacologique sera utilisée dans ce cas).

Enfin, les données expérimentales obtenues dans ces différentes étapes seront compilées dans un modèle informatique qui récapitule les propriétés « voltage-dépendantes » des potentiels d'action rétropropagés dans les neurones pyramidaux de couche 5 (Stuart et Häusser, 2001). Ce modèle permettra de prédire dans quelles conditions la modulation sérotoninergique de la STDP peut avoir lieu, ou non, et permettra de préciser si la modulation dépend plutôt d'une action sur les potentiels d'action rétropropagés, ou plutôt d'une action sur la transmission synaptique entre neurones pyramidaux des couches 2/3 et 5. Ainsi, ce modèle permettra de déterminer à quel(s) niveau(x) de la boucle d'intégration corticale sont effectives les modulations sérotoninergiques (*voir la figure 31 p.103*).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

Abbas A, Roth BL. **2008**. Arresting serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:831-2.

Abbas AI, Yadav PN, Yao WD, Arbuckle MI, Grant SG, et al. **2009**. PSD-95 is essential for hallucinogen and atypical antipsychotic drug actions at serotonin receptors. *J Neurosci* **29**:7124-36.

Abi-Saab WM, Bubser M, Roth RH, Deutch AY. **1999**. 5-HT2 receptor regulation of extracellular GABA levels in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* **20**:92-6.

Abraham WC, Huggett A. **1997**. Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus* **7**:137-45.

Aghajanian GK. **1978**. Feedback regulation of central monoaminergic neurons: evidence from single cell recording studies. *Essays Neurochem Neuropharmacol* **3**:1-32.

Aghajanian GK, Marek GJ. **1997**. Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* **36**:589-99.

Agmon-Snir H, Segev I. **1993**. Signal delay and input synchronization in passive dendritic structures. *J Neurophysiol* **70**:2066-85.

Agmon-Snir H, Carr CE, Rinzel J. **1998**. The role of dendrites in auditory coincidence detection. *Nature* **393**:268-72.

Ahmed B, Anderson JC, Douglas RJ, Martin KA, Nelson JC. **1994**. Polyneuronal innervation of spiny stellate neurons in cat visual cortex. *J Comp Neurol* **341**:39-49.

Akerman CJ, Cline HT. **2007**. Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. *Trends Neurosci* **30**:382-9.

Alonso JM. **2002**. Neural connections and receptive field properties in the primary visual cortex. *Neuroscientist* **8**:443-56.

Altamura C, Dell'Acqua ML, Moessner R, Murphy DL, Lesch KP, et al. **2007**. Altered neocortical cell density and layer thickness in serotonin transporter knockout mice: a quantitation study. *Cereb Cortex* **17**:1394-401.

Amargos-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, et al. **2004**. Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **14**:281-99.

Andersen P, Dingledine R, Gjerstad L, Langmoen IA, Laursen AM. **1980**. Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *J Physiol* **305**:279-96.

Anderson JC, Douglas RJ, Martin KA, Nelson JC. **1994**. Synaptic output of physiologically identified spiny stellate neurons in cat visual cortex. *J Comp Neurol* **341**:16-24.

Anderson JS, Carandini M, Ferster D. **2000**. Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J Neurophysiol* **84**:909-26.

Androutsellis-Theotokis A, Goldberg NR, Ueda K, Beppu T, Beckman ML, et al. **2003**. Characterization of a functional bacterial homologue of sodium-dependent neurotransmitter transporters. *J Biol Chem* **278**:12703-9.

Ansorge MS, Zhou M, Lira A, Hen R, Gingrich JA. **2004**. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* **306**:879-81.

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

Arckens L, Schweigart G, Qu Y, Wouters G, Pow DV, et al. **2000**. Cooperative changes in GABA, glutamate and activity levels: the missing link in cortical plasticity. *Eur J Neurosci* **12**:4222-32.

Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, et al. **2007**. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* **54**:205-18.

Ascoli GA. **2003**. Passive dendritic integration heavily affects spiking dynamics of recurrent networks. *Neural Netw* **16**:657-63.

Atkinson SE, Williams SR. **2009**. Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **102**:735-51.

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**:641-67.

Aznar S, Qian Z, Shah R, Rahbek B, Knudsen GM. **2003**. The 5-HT1A serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Res* **959**:58-67.

- B -

Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. **2005**. Modulation of neocortical interneurons: extrinsic influences and exercises in self-control. *Trends Neurosci* **28**:602-10.

Bagdy E, Kiraly I, Harsing LG, Jr. **2000**. Reciprocal innervation between serotonergic and GABAergic neurons in raphe nuclei of the rat. *Neurochem Res* **25**:1465-73.

Ballaz SJ, Akil H, Watson SJ. **2007**. Analysis of 5-HT6 and 5-HT7 receptor gene expression in rats showing differences in novelty-seeking behavior. *Neuroscience* **147**:428-38.

Ballesteros-Yanez I, Benavides-Piccione R, Elston GN, Yuste R, DeFelipe J. **2006**. Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience* **138**:403-9.

Bannister AP. **2005**. Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res* **53**:95-103.

Barnes NM, Hales TG, Lummis SC, Peters JA. **2009**. The 5-HT3 receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* **56**:273-84.

Barnes NM, Sharp T. **1999**. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**:1083-152.

Barthet G, Carrat G, Cassier E, Barker B, Gaven F, et al. **2009**. Beta-arrestin1 phosphorylation by GRK5 regulates G protein-independent 5-HT4 receptor signalling. *EMBO J* **28**:2706-18.

Bartos M, Vida I, Frotscher M, Meyer A, Monyer H, et al. **2002**. Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13222-7.

Bartos M, Vida I, Jonas P. **2007**. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* **8**:45-56.

Bassett DS, Meyer-Lindenberg A, Achard S, Duke T, Bullmore E. **2006**. Adaptive reconfiguration of fractal small-world human brain functional networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19518-23.

Bassett DS, Bullmore E, Verchinski BA, Mattay VS, Weinberger DR, et al. **2008**. Hierarchical organization of human cortical networks in health and schizophrenia. *J Neurosci* **28**:9239-48.

Basura GJ, Abbas AI, O'Donohue H, Lauder JM, Roth BL, et al. **2008**. Ontogeny of serotonin and serotonin2A receptors in rat auditory cortex. *Hear Res* **244**:45-50.

Bausch SB, He S, Petrova Y, Wang XM, McNamara JO. **2006**. Plasticity of both excitatory and inhibitory synapses is associated with seizures induced by removal of chronic blockade of activity in cultured hippocampus. *J Neurophysiol* **96**:2151-67.

Beaudet A, Descarries L. **1976**. Quantitative data on serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* **111**:301-9.

Beaulieu C. **1993**. Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res* **609**:284-92.

Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG. **2004**. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol* **91**:994-1005.

Beique JC, Campbell B, Perring P, Hamblin MW, Walker P, et al. **2004**. Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)1A, 5-HT2A, and 5-HT7 receptors. *J Neurosci* **24**:4807-17.

Beique JC, Imad M, Mladenovic L, Gingrich JA, Andrade R. **2007**. Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:9870-5.

Bekkers JM. **2000**. Distribution and activation of voltage-gated potassium channels in cell-attached and outside-out patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J Physiol* **525 Pt 3**:611-20.

Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. **1989**. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**:303-25.

Ben-Ari Y. **2002**. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**:728-39.

Ben-Ari Y. **2006**. Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic Disord* **8**:91-102.

Benhassine N, Berger T. **2005**. Homogeneous distribution of large-conductance calcium-dependent potassium channels on soma and apical dendrite of rat neocortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* **21**:914-26.

Bennett-Clarke CA, Leslie MJ, Lane RD, Rhoades RW. **1994**. Effect of serotonin depletion on vibrissa-related patterns of thalamic afferents in the rat's somatosensory cortex. *J Neurosci* **14**:7594-607.

Bennett MV. **1997**. Gap junctions as electrical synapses. *J Neurocytol* **26**:349-66.

Bennett MV, Zukin RS. **2004**. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* **41**:495-511.

Berger T, Larkum ME, Luscher HR. **2001**. High I(h) channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J Neurophysiol* **85**:855-68.

Berger T, Senn W, Luscher HR. **2003**. Hyperpolarization-activated current Ih disconnects somatic and dendritic spike initiation zones in layer V pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **90**:2428-37.

Berger T, Luscher HR, Giugliano M. **2006**. Transient rhythmic network activity in the somatosensory cortex evoked by distributed input in vitro. *Neuroscience* **140**:1401-13.

Berger M, Gray JA, Roth BL. **2009**. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* **60**:355-66.

Berman N, Payne BR, Labar DR, Murphy EH. **1982**. Functional organization of neurons in cat striate cortex: variations in ocular dominance and receptive-field type with cortical laminae and location in visual field. *J Neurophysiol* **48**:1362-77.

Berton O, Nestler EJ. **2006**. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* **7**:137-51.

Betz H, Laube B. **2006**. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* **97**:1600-10.

Binzegger T, Douglas RJ, Martin KA. **2004**. A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci* **24**:8441-53.

Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. **2009**. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* **61**:820-38.

Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. **1994**. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol* **196**:263-81.

Blatow M, Rozov A, Katona I, Hormuzdi SG, Meyer AH, et al. **2003**. A novel network of multipolar bursting interneurons generates theta frequency oscillations in neocortex. *Neuron* **38**:805-17.

Blier P, de Montigny C. **1994**. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* **15**:220-6.

Blier P. **2001**. Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *J Clin Psychiatry* **62 Suppl 15**:12-7.

Bliss TV, Lomo T. **1973**. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**:331-56.

Bockaert J, Dumuis A, Fagni L, Marin P. **2004**. GPCR-GIP networks: a first step in the discovery of new therapeutic drugs? *Curr Opin Drug Discov Devel* **7**:649-57.

Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. **2006**. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res* **326**:553-72.

Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, et al. **2004**. The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci* **24**:10816-25.

Borg-Graham LJ, Monier C, Fregnac Y. **1998**. Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature* **393**:369-73.

Bortolozzi A, Amargos-Bosch M, Adell A, Diaz-Mataix L, Serrats J, et al. **2003**. In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT(2A) receptors: effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* **18**:1235-46.

Bortolozzi A, Artigas F. **2003**. Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of alpha-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology* **28**:421-34.

Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, et al. **1980**. (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* **283**:92-4.

Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, et al. **1986**. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* **25**:563-76.

Bramham CR, Wells DG. **2007**. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* **8**:776-89.

Branco T, Staras K, Darcy KJ, Goda Y. **2008**. Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses. *Neuron* **59**:475-85.

Branco T, Hausser M. **2009**. The selfish spike: local and global resets of dendritic excitability. *Neuron* **61**:815-7.

Brenner RP. **2004**. EEG in convulsive and nonconvulsive status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* **21**:319-31.

Briggman KL, Kristan WB. **2008**. Multifunctional pattern-generating circuits. *Annu Rev Neurosci* **31**:271-94.

Brocher S, Artola A, Singer W. **1992**. Agonists of cholinergic and noradrenergic receptors facilitate synergistically the induction of long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Brain Res* **573**:27-36.

Broser P, Grinevich V, Osten P, Sakmann B, Wallace DJ. **2008**. Critical period plasticity of axonal arbors of layer 2/3 pyramidal neurons in rat somatosensory cortex: layer-specific reduction of projections into deprived cortical columns. *Cereb Cortex* **18**:1588-603.

Brown SP, Hestrin S. **2009**. Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature* **457**:1133-6.

Brunel N, Wang XJ. **2001**. Effects of neuromodulation in a cortical network model of object working memory dominated by recurrent inhibition. *J Comput Neurosci* **11**:63-85.

Bruno RM, Hahn TT, Wallace DJ, de Kock CP, Sakmann B. **2009**. Sensory experience alters specific branches of individual corticocortical axons during development. *J Neurosci* **29**:3172-81.

Buhl EH, Cobb SR, Halasy K, Somogyi P. **1995**. Properties of unitary IPSPs evoked by anatomically identified basket cells in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **7**:1989-2004.

Bunin MA, Wightman RM. **1998**. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci* **18**:4854-60.

Bunin MA, Wightman RM. **1999**. Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends Neurosci* **22**:377-82.

Burrone J, O'Byrne M, Murthy VN. **2002**. Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature* **420**:414-8.

Burrone J, Murthy VN. **2003**. Synaptic gain control and homeostasis. *Curr Opin Neurobiol* **13**:560-7.

Butler SG, Meegan MJ. **2008**. Recent developments in the design of anti-depressive therapies: targeting the serotonin transporter. *Curr Med Chem* **15**:1737-61.

- C -

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, et al. **2008**. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* **28**:264-78.

Cai X, Flores-Hernandez J, Feng J, Yan Z. **2002**. Activity-dependent bidirectional regulation of GABA(A) receptor channels by the 5-HT(4) receptor-mediated signalling in rat prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Physiol* **540**:743-59.

Cajal SR. **1909.** Histology of the nervous system. See the English translation: Histology of the nervous system of man and vertebrates (translated by N. Swanson and L.W. Swanson), New York: *Oxford University Press*, **1995**).

Cameron HA, Dayer AG. **2008**. New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? *Biol Psychiatry* **63**:650-5.

Canli T, Lesch KP. **2007**. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci* **10**:1103-9.

Cantrell AR, Catterall WA. **2001**. Neuromodulation of Na+ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci* **2**:397-407.

Caporale N, Dan Y. **2008**. Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annu Rev Neurosci* **31**:25-46.

Caputi A, Rozov A, Blatow M, Monyer H. **2009**. Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cereb Cortex* **19**:1345-59.

Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, et al. **2009**. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* **459**:663-7.

Carrel D, Masson J, Al Awabdh S, Capra CB, Lenkei Z, et al. **2008**. Targeting of the 5-HT1A serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *J Neurosci* **28**:8063-73.

Carriere BN, Royal DW, Perrault TJ, Morrison SP, Vaughan JW, et al. **2007**. Visual deprivation alters the development of cortical multisensory integration. *J Neurophysiol* **98**:2858-67.

Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E. **2002**. Minicolumnar pathology in autism. *Neurology* **58**:428-32.

Casanova MF, Buxhoeveden D, Switala A, Roy E. **2003**. Rett syndrome as a minicolumnopathy. *Clin Neuropathol* **22**:163-8.

Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, et al. **1995**. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* **268**:1763-6.

Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, et al. **1996**. Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* **16**:297-307.

Cash S, Yuste R. **1999**. Linear summation of excitatory inputs by CA1 pyramidal neurons. *Neuron* **22**:383-94.

Cassel JC, Jeltsch H. **1995**. Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications. *Neuroscience* **69**:1-41.

Cassenaer S, Laurent G. **2007**. Hebbian STDP in mushroom bodies facilitates the synchronous flow of olfactory information in locusts. *Nature* **448**:709-13.

Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, et al. **1997**. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* **17**:3894-906.

Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, et al. **2000**. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6144-9.

Cauller LJ, Clancy B, Connors BW. **1998**. Backward cortical projections to primary somatosensory cortex in rats extend long horizontal axons in layer I. *J Comp Neurol* **390**:297-310.

Cavelier P, Attwell D. **2007**. Neurotransmitter depletion by bafilomycin is promoted by vesicle turnover. *Neurosci Lett* **412**:95-100.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. **2001**. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* **21**:9917-29.

Chameau P, van Hooft JA. **2006**. Serotonin 5-HT(3) receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* **326**:573-81.

Chance FS, Abbott LF, Reyes AD. **2002**. Gain modulation from background synaptic input. *Neuron* **35**:773-82.

Cherubini E, Conti F. **2001**. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* **24**:155-62.

Chih B, Engelman H, Scheiffele P. **2005**. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* **307**:1324-8.

Chu Z, Galarreta M, Hestrin S. **2003**. Synaptic interactions of late-spiking neocortical neurons in layer 1. *J Neurosci* **23**:96-102.

Cipolloni PB, Kimerer L, Weintraub ND, Smith DV, Keller A. **1998**. Distribution of inhibitory synapses on the somata of pyramidal neurons in cat motor cortex. *Somatosens Mot Res* **15**:276-86.

Claeysen S, Sebben M, Becamel C, Bockaert J, Dumuis A. **1999**. Novel brain-specific 5-HT4 receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol Pharmacol* **55**:910-20.

Cline H. **2005**. Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr Biol* **15**:R203-5.

Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. **1995**. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* **378**:75-8.

Colbert CM, Johnston D. **1996**. Axonal action-potential initiation and Na+ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* **16**:6676-86.

Compte A, Sanchez-Vives MV, McCormick DA, Wang XJ. **2003**. Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (<1 Hz) and wave propagations in a cortical network model. *J Neurophysiol* **89**:2707-25.

Conductier G, Dusticier N, Lucas G, Cote F, Debonnel G, et al. **2006**. Adaptive changes in serotonin neurons of the raphe nuclei in 5-HT(4) receptor knock-out mouse. *Eur J Neurosci* **24**:1053-62.

Contreras D, Timofeev I, Steriade M. **1996**. Mechanisms of long-lasting hyperpolarizations underlying slow sleep oscillations in cat corticothalamic networks. *J Physiol* **494 (Pt 1)**:251-64.

Cools R, Roberts AC, Robbins TW. **2008**. Serotoninergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn Sci* **12**:31-40.

Coppen A, Shaw DM, Herzberg B, Maggs R. **1967**. Tryptophan in the treatment of depression. *Lancet* **2**:1178-80.

Cornea-Hebert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. **1999**. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT2A receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol* **409**:187-209.

Cornea-Hebert V, Watkins KC, Roth BL, Kroeze WK, Gaudreau P, et al. **2002**. Similar ultrastructural distribution of the 5-HT(2A) serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. *Neuroscience* **113**:23-35.

Cossart R, Bernard C, Ben-Ari Y. **2005**. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* **28**:108-15.

Cottam JC. **2009**. Identifying the functional role of Martinotti cells in cortical sensory processing. *J Neurophysiol* **102**:9-11.

Cowan RL, Wilson CJ. **1994**. Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J Neurophysiol* **71**:17-32.

Cowen PJ. **2008**. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? *Trends Pharmacol Sci* **29**:433-6.

Cruikshank SJ, Landisman CE, Mancilla JG, Connors BW. **2005**. Connexon connexions in the thalamocortical system. *Prog Brain Res* **149**:41-57.

Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW. **2007**. Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci* **10**:462-8.

Cruz DA, Eggan SM, Azmitia EC, Lewis DA. **2004**. Serotonin1A receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia. *Am J Psychiatry* **161**:739-42.

Cudeiro J, Sillito AM. **2006**. Looking back: corticothalamic feedback and early visual processing. *Trends Neurosci* **29**:298-306.

Cullen KR, Gee DG, Klimes-Dougan B, Gabbay V, Hulvershorn L, et al. **2009**. A preliminary study of functional connectivity in comorbid adolescent depression. *Neurosci Lett* **460**:227-31.

Czyrak A, Czepiel K, Mackowiak M, Chocyk A, Wedzony K. **2003**. Serotonin 5-HT1A receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Res* **989**:42-51.

- D -

D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, Lynch DR, Ledbetter DJ, et al. **1987**. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4322-6.

Dabrowska J, Nowak P, Brus R. **2008**. Reactivity of 5-HT(1A) receptor in adult rats after neonatal noradrenergic neurons' lesion - Implications for antidepressant-like action. *Brain Res*

Dahlstrom A, Fuxe K. **1964**. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**:398-9.

Dalva MB, Katz LC. **1994**. Rearrangements of synaptic connections in visual cortex revealed by laser photostimulation. *Science* **265**:255-8.

Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, et al. **2005**. Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:12560-5.

Dantzker JL, Callaway EM. **2000**. Laminar sources of synaptic input to cortical inhibitory interneurons and pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **3**:701-7.

Davis GW, Goodman CS. **1998**. Synapse-specific control of synaptic efficacy at the terminals of a single neuron. *Nature* **392**:82-6.

Davis GW. **2006**. Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* **29**:307-23.

Daw NW, Fox K, Sato H, Czepita D. **1992**. Critical period for monocular deprivation in the cat visual cortex. *J Neurophysiol* **67**:197-202.

de Almeida J, Mengod G. **2007**. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT(2A) receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J Neurochem* **103**:475-86.

de Lima AD, Bloom FE, Morrison JH. **1988**. Synaptic organization of serotonin-immunoreactive fibers in primary visual cortex of the macaque monkey. *J Comp Neurol* **274**:280-94.

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**:117-33.

DeFelipe J, Farinas I. **1992**. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* **39**:563-607.

DeFelipe J. **1997**. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* **14**:1-19.

DeFelipe J. **1999**. Chandelier cells and epilepsy. *Brain* **122 (Pt 10)**:1807-22.

DeFelipe J. **2002**. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* **136**:215-38.

DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. **2002**. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* **31**:299-316.

Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG. **1999**. Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **2**:515-20.

Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, Turrigiano GG. **2002**. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat Neurosci* **5**:783-9.

Descarries L, Beaudet A, Watkins KC. **1975**. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* **100**:563-88.

Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A. **1982**. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* **207**:239-54.

Descarries L, Mechawar N. **2000**. Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* **125**:27-47.

Destexhe A, Pare D. **1999**. Impact of network activity on the integrative properties of neocortical pyramidal neurons in vivo. *J Neurophysiol* **81**:1531-47.

Di Filippo M, Tozzi A, Costa C, Belcastro V, Tantucci M, et al. **2008**. Plasticity and repair in the post-ischemic brain. *Neuropharmacology* **55**:353-62.

Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E. **2008**. Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res* **172**:45-71.

Di Pietro NC, Seamans JK. **2007**. Dopamine and serotonin interactions in the prefrontal cortex: insights on antipsychotic drugs and their mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* **40 Suppl 1**:S27-33.

Doetsch F, Hen R. **2005**. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* **15**:121-8.

Doischer D, Hosp JA, Yanagawa Y, Obata K, Jonas P, et al. **2008**. Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *J Neurosci* **28**:12956-68.

Domenici L, Harding GW, Burkhalter A. **1995**. Patterns of synaptic activity in forward and feedback pathways within rat visual cortex. *J Neurophysiol* **74**:2649-64.

Dori I, Dinopoulos A, Blue ME, Parnavelas JG. **1996**. Regional differences in the ontogeny of the serotonergic projection to the cerebral cortex. *Exp Neurol* **138**:1-14.

Doucet E, Latremoliere A, Darmon M, Hamon M, Emerit MB. **2007**. Immunolabelling of the 5-HT 3B receptor subunit in the central and peripheral nervous systems in rodents. *Eur J Neurosci* **26**:355-66.

Douglas RJ, Martin KA. **2004**. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci* **27**:419-51.

Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, et al. **2007**. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol* **34**:865-77.

Durig J, Hornung JP. **2000**. Neonatal serotonin depletion affects developing and mature mouse cortical neurons. *Neuroreport* **11**:833-7.

Durstewitz D, Seamans JK, Sejnowski TJ. **2000**. Neurocomputational models of working memory. *Nat Neurosci* **3 Suppl**:1184-91.

- E -

Edagawa Y, Saito H, Abe K. **1998a**. Serotonin inhibits the induction of long-term potentiation in rat primary visual cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **22**:983-97.

Edagawa Y, Saito H, Abe K. **1998b**. 5-HT1A receptor-mediated inhibition of long-term potentiation in rat visual cortex. *Eur J Pharmacol* **349**:221-4.

Edagawa Y, Saito H, Abe K. **2000**. The serotonin 5-HT2 receptor-phospholipase C system inhibits the induction of long-term potentiation in the rat visual cortex. *Eur J Neurosci* **12**:1391-6.

Edagawa Y, Saito H, Abe K. **2001**. Endogenous serotonin contributes to a developmental decrease in long-term potentiation in the rat visual cortex. *J Neurosci* **21**:1532-7.

Egorov AV, Hamam BN, Fransen E, Hasselmo ME, Alonso AA. **2002**. Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature* **420**:173-8.

Elston GN, Benavides-Piccione R, DeFelipe J. **2001**. The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey. *J Neurosci* **21**:RC163.

Elston GN. **2003**. Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cereb Cortex* **13**:1124-38.

Erspamer V, Asero B. **1952**. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* **169**:800-1.

Esaki T, Cook M, Shimoji K, Murphy DL, Sokoloff L, et al. **2005**. Developmental disruption of serotonin transporter function impairs cerebral responses to whisker stimulation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5582-7.

Essmann CL, Martinez E, Geiger JC, Zimmer M, Traut MH, et al. **2008**. Serine phosphorylation of ephrinB2 regulates trafficking of synaptic AMPA receptors. *Nat Neurosci*

Eysel UT, Schweigart G, Mittmann T, Eyding D, Qu Y, et al. **1999**. Reorganization in the visual cortex after retinal and cortical damage. *Restor Neurol Neurosci* **15**:153-64.

- F -

Fabre V, Boutrel B, Hanoun N, Lanfumey L, Fattaccini CM, et al. **2000**. Homeostatic regulation of serotonergic function by the serotonin transporter as revealed by nonviral gene transfer. *J Neurosci* **20**:5065-75.

Fagiolini M, Hensch TK. **2000**. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* **404**:183-6.

Fagiolini M, Katagiri H, Miyamoto H, Mori H, Grant SG, et al. **2003**. Separable features of visual cortical plasticity revealed by N-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2854-9.

Fagiolini M, Fritschy JM, Low K, Mohler H, Rudolph U, et al. **2004**. Specific GABAA circuits for visual cortical plasticity. *Science* **303**:1681-3.

Fair DA, Cohen AL, Power JD, Dosenbach NU, Church JA, et al. **2009**. Functional brain networks develop from a "local to distributed" organization. *PLoS Comput Biol* **5**:e1000381.

Fanselow EE, Richardson KA, Connors BW. **2008**. Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *J Neurophysiol* **100**:2640-52.

Farrant M, Nusser Z. **2005**. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* **6**:215-29.

Feldmeyer D, Lubke J, Silver RA, Sakmann B. **2002**. Synaptic connections between layer 4 spiny neurone-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column. *J Physiol* **538**:803-22.

Feldmeyer D, Roth A, Sakmann B. **2005**. Monosynaptic connections between pairs of spiny stellate cells in layer 4 and pyramidal cells in layer 5A indicate that lemniscal and paralemniscal afferent pathways converge in the infragranular somatosensory cortex. *J Neurosci* **25**:3423-31.

Feldmeyer D, Lubke J, Sakmann B. **2006**. Efficacy and connectivity of intracolumnar pairs of layer 2/3 pyramidal cells in the barrel cortex of juvenile rats. *J Physiol* **575**:583-602.

Férézou I, Cauli B, Hill EL, Rossier J, Hamel E, et al. **2002**. 5-HT3 receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J Neurosci* **22**:7389-97.

Férézou I, Haiss F, Gentet LJ, Aronoff R, Weber B, et al. **2007**. Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* **56**:907-23.

Férézou I. **2008**. [How many neurons for behavioral response in live animals?]. *Med Sci (Paris)* **24**:802-4.

Flames N, Marin O. **2005**. Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron* **46**:377-81.

Fletcher S, Barnes NM. **1998**. Desperately seeking subunits: are native 5-HT3 receptors really homomeric complexes? *Trends Pharmacol Sci* **19**:212-5.

Fox K. **1992**. A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J Neurosci* **12**:1826-38.

Fregnac Y, Shulz D, Thorpe S, Bienenstock E. **1988**. A cellular analogue of visual cortical plasticity. *Nature* **333**:367-70.

Fregnac Y, Shulz DE. **1999**. Activity-dependent regulation of receptive field properties of cat area 17 by supervised Hebbian learning. *J Neurobiol* **41**:69-82.

Fregnac Y, Monier C, Chavane F, Baudot P, Graham L. **2003**. Shunting inhibition, a silent step in visual cortical computation. *J Physiol Paris* **97**:441-51.

Freund TF. **1992**. GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl* **7**:79-91.

Freund TF. **2003**. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* **26**:489-95.

Freund TF, Katona I. **2007**. Perisomatic inhibition. *Neuron* **56**:33-42.

Frick A, Feldmeyer D, Sakmann B. **2007**. Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. *J Physiol* **585**:103-16.

Frick A, Feldmeyer D, Helmstaedter M, Sakmann B. **2008**. Monosynaptic connections between pairs of L5A pyramidal neurons in columns of juvenile rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* **18**:397-406.

Froemke RC, Dan Y. **2002**. Spike-timing-dependent synaptic modification induced by natural spike trains. *Nature* **416**:433-8.

Froes MM, Correia AH, Garcia-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, et al. **1999**. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7541-6.

Fujisawa S, Amarasingham A, Harrison MT, Buzsaki G. **2008**. Behavior-dependent short-term assembly dynamics in the medial prefrontal cortex. *Nat Neurosci* **11**:823-33.

Fukuda T. **2007**. Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *Neuroscientist* **13**:199-207.

Furmanski CS, Schluppeck D, Engel SA. **2004**. Learning strengthens the response of primary visual cortex to simple patterns. *Curr Biol* **14**:573-8.

- G -

Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M. **2005**. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron* **48**:315-27.

Galarreta M, Hestrin S. **1999**. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* **402**:72-5.

Galarreta M, Hestrin S. **2001a**. Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* **292**:2295-9.

Galarreta M, Hestrin S. **2001b**. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci* **2**:425-33.

Gao WJ, Wang Y, Goldman-Rakic PS. **2003**. Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* **23**:1622-30.

Garcia EE, Smith RL, Sanders-Bush E. **2007**. Role of G(q) protein in behavioral effects of the hallucinogenic drug 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane. *Neuropharmacology* **52**:1671-7.

Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, et al. **1998**. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **65**:446-53.

Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. **2003**. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* **4**:1002-12.

Gasparini S, Magee JC. **2002**. Phosphorylation-dependent differences in the activation properties of distal and proximal dendritic Na+ channels in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol* **541**:665-72.

Gasparini S, Magee JC. **2006**. State-dependent dendritic computation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **26**:2088-100.

Gavrikov KE, Nilson JE, Dmitriev AV, Zucker CL, Mangel SC. **2006**. Dendritic compartmentalization of chloride cotransporters underlies directional responses of starburst amacrine cells in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:18793-8.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, et al. **2006**. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* **439**:589-93.

Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H. **2007**. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* **30**:1-8.

Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, et al. **2000**. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* **20**:4217-25.

Gibson JR, Beierlein M, Connors BW. **1999**. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* **402**:75-9.

Gilbert CD. **1993**. Circuitry, architecture, and functional dynamics of visual cortex. *Cereb Cortex* **3**:373-86.

Gillessen T, Alzheimer C. **1997**. Amplification of EPSPs by low Ni(2+)- and amiloride-sensitive Ca2+ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **77**:1639-43.

Gingrich JA, Ansorge MS, Merker R, Weisstaub N, Zhou M. **2003**. New lessons from knockout mice: The role of serotonin during development and its possible contribution to the origins of neuropsychiatric disorders. *CNS Spectr* **8**:572-7.

Goldberg J, Holthoff K, Yuste R. **2002**. A problem with Hebb and local spikes. *Trends Neurosci* **25**:433-5.

Goldberg JH, Tamas G, Yuste R. **2003**. Ca2+ imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: Ia-type K+ channels control action potential backpropagation. *J Physiol* **551**:49-65.

Golding NL, Staff NP, Spruston N. **2002**. Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation. *Nature* **418**:326-31.

Goldman-Rakic PS. **1995**. Cellular basis of working memory. *Neuron* **14**:477-85.

Gomez-Lira G, Lamas M, Romo-Parra H, Gutierrez R. **2005**. Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci* **25**:6939-46.

Gonchar Y, Burkhalter A. **1997**. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* **7**:347-58.

Gonchar Y, Burkhalter A. **1999a**. Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. *Cereb Cortex* **9**:683-96.

Gonchar Y, Burkhalter A. **1999b**. Differential subcellular localization of forward and feedback interareal inputs to parvalbumin expressing GABAergic neurons in rat visual cortex. *J Comp Neurol* **406**:346-60.

Gonchar Y, Burkhalter A. **2003**. Distinct GABAergic targets of feedforward and feedback connections between lower and higher areas of rat visual cortex. *J Neurosci* **23**:10904-12.

Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. **2008**. GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* **34**:944-61.

Gonzalez-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, et al. **2007**. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron* **53**:439-52.

Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaidya VA, Lambe EK. **2009**. Layer II/III of the prefrontal cortex: Inhibition by the serotonin 5-HT1A receptor in development and stress. *J Neurosci* **29**:10094-103.

Gordon U, Polsky A, Schiller J. **2006**. Plasticity compartments in basal dendrites of neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* **26**:12717-26.

Gorwood P, Batel P, Ades J, Hamon M, Boni C. **2000**. Serotonin transporter gene polymorphisms, alcoholism, and suicidal behavior. *Biol Psychiatry* **48**:259-64.

Gorwood P, Lanfumey L, Hamon M. **2004**. [Alcohol dependence and polymorphisms of serotonin-related genes]. *Med Sci (Paris)* **20**:1132-8.

Greicius MD, Flores BH, Menon V, Glover GH, Solvason HB, et al. **2007**. Resting-state functional connectivity in major depression: abnormally increased contributions from subgenual cingulate cortex and thalamus. *Biol Psychiatry* **62**:429-37.

Groh A, Meyer HS, Schmidt EF, Heintz N, Sakmann B, et al. **2009**. Cell-Type Specific Properties of Pyramidal Neurons in Neocortex Underlying a Layout that Is Modifiable Depending on the Cortical Area. *Cereb Cortex*

Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, et al. **2002**. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* **416**:396-400.

Gu Q, Singer W. **1995**. Involvement of serotonin in developmental plasticity of kitten visual cortex. *Eur J Neurosci* **7**:1146-53.

Gu Q. **2002**. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* **111**:815-35.

Guan S, Chen M, Woodley D, Li W. **2007**. Nckbeta adapter controls neuritogenesis by maintaining the cellular paxillin level. *Mol Cell Biol* **27**:6001-11.

Gupta A, Wang Y, Markram H. **2000**. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* **287**:273-8.

- H -

Hagmann P, Cammoun L, Gigandet X, Meuli R, Honey CJ, et al. **2008**. Mapping the structural core of human cerebral cortex. *PLoS Biol* **6**:e159.

Hahnloser RH, Douglas RJ, Hepp K. **2002**. Attentional recruitment of inter-areal recurrent networks for selective gain control. *Neural Comput* **14**:1669-89.

Haider B, McCormick DA. **2009**. Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron* **62**:171-89.

Hallman LE, Schofield BR, Lin CS. **1988**. Dendritic morphology and axon collaterals of corticotectal, corticopontine, and callosal neurons in layer V of primary visual cortex of the hooded rat. *J Comp Neurol* **272**:149-60.

Hamon M. **1995**. [New perspectives in the serotoninergic treatment for depression]. *Therapie* **50**:505-9.

Hartwich K, Pollak T, Klausberger T. **2009**. Distinct firing patterns of identified basket and dendrite-targeting interneurons in the prefrontal cortex during hippocampal theta and local spindle oscillations. *J Neurosci* **29**:9563-74.

Hausser M, Spruston N, Stuart GJ. **2000**. Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science* **290**:739-44.

Hausser M. **2001**. Synaptic function: dendritic democracy. *Curr Biol* **11**:R10-2.

Hausser M, Mel B. **2003**. Dendrites: bug or feature? *Curr Opin Neurobiol* **13**:372-83.

He BJ, Shulman GL, Snyder AZ, Corbetta M. **2007**. The role of impaired neuronal communication in neurological disorders. *Curr Opin Neurol* **20**:655-60.

Hebb DO. **1949**. Temperament in chimpanzees; method of analysis. *J Comp Physiol Psychol* **42**:192-206.

Hedlund PB, Sutcliffe JG. **2004**. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. *Trends Pharmacol Sci* **25**:481-6.

Helmstaedter M, de Kock CP, Feldmeyer D, Bruno RM, Sakmann B. **2007**. Reconstruction of an average cortical column in silico. *Brain Res Rev* **55**:193-203.

Helmstaedter M, Staiger JF, Sakmann B, Feldmeyer D. **2008**. Efficient recruitment of layer 2/3 interneurons by layer 4 input in single columns of rat somatosensory cortex. *J Neurosci* **28**:8273-84.

Helmstaedter M, Sakmann B, Feldmeyer D. **2009a**. The relation between dendritic geometry, electrical excitability, and axonal projections of L2/3 Interneurons in rat barrel cortex. *Cereb Cortex* **19**:938-50.

Helmstaedter M, Sakmann B, Feldmeyer D. **2009b**. Neuronal correlates of local, lateral, and translaminar inhibition with reference to cortical columns. *Cereb Cortex* **19**:926-37.

Henderson JM, Federici T, Boulis N. **2009**. Optogenetic neuromodulation. *Neurosurgery* **64**:796-804; discussion

Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, et al. **1998**. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* **282**:1504-8.

Hensch TK, Stryker MP. **2004**. Columnar architecture sculpted by GABA circuits in developing cat visual cortex. *Science* **303**:1678-81.

Hensch TK. **2005**. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**:877-88.

Hensch TK, Fagiolini M. **2005**. Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog Brain Res* **147**:115-24.

Hensler JG. **2002**. Differential regulation of 5-HT1A receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology* **26**:565-73.

Hensler JG. **2003**. Regulation of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. *Life Sci* **72**:1665-82.

Hensler JG. **2006**. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev* **30**:203-14.

Hestrin S, Galarreta M. **2005**. Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* **28**:304-9.

Hiesinger PR, Fayyazuddin A, Mehta SQ, Rosenmund T, Schulze KL, et al. **2005**. The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in Drosophila. *Cell* **121**:607-20.

Higley MJ, Contreras D. **2005**. Integration of synaptic responses to neighboring whiskers in rat barrel cortex in vivo. *J Neurophysiol* **93**:1920-34.

Hing H, Xiao J, Harden N, Lim L, Zipursky SL. **1999**. Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in Drosophila. *Cell* **97**:853-63.

Hirata A, Castro-Alamancos MA. **2008**. Cortical transformation of wide-field (multiwhisker) sensory responses. *J Neurophysiol* **100**:358-70.

Hirsch JA, Martinez LM, Alonso JM, Desai K, Pillai C, et al. **2002**. Synaptic physiology of the flow of information in the cat's visual cortex in vivo. *J Physiol* **540**:335-50.

Hirsch JA, Martinez LM, Pillai C, Alonso JM, Wang Q, et al. **2003**. Functionally distinct inhibitory neurons at the first stage of visual cortical processing. *Nat Neurosci* **6**:1300-8.

Hirsch JA, Martinez LM. **2006a**. Circuits that build visual cortical receptive fields. *Trends Neurosci* **29**:30-9.

Hirsch JA, Martinez LM. **2006b**. Laminar processing in the visual cortical column. *Curr Opin Neurobiol* **16**:377-84.

Hishida R, Kamatani D, Kitaura H, Kudoh M, Shibuki K. **2007**. Functional local connections with differential activity-dependence and critical periods surrounding the primary auditory cortex in rat cerebral slices. *Neuroimage* **34**:679-93.

Hodges MR, Wehner M, Aungst J, Smith JC, Richerson GB. **2009**. Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *J Neurosci* **29**:10341-9.

Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hubener M. **2009**. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature* **457**:313-7.

Hoffman BJ, Hansson SR, Mezey E, Palkovits M. **1998**. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front Neuroendocrinol* **19**:187-231.

Hopper RA, Garthwaite J. **2006**. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **26**:11513-21.

Hornung JP, Fritschy JM, Tork I. **1990**. Distribution of two morphologically distinct subsets of serotoninergic axons in the cerebral cortex of the marmoset. *J Comp Neurol* **297**:165-81.

Hornung JP. **2003**. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* **26**:331-43.

Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C. **2008**. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* **28**:5207-17.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. **2002**. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**:533-54.

Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, et al. **1999**. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* **98**:739-55.

Hubel DH, Wiesel TN. **1962**. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* **160**:106-54.

Hubel DH, Wiesel TN. **1963**. Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. *J Physiol* **165**:559-68.

Hubel DH, Wiesel TN. **1970**. Stereoscopic vision in macaque monkey. Cells sensitive to binocular depth in area 18 of the macaque monkey cortex. *Nature* **225**:41-2.

Huber D, Petreanu L, Ghitani N, Ranade S, Hromadka T, et al. **2008**. Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* **451**:61-4.

Huberman AD, Feller MB, Chapman B. **2008**. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci* **31**:479-509.

Huggenberger S, Vater M, Deisz RA. **2009**. Interlaminar differences of intrinsic properties of pyramidal neurons in the auditory cortex of mice. *Cereb Cortex* **19**:1008-18.

Hyde KL, Lerch J, Norton A, Forgeard M, Winner E, et al. **2009**. Musical training shapes structural brain development. *J Neurosci* **29**:3019-25.

- I -

Isaac JT, Ashby M, McBain CJ. **2007**. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* **54**:859-71.

- J -

Jacobs BL, Gannon PJ, Azmitia EC. **1984**. Atlas of serotonergic cell bodies in the cat brainstem: an immunocytochemical analysis. *Brain Res Bull* **13**:1-31.

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

Jahn R, Scheller RH. **2006**. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:631-43.

Jakab RL, Goldman-Rakic PS. **1998**. 5-Hydroxytryptamine2A 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 U S A* **95**:735-40.

Jakab RL, Goldman-Rakic PS. **2000**. Segregation of serotonin 5-HT2A and 5-HT3 receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *J Comp Neurol* **417**:337-48.

Jansson A, Tinner B, Bancila M, Verge D, Steinbusch HW, et al. **2001**. Relationships of 5-hydroxytryptamine immunoreactive terminal-like varicosities to 5-hydroxytryptamine-2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the rat forebrain. *J Chem Neuroanat* **22**:185-203.

Jarsky T, Roxin A, Kath WL, Spruston N. **2005**. Conditional dendritic spike propagation following distal synaptic activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **8**:1667-76.

Jennings KA, Loder MK, Sheward WJ, Pei Q, Deacon RM, et al. **2006**. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci* **26**:8955-64.

Ji SP, Zhang Y, Van Cleemput J, Jiang W, Liao M, et al. **2006**. Disruption of PTEN coupling with 5-HT2C receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse. *Nat Med* **12**:324-9.

Ji W, Suga N. **2007**. Serotonergic modulation of plasticity of the auditory cortex elicited by fear conditioning. *J Neurosci* **27**:4910-8.

Jiang B, Huang ZJ, Morales B, Kirkwood A. **2005**. Maturation of GABAergic transmission and the timing of plasticity in visual cortex. *Brain Res Brain Res Rev* **50**:126-33.

Jones BJ, Blackburn TP. **2002**. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* **71**:555-68.

Jones EG. **1975**. Lamination and differential distribution of thalamic afferents within the sensory-motor cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* **160**:167-203.

Joubert L, Hanson B, Barthet G, Sebben M, Claeysen S, et al. **2004**. New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically interact with the 5-HT4a receptor splice variant: roles in receptor targeting. *J Cell Sci* **117**:5367-79.

- K -

Kampa BM, Letzkus JJ, Stuart GJ. **2006**. Cortical feed-forward networks for binding different streams of sensory information. *Nat Neurosci* **9**:1472-3.

Kampa BM, Letzkus JJ, Stuart GJ. **2007**. Dendritic mechanisms controlling spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **30**:456-63.

Kasper S, Hamon M. **2009**. Beyond the monoaminergic hypothesis: agomelatine, a new antidepressant with an innovative mechanism of action. *World J Biol Psychiatry* **10**:117-26.

Katagiri H, Fagiolini M, Hensch TK. **2007**. Optimization of somatic inhibition at critical period onset in mouse visual cortex. *Neuron* **53**:805-12.

Katz LC, Shatz CJ. **1996**. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* **274**:1133-8.

Katz LC, Crowley JC. **2002**. Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci* **3**:34-42.

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**:277-87.

Kawaguchi Y, Kubota Y. **1997**. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* **7**:476-86.

Kemp A, Manahan-Vaughan D. **2005**. The 5-hydroxytryptamine4 receptor exhibits frequency-dependent properties in synaptic plasticity and behavioural metaplasticity in the hippocampal CA1 region in vivo. *Cereb Cortex* **15**:1037-43.

Kerr JN, Greenberg D, Helmchen F. **2005**. Imaging input and output of neocortical networks in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:14063-8.

Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Verge D. **1996**. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine1A receptors in the rat brain. *J Neurosci Res* **46**:697-708.

Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG. **2003**. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* **116**:669-83.

Kirkwood A, Lee HK, Bear MF. **1995**. Co-regulation of long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in visual cortex by age and experience. *Nature* **375**:328-31.

Kirkwood A, Rozas C, Kirkwood J, Perez F, Bear MF. **1999**. Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *J Neurosci* **19**:1599-609.

Kirsch I, Deacon BJ, Huedo-Medina TB, Scoboria A, Moore TJ, et al. **2008**. Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. *PLoS Med* **5**:e45.

Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D. **2001**. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Brain Res Rev* **36**:175-84.

Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. **2002**. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* **34**:265-73.

Koch C, Douglas R, Wehmeier U. **1990**. Visibility of synaptically induced conductance changes: theory and simulations of anatomically characterized cortical pyramidal cells. *J Neurosci* **10**:1728-44.

Kocsis B, Varga V, Dahan L, Sik A. **2006**. Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1059-64.

Kojic L, Gu Q, Douglas RM, Cynader MS. **1997**. Serotonin facilitates synaptic plasticity in kitten visual cortex: an in vitro study. *Brain Res Dev Brain Res* **101**:299-304.

Kojic L, Dyck RH, Gu Q, Douglas RM, Matsubara J, et al. **2000**. Columnar distribution of serotonin-dependent plasticity within kitten striate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1841-4.

Kojic L, Gu Q, Douglas RM, Cynader MS. **2001**. Laminar distribution of cholinergic- and serotonergic-dependent plasticity within kitten visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res* **126**:157-62.

Kole MH, Hallermann S, Stuart GJ. **2006**. Single Ih channels in pyramidal neuron dendrites: properties, distribution, and impact on action potential output. *J Neurosci* **26**:1677-87.

Kolluri N, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. **2005**. Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* **162**:1200-2.

Korngreen A, Sakmann B. **2000**. Voltage-gated K+ channels in layer 5 neocortical pyramidal neurones from young rats: subtypes and gradients. *J Physiol* **525 Pt 3**:621-39.

Kosofsky BE, Molliver ME. **1987**. The serotoninergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* **1**:153-68.

Kreis P, Thevenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, et al. **2007**. The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**:21497-506.

Kreiss DS, Lucki I. **1995**. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **274**:866-76.

Krieger P, Kuner T, Sakmann B. **2007**. Synaptic connections between layer 5B pyramidal neurons in mouse somatosensory cortex are independent of apical dendrite bundling. *J Neurosci* **27**:11473-82.

Kullmann DM, Lamsa KP. **2007**. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* **8**:687-99.

Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, et al. **2005**. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol* **87**:33-46.

Kvachnina E, Liu G, Dityatev A, Renner U, Dumuis A, et al. **2005**. 5-HT7 receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J Neurosci* **25**:7821-30.

- L -

Laaris N, Le Poul E, Laporte AM, Hamon M, Lanfumey L. **1999**. Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* **91**:947-58.

LaBerge D. **2005**. Sustained attention and apical dendrite activity in recurrent circuits. *Brain Res Brain Res Rev* **50**:86-99.

LaBerge D. **2006**. Apical dendrite activity in cognition and consciousness. *Conscious Cogn* **15**:235-57.

Laberge D, Kasevich R. **2007**. The apical dendrite theory of consciousness. *Neural Netw* **20**:1004-20.

Lai HC, Jan LY. **2006**. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* **7**:548-62.

Lanfumey L, Hamon M. **2000**. Central 5-HT(1A) receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol* **27**:429-35.

Lanfumey L, Hamon M. **2004**. 5-HT1 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**:1-10.

Lanfumey L, Hamon M. **2005**. [Neurobiology of depression: new data]. *Therapie* **60**:431-40.

Larkman A, Mason A. **1990**. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. *J Neurosci* **10**:1407-14.

Larkum ME, Zhu JJ, Sakmann B. **1999a**. A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* **398**:338-41.

Larkum ME, Kaiser KM, Sakmann B. **1999b**. Calcium electrogenesis in distal apical dendrites of layer 5 pyramidal cells at a critical frequency of back-propagating action potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14600-4.

Larkum ME, Zhu JJ, Sakmann B. **2001**. Dendritic mechanisms underlying the coupling of the dendritic with the axonal action potential initiation zone of adult rat layer 5 pyramidal neurons. *J Physiol* **533**:447-66.

Larkum ME, Senn W, Luscher HR. **2004**. Top-down dendritic input increases the gain of layer 5 pyramidal neurons. *Cereb Cortex* **14**:1059-70.

Larkum ME, Waters J, Sakmann B, Helmchen F. **2007**. Dendritic spikes in apical dendrites of neocortical layer 2/3 pyramidal neurons. *J Neurosci* **27**:8999-9008.

Larkum ME, Nevian T. **2008**. Synaptic clustering by dendritic signalling mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* **18**:321-31.

Larkum ME, Nevian T, Sandler M, Polsky A, Schiller J. **2009**. Synaptic integration in tuft dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a new unifying principle. *Science* **325**:756-60.

Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, et al. **2000**. Differential adaptation of brain 5-HT1A and 5-HT1B receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* **39**:110-22.

Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P. **2006**. Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* **24**:3507-18.

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Fossier P. **2007**. Involvement of NR2A- or NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage. *Eur J Neurosci* **26**:289-301.

Le Roux N, Amar M, Fossier P. **2008a**. [Acquiring new information in a neuronal network: from Hebb's concept to homeostatic plasticity]. *J Soc Biol* **202**:143-60.

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Baux G, Fossier P. **2008b**. Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks. *Eur J Neurosci* **27**:3244-56.

Le Roux N, Amar M, Moreau AW, Fossier P. **2009**. Roles of nitric oxide in the homeostatic control of the excitation-inhibition balance in rat visual cortical networks. *Neuroscience* **163**:942-51.

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, et al. **2007**. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**:168-76.

Lesch KP, Gutknecht L. **2005**. Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**:1062-73.

Lesch KP, Mossner R. **2006**. Inactivation of 5HT transport in mice: modeling altered 5HT homeostasis implicated in emotional dysfunction, affective disorders, and somatic syndromes. *Handb Exp Pharmacol*:417-56.

Letinic K, Zoncu R, Rakic P. **2002**. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* **417**:645-9.

Leventhal AG, Wang Y, Pu M, Zhou Y, Ma Y. **2003**. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* **300**:812-5.

Levine ES, Jacobs BL. **1992a**. Microiontophoresis and single-unit recordings of serotonergic neurons in the awake cat. *J Chem Neuroanat* **5**:335-7.

Levine ES, Jacobs BL. **1992b**. Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat. *J Neurosci* **12**:4037-44.

Levitan IB. **1994**. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu Rev Physiol* **56**:193-212.

Lewis DA. **2000**. GABAergic local circuit neurons and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* **31**:270-6.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. **2005**. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **6**:312-24.

Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. **2008**. Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **33**:141-65.

Lewis TL, Maurer D. **2005**. Multiple sensitive periods in human visual development: evidence from visually deprived children. *Dev Psychobiol* **46**:163-83.

Lidov HG, Grzanna R, Molliver ME. **1980**. The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat--an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **5**:207-27.

Liegeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M. **2006**. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in Caenorhabditis elegans. *J Cell Biol* **173**:949-61.

Liu G. **2004**. Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat Neurosci* **7**:373-9.

Liu R, Jolas T, Aghajanian G. **2000**. Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* **873**:34-45.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. **2006**. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* **7**:179-93.

Lledo PM. **2009**. Dissecting the pathophysiology of depression with a Swiss army knife. *Neuron* **62**:453-5.

Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra PP. **1999**. Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15222-7.

London M, Hausser M. **2005**. Dendritic computation. *Annu Rev Neurosci* **28**:503-32.

Lopez-Gimenez JF, Vilaro MT, Milligan G. **2008**. Morphine desensitization, internalization, and down-regulation of the mu opioid receptor is facilitated by serotonin 5-hydroxytryptamine2A receptor coactivation. *Mol Pharmacol* **74**:1278-91.

Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, et al. **2008**. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* **1148**:86-94.

Lucas-Meunier E, Monier C, Amar M, Baux G, Fregnac Y, et al. **2009**. Involvement of nicotinic and muscarinic receptors in the endogenous cholinergic modulation of the balance between excitation and inhibition in the young rat visual cortex. *Cereb Cortex* **19**:2411-27.

Lucas G, Compan V, Charnay Y, Neve RL, Nestler EJ, et al. **2005**. Frontocortical 5-HT4 receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT4 agonists. *Biol Psychiatry* **57**:918-25.

Luo X, Persico AM, Lauder JM. **2003**. Serotonergic regulation of somatosensory cortical development: lessons from genetic mouse models. *Dev Neurosci* **25**:173-83.

- M -

Ma L, Shalinsky MH, Alonso A, Dickson CT. **2007**. Effects of serotonin on the intrinsic membrane properties of layer II medial entorhinal cortex neurons. *Hippocampus* **17**:114-29.

Maertens M, Pollmann S. **2005**. fMRI reveals a common neural substrate of illusory and real contours in V1 after perceptual learning. *J Cogn Neurosci* **17**:1553-64.

Maffei A, Nelson SB, Turrigiano GG. **2004**. Selective reconfiguration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation. *Nat Neurosci* **7**:1353-9.

Maffei A, Nataraj K, Nelson SB, Turrigiano GG. **2006**. Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. *Nature* **443**:81-4.

Magee JC. **1998**. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **18**:7613-24.

Mainen ZF, Sejnowski TJ. **1996**. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* **382**:363-6.

Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L. **2006**. Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol* **70**:1013-21.

Marder E, Prinz AA. **2002**. Modeling stability in neuron and network function: the role of activity in homeostasis. *Bioessays* **24**:1145-54.

Marek KW, Davis GW. **2002**. Transgenically encoded protein photoinactivation (FlAsH-FALI): acute inactivation of synaptotagmin I. *Neuron* **36**:805-13.

Marino J, Schummers J, Lyon DC, Schwabe L, Beck O, et al. **2005**. Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. *Nat Neurosci* **8**:194-201.

Markram H, Lubke J, Frotscher M, Sakmann B. **1997**. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* **275**:213-5.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, et al. **2004**. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**:793-807.

Markram H. **2008**. Fixing the location and dimensions of functional neocortical columns. *HFSP J* **2**:132-5.

Martin-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, et al. **2001**. Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* **21**:9856-66.

Martinez LM, Alonso JM, Reid RC, Hirsch JA. **2002**. Laminar processing of stimulus orientation in cat visual cortex. *J Physiol* **540**:321-33.

Martinez LM, Wang Q, Reid RC, Pillai C, Alonso JM, et al. **2005**. Receptive field structure varies with layer in the primary visual cortex. *Nat Neurosci* **8**:372-9.

Mason A, Larkman A. **1990**. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J Neurosci* **10**:1415-28.

Matsukawa M, Nakadate K, Ishihara I, Okado N. **2003**. Synaptic loss following depletion of noradrenaline and/or serotonin in the rat visual cortex: a quantitative electron microscopic study. *Neuroscience* **122**:627-35.

Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, et al. **2008**. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* **320**:385-8.

McBain CJ, Fisahn A. **2001**. Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* **2**:11-23.

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.

McCormick DA. **1989**. GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* **62**:1018-27.

McGinty DJ, Harper RM. **1976**. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* **101**:569-75.

Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI. **2001**. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* **102**:527-40.

Meltzer LA, Yabaluri R, Deisseroth K. **2005**. A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. *Trends Neurosci* **28**:653-60.

Meneses A. **2007**. Stimulation of 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A/2C, 5-HT3 and 5-HT4 receptors or 5-HT uptake inhibition: short- and long-term memory. *Behav Brain Res* **184**:81-90.

Meng J, Meng Y, Hanna A, Janus C, Jia Z. **2005**. Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci* **25**:6641-50.

Mercer A, Bannister AP, Thomson AM. **2006**. Electrical coupling between pyramidal cells in adult cortical regions. *Brain Cell Biol* **35**:13-27.

Migliore M, Shepherd GM. **2002**. Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat Rev Neurosci* **3**:362-70.

Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. **1996**. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* **16**:815-23.

Millan MJ, Marin P, Bockaert J, la Cour CM. **2008**. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci* **29**:454-64.

Miner LA, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Sesack SR. **2003**. Ultrastructural localization of serotonin2A receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. *Neuroscience* **116**:107-17.

Mitchell SJ, Silver RA. **2003**. Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. *Neuron* **38**:433-45.

Miyamoto H, Katagiri H, Hensch T. **2003**. Experience-dependent slow-wave sleep development. *Nat Neurosci* **6**:553-4.

Mnie-Filali O, El Mansari M, Espana A, Sanchez C, Haddjeri N. **2006**. Allosteric modulation of the effects of the 5-HT reuptake inhibitor escitalopram on the rat hippocampal synaptic plasticity. *Neurosci Lett* **395**:23-7.

Mody I, Pearce RA. **2004**. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* **27**:569-75.

Mody I. **2005**. Aspects of the homeostaic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. *J Physiol* **562**:37-46.

Molliver ME. **1987**. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol* **7**:3S-23S.

Molnar Z, Cheung AF. **2006**. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res* **55**:105-15.

Monier C, Chavane F, Baudot P, Graham LJ, Fregnac Y. **2003**. Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron* **37**:663-80.

Monier C, Fournier J, Fregnac Y. **2008**. In vitro and in vivo measures of evoked excitatory and inhibitory conductance dynamics in sensory cortices. *J Neurosci Methods* **169**:323-65.

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**:251-60.

Morales M, Bloom FE. **1997**. The 5-HT3 receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J Neurosci* **17**:3157-67.

Morel N, Dunant Y, Israel M. **2001**. Neurotransmitter release through the V0 sector of V-ATPase. *J Neurochem* **79**:485-8.

Morel N. **2003**. Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H+ATPase. *Biol Cell* **95**:453-7.

Morel N, Dedieu JC, Philippe JM. **2003**. Specific sorting of the a1 isoform of the V-H+ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane. *J Cell Sci* **116**:4751-62.

Mossner R, Schmitt A, Syagailo Y, Gerlach M, Riederer P, et al. **2000**. The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*:345-50.

Moulin-Sallanon M, Charnay Y, Ginovart N, Perret P, Lanfumey L, et al. **2009**. Acute and chronic effects of citalopram on 5-HT1A receptor-labeling by [18F]MPPF and -coupling to receptors-G proteins. *Synapse* **63**:106-16.

Mountcastle VB. **1978**. Brain mechanisms for directed attention. *J R Soc Med* **71**:14-28.

Mountcastle VB. **1997**. The columnar organization of the neocortex. *Brain* **120 (Pt 4)**:701-22.

Murayama M, Perez-Garci E, Nevian T, Bock T, Senn W, et al. **2009**. Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature* **457**:1137-41.

Murphy DL, Wichems C, Li Q, Heils A. **1999**. Molecular manipulations as tools for enhancing our understanding of 5-HT neurotransmission. *Trends Pharmacol Sci* **20**:246-52.

Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. **2004**. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv* **4**:109-23.

Murphy DL, Lesch KP. **2008**. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat Rev Neurosci* **9**:85-96.

Murre JM, Sturdy DP. **1995**. The connectivity of the brain: multi-level quantitative analysis. *Biol Cybern* **73**:529-45.

- N -

Nakamura K, Hasegawa H. **2007**. Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system. *Mol Neurobiol* **35**:45-54.

Nauhaus I, Busse L, Carandini M, Ringach DL. **2009**. Stimulus contrast modulates functional connectivity in visual cortex. *Nat Neurosci* **12**:70-6.

Neher E. **1992**. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* **207**:123-31.

Nelson SB, Turrigiano GG. **2008**. Strength through diversity. *Neuron* **60**:477-82.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, et al. **2002**. Neurobiology of depression. *Neuron* **34**:13-25.

Nettleton JS, Spain WJ. **2000**. Linear to supralinear summation of AMPA-mediated EPSPs in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **83**:3310-22.

Neubauer FB, Berger T. **2008**. Somatodendritic integration under increased network activity in layer 5 pyramidal cells of the somatosensory cortex. *Pflugers Arch* **455**:1063-79.

Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M. **2001**. Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanat* **21**:63-73.

Neves G, Cooke SF, Bliss TV. **2008**. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* **9**:65-75.

Nevian T, Larkum ME, Polsky A, Schiller J. **2007**. Properties of basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a direct patch-clamp recording study. *Nat Neurosci* **10**:206-14.

Newberry NR, Footitt DR, Papanastassiou V, Reynolds DJ. **1999**. Actions of 5-HT on human neocortical neurones in vitro. *Brain Res* **833**:93-100.

Normann C, Clark K. **2005**. Selective modulation of Ca(2+) influx pathways by 5-HT regulates synaptic long-term plasticity in the hippocampus. *Brain Res* **1037**:187-93.

Nusser Z. **2009**. Variability in the subcellular distribution of ion channels increases neuronal diversity. *Trends Neurosci* **32**:267-74.

- O -

O'Shea J, Johansen-Berg H, Trief D, Gobel S, Rushworth MF. **2007**. Functionally specific reorganization in human premotor cortex. *Neuron* **54**:479-90.

Ohashi S, Matsumoto M, Togashi H, Ueno K, Yoshioka M. **2003**. The serotonergic modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway. *Neurosci Lett* **342**:179-82.

Okhotin VE. **2006**. Cytophysiology of spiny stellate cells in the striate cortex and their role in the excitatory mechanisms of intracortical synaptic circulation. *Neurosci Behav Physiol* **36**:825-36.

- P -

Palchaudhuri M, Flugge G. **2005**. 5-HT1A receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res* **321**:159-72.

Papadopoulos GC, Parnavelas JG, Buijs R. **1987a**. Monoaminergic fibers form conventional synapses in the cerebral cortex. *Neurosci Lett* **76**:275-9.

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**:883-92.

Papp EC, Hajos N, Acsady L, Freund TF. **1999**. Medial septal and median raphe innervation of vasoactive intestinal polypeptide-containing interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* **90**:369-82.

Park DC, Reuter-Lorenz P. **2009**. The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol* **60**:173-96.

Parnavelas JG, Lieberman AR, Webster KE. **1977a**. Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the rat. *J Anat* **124**:305-22.

Parnavelas JG, Sullivan K, Lieberman AR, Webster KE. **1977b**. Neurons and their synaptic organization in the visual cortex of the rat. Electron microscopy of Golgi preparations. *Cell Tissue Res* **183**:499-517.

Paspalas CD, Papadopoulos GC. **2001**. Serotoninergic afferents preferentially innervate distinct subclasses of peptidergic interneurons in the rat visual cortex. *Brain Res* **891**:158-67.

Patel TD, Zhou FC. **2005**. Ontogeny of 5-HT1A receptor expression in the developing hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* **157**:42-57.

Persico AM, Mengual E, Moessner R, Hall FS, Revay RS, et al. **2001**. Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci* **21**:6862-73.

Peters A, Kara DA. **1985a**. The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cells. *J Comp Neurol* **234**:218-41.

Peters A, Kara DA. **1985b**. The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. II. The nonpyramidal cells. *J Comp Neurol* **234**:242-63.

Peters A, Kara DA, Harriman KM. **1985**. The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. III. Numerical considerations. *J Comp Neurol* **238**:263-74.

Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M, et al. **2001**. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* **409**:581-8.

Petersen CC, Grinvald A, Sakmann B. **2003**. Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *J Neurosci* **23**:1298-309.

Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K. **2007**. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* **10**:663-8.

Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K. **2009**. The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* **457**:1142-5.

Petrini EM, Marchionni I, Zacchi P, Sieghart W, Cherubini E. **2004**. Clustering of extrasynaptic GABA(A) receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* **279**:45833-43.

Pettit DL, Augustine GJ. **2000**. Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Neurophysiol* **84**:28-38.

Petzold GC, Hagiwara A, Murthy VN. **2009**. Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nat Neurosci* **12**:784-91.

Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, et al. **2005**. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* **8**:828-34.

Pindon A, van Hecke G, van Gompel P, Lesage AS, Leysen JE, et al. **2002**. Differences in signal transduction of two 5-HT4 receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with Galphas- and Galphai/o-proteins. *Mol Pharmacol* **61**:85-96.

Poea-Guyon S, Amar M, Fossier P, Morel N. **2006**. Alternative splicing controls neuronal expression of v-ATPase subunit a1 and sorting to nerve terminals. *J Biol Chem* **281**:17164-72.

Polsky A, Mel BW, Schiller J. **2004**. Computational subunits in thin dendrites of pyramidal cells. *Nat Neurosci* **7**:621-7.

Porter JT, Johnson CK, Agmon A. **2001**. Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* **21**:2699-710.

Pouille F, Scanziani M. **2001**. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* **293**:1159-63.

Prange O, Wong TP, Gerrow K, Wang YT, El-Husseini A. **2004**. A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13915-20.

Price JL, Drevets WC. **2009**. Neurocircuitry of Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*

Priebe NJ, Ferster D. **2005**. Direction selectivity of excitation and inhibition in simple cells of the cat primary visual cortex. *Neuron* **45**:133-45.

Puig MV, Santana N, Celada P, Mengod G, Artigas F. **2004**. In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT3 receptors. *Cereb Cortex* **14**:1365-75.

Puig MV, Artigas F, Celada P. **2005**. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* **15**:1-14.

Purpura DP. **1974**. Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science* **186**:1126-8.

- Q -

Qian Y, Melikian HE, Rye DB, Levey AI, Blakely RD. **1995**. Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J Neurosci* **15**:1261-74.

- R -

Raghanti MA, Stimpson CD, Marcinkiewicz JL, Erwin JM, Hof PR, et al. **2008**. Differences in cortical serotonergic innervation among humans, chimpanzees, and macaque monkeys: a comparative study. *Cereb Cortex* **18**:584-97.

Rakic P, Bourgeois JP, Eckenhoff MF, Zecevic N, Goldman-Rakic PS. **1986**. Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science* **232**:232-5.

Rall W. **1962**. Theory of physiological properties of dendrites. *Ann N Y Acad Sci* **96**:1071-92.

Rall W. **1967**. Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different soma-dendritic distributions of synaptic input. *J Neurophysiol* **30**:1138-68.

Ranade SP, Mainen ZF. **2009**. Transient firing of dorsal raphe neurons encodes diverse and specific sensory, motor and reward events. *J Neurophysiol*

Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, et al. **2001**. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* **92**:179-212.

Rebsam A, Seif I, Gaspar P. **2002**. Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J Neurosci* **22**:8541-52.

Ren JQ, Aika Y, Heizmann CW, Kosaka T. **1992**. Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp Brain Res* **92**:1-14.

Reyes A. **2001**. Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci* **24**:653-75.

Rhodes PA, Llinas RR. **2001**. Apical tuft input efficacy in layer 5 pyramidal cells from rat visual cortex. *J Physiol* **536**:167-87.

Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, et al. **2000**. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* **417**:181-94.

Riddle D, Richards A, Zsuppan F, Purves D. **1992**. Growth of the rat somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *J Neurosci* **12**:3509-24.

Rinaldi T, Silberberg G, Markram H. **2008**. Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb Cortex* **18**:763-70.

Rippon G, Brock J, Brown C, Boucher J. **2007**. Disordered connectivity in the autistic brain: challenges for the "new psychophysiology". *Int J Psychophysiol* **63**:164-72.

Rockel AJ, Hiorns RW, Powell TP. **1980**. The basic uniformity in structure of the neocortex. *Brain* **103**:221-44.

Rockland KS, Drash GW. **1996**. Collateralized divergent feedback connections that target multiple cortical areas. *J Comp Neurol* **373**:529-48.

Rockland KS. **1998**. Complex microstructures of sensory cortical connections. *Curr Opin Neurobiol* **8**:545-51.

Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. **2003**. Elimination of serotonergic cells induces a marked increase in generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors. *Eur J Neurosci* **18**:2166-74.

Rossi DV, Burke TF, Hensler JG. **2008**. Differential regulation of serotonin-1A receptor-stimulated [35S]GTP gamma S binding in the dorsal raphe nucleus by citalopram and escitalopram. *Eur J Pharmacol* **583**:103-7.

Roth BL, Xia Z. **2004**. Molecular and cellular mechanisms for the polarized sorting of serotonin receptors: relevance for genesis and treatment of psychosis. *Crit Rev Neurobiol* **16**:229-36.

Rubenstein JL, Merzenich MM. **2003**. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* **2**:255-67.

Rudolph M, Pelletier JG, Pare D, Destexhe A. **2005**. Characterization of synaptic conductances and integrative properties during electrically induced EEG-activated states in neocortical neurons in vivo. *J Neurophysiol* **94**:2805-21.

- S -

Saghatelyan AK, Dityatev A, Schmidt S, Schuster T, Bartsch U, et al. **2001**. Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci* **17**:226-40.

Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, et al. **2007**. Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci* **10**:679-81.

Salichon N, Gaspar P, Upton AL, Picaud S, Hanoun N, et al. **2001**. Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. *J Neurosci* **21**:884-96.

Sanchez-Vives MV, McCormick DA. **2000**. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* **3**:1027-34.

Sandler VM, Ross WN. **1999**. Serotonin modulates spike backpropagation and associated [Ca2+]i changes in the apical dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **81**:216-24.

Sanes JR, Lichtman JW. **1999**. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* **22**:389-442.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. **2004**. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **14**:1100-9.

Sarid L, Bruno R, Sakmann B, Segev I, Feldmeyer D. **2007**. Modeling a layer 4-to-layer 2/3 module of a single column in rat neocortex: interweaving in vitro and in vivo experimental observations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16353-8.

Savitz J, Lucki I, Drevets WC. **2009**. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* **88**:17-31.

Schaefer AT, Helmstaedter M, Schmitt AC, Bar-Yehuda D, Almog M, et al. **2007**. Dendritic voltage-gated K+ conductance gradient in pyramidal neurones of neocortical layer 5B from rats. *J Physiol* **579**:737-52.

Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B. **1997**. Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* **505 (Pt 3)**:605-16.

Schiller J, Major G, Koester HJ, Schiller Y. **2000**. NMDA spikes in basal dendrites of cortical pyramidal neurons. *Nature* **404**:285-9.

Schmid CL, Raehal KM, Bohn LM. **2008**. Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on beta-arrestin-2 interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:1079-84.

Schwindt PC, Crill WE. **1997**. Modification of current transmitted from apical dendrite to soma by blockade of voltage- and Ca2+-dependent conductances in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **78**:187-98.

Segura I, Essmann CL, Weinges S, Acker-Palmer A. **2007**. Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. *Nat Neurosci* **10**:301-10.

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. **2004**. Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* **27**:262-9.

Seress L, Abraham H, Hajnal A, Lin H, Totterdell S. **2005**. NOS-positive local circuit neurons are exclusively axo-dendritic cells both in the neo- and archi-cortex of the rat brain. *Brain Res* **1056**:183-90.

Shadlen MN, Newsome WT. **1998**. The variable discharge of cortical neurons: implications for connectivity, computation, and information coding. *J Neurosci* **18**:3870-96.

Shao Z, Burkhalter A. **1996**. Different balance of excitation and inhibition in forward and feedback circuits of rat visual cortex. *J Neurosci* **16**:7353-65.

Sharp T, Boothman L, Raley J, Queree P. **2007**. Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci* **28**:629-36.

Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA. **2003**. Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* **423**:288-93.

Silberberg G, Gupta A, Markram H. **2002**. Stereotypy in neocortical microcircuits. *Trends Neurosci* **25**:227-30.

Silberberg G, Grillner S, LeBeau FE, Maex R, Markram H. **2005**. Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends Neurosci* **28**:541-51.

Silberberg G, Markram H. **2007**. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* **53**:735-46.

Silberberg G. **2008**. Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Curr Opin Neurobiol* **18**:332-7.

Sillito AM, Cudeiro J, Jones HE. **2006**. Always returning: feedback and sensory processing in visual cortex and thalamus. *Trends Neurosci* **29**:307-16.

Sincich LC, Blasdel GG. **2001**. Oriented axon projections in primary visual cortex of the monkey. *J Neurosci* **21**:4416-26.

Singer HS, Minzer K. **2003**. Neurobiology of Tourette's syndrome: concepts of neuroanatomic localization and neurochemical abnormalities. *Brain Dev* **25 Suppl 1**:S70-84.

Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. **2001**. Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* **32**:1149-64.

Sjostrom PJ, Nelson SB. **2002**. Spike timing, calcium signals and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **12**:305-14.

Sjostrom PJ, Hausser M. **2006**. A cooperative switch determines the sign of synaptic plasticity in distal dendrites of neocortical pyramidal neurons. *Neuron* **51**:227-38.

Sjostrom PJ, Rancz EA, Roth A, Hausser M. **2008**. Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev* **88**:769-840.

Small DH. **2007**. Neural network dysfunction in Alzheimer's disease: a drug development perspective. *Drug News Perspect* **20**:557-63.

Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. **2009**. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* **459**:698-702.

Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. **1998**. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* **26**:113-35.

Song S, Sjostrom PJ, Reigl M, Nelson S, Chklovskii DB. **2005**. Highly nonrandom features of synaptic connectivity in local cortical circuits. *PLoS Biol* **3**:e68.

Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. **1990**. Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT1A Autoreceptors on Serotoninergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci* **2**:1144-54.

Spolidoro M, Sale A, Berardi N, Maffei L. **2009**. Plasticity in the adult brain: lessons from the visual system. *Exp Brain Res* **192**:335-41.

Sporns O, Tononi G, Kotter R. **2005**. The human connectome: A structural description of the human brain. *PLoS Comput Biol* **1**:e42.

Spruston N. **2008**. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* **9**:206-21.

Steriade M, Nunez A, Amzica F. **1993**. A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci* **13**:3252-65.

Steriade M. **2001a**. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J Neurophysiol* **86**:1-39.

Steriade M. **2001b**. Active neocortical processes during quiescent sleep. *Arch Ital Biol* **139**:37-51.

Stratford KJ, Tarczy-Hornoch K, Martin KA, Bannister NJ, Jack JJ. **1996**. Excitatory synaptic inputs to spiny stellate cells in cat visual cortex. *Nature* **382**:258-61.

Stuart GJ, Sakmann B. **1994**. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* **367**:69-72.

Stuart G, Sakmann B. **1995**. Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* **15**:1065-76.

Stuart G, Schiller J, Sakmann B. **1997**. Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* **505(Pt 3)**:617-32.

Stuart G, Spruston N. **1998**. Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* **18**:3501-10.

Stuart GJ, Hausser M. **2001**. Dendritic coincidence detection of EPSPs and action potentials. *Nat Neurosci* **4**:63-71.

Sur C, Betz H, Schloss P. **1996**. Immunocytochemical detection of the serotonin transporter in rat brain. *Neuroscience* **73**:217-31.

Sweet RA, Henteleff RA, Zhang W, Sampson AR, Lewis DA. **2009**. Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **34**:374-89.

Szabadics J, Lorincz A, Tamas G. **2001**. Beta and gamma frequency synchronization by dendritic gabaergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons. *J Neurosci* **21**:5824-31.

Szabadics J, Varga C, Molnar G, Olah S, Barzo P, et al. **2006**. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* **311**:233-5.

- T -

Taber E, Brodal A, Walberg F. **1960**. The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J Comp Neurol* **114**:161-87.

Tagliaferro P, Ramos AJ, Lopez-Costa JJ, Lopez EM, Brusco A. **2003**. Changes in the postnatal development on nitric oxide system induced by serotonin depletion. *Brain Res Dev Brain Res* **146**:39-49.

Takeuchi Y, Sano Y. **1984**. Serotonin nerve fibers in the primary visual cortex of the monkey. Quantitative and immunoelectronmicroscopical analysis. *Anat Embryol (Berl)* **169**:1-8.

Takigawa T, Alzheimer C. **1999**. G protein-activated inwardly rectifying K+ (GIRK) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells. *J Physiol* **517 (Pt 2)**:385-90.

Tamas G, Buhl EH, Lorincz A, Somogyi P. **2000**. Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* **3**:366-71.

Tamas G, Szabadics J, Somogyi P. **2002**. Cell type- and subcellular position-dependent summation of unitary postsynaptic potentials in neocortical neurons. *J Neurosci* **22**:740-7.

Tan AY, Zhang LI, Merzenich MM, Schreiner CE. **2004**. Tone-evoked excitatory and inhibitory synaptic conductances of primary auditory cortex neurons. *J Neurophysiol* **92**:630-43.

Tan AY, Atencio CA, Polley DB, Merzenich MM, Schreiner CE. **2007**. Unbalanced synaptic inhibition can create intensity-tuned auditory cortex neurons. *Neuroscience* **146**:449-62.

Tan HO, Reid CA, Single FN, Davies PJ, Chiu C, et al. **2007**. Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:17536-41.

Tan Z, Hu H, Huang ZJ, Agmon A. **2008**. Robust but delayed thalamocortical activation of dendritic-targeting inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:2187-92.

Tanaka E, North RA. **1993**. Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J Neurophysiol* **69**:1749-57.

Tao-Cheng JH, Zhou FC. **1999**. Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. *Neuroscience* **94**:821-30.

Tarczy-Hornoch K, Martin KA, Jack JJ, Stratford KJ. **1998**. Synaptic interactions between smooth and spiny neurones in layer 4 of cat visual cortex in vitro. *J Physiol* **508 (Pt 2)**:351-63.

Tauc L, Gerschenfeld HM. **1962**. A cholinergic mechanism of inhibitory synaptic transmission in a molluscan nervous system. *J Neurophysiol* **25**:236-62.

Thomson AM, Morris OT. **2002**. Selectivity in the inter-laminar connections made by neocortical neurones. *J Neurocytol* **31**:239-46.

Thomson AM, Bannister AP. **2003**. Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex* **13**:5-14.

Tork I. **1990**. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* **600**:9-34; discussion -5.

Torres GE, Caron MG. **2003**. Center stage for the serotonin transporter: a gain-of-function polymorphism in persons with obsessive-compulsive disorder. *Mol Pharmacol* **64**:196-8.

Trevelyan AJ, Watkinson O. **2005**. Does inhibition balance excitation in neocortex? *Prog Biophys Mol Biol* **87**:109-43.

Triller A, Seitanidou T, Franksson O, Korn H. **1990**. Size and shape of glycine receptor clusters in a central neuron exhibit a somato-dendritic gradient. *New Biol* **2**:637-41.

Tsiola A, Hamzei-Sichani F, Peterlin Z, Yuste R. **2003**. Quantitative morphologic classification of layer 5 neurons from mouse primary visual cortex. *J Comp Neurol* **461**:415-28.

Tsubokawa H, Ross WN. **1996**. IPSPs modulate spike backpropagation and associated [Ca2+]i changes in the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **76**:2896-906.

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. **1998**. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* **391**:892-6.

Turrigiano GG, Nelson SB. **2000**. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **10**:358-64.

Turrigiano GG, Nelson SB. **2004**. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* **5**:97-107.

Turrigiano G. **2007**. Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Curr Opin Neurobiol* **17**:318-24.

Turrigiano GG. **2008**. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* **135**:422-35.

- U -

Upton AL, Salichon N, Lebrand C, Ravary A, Blakely R, et al. **1999**. Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J Neurosci* **19**:7007-24.

Urbain N, Creamer K, Debonnel G. **2006**. Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. *J Physiol* **573**:679-95.

Urban NN, Barrionuevo G. **1998**. Active summation of excitatory postsynaptic potentials in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11450-5.

- V -

van den Buuse M, Martin S, Holgate J, Matthaei K, Hendry I. **2007**. Mice deficient in the alpha subunit of G(z) show changes in pre-pulse inhibition, anxiety and responses to 5-HT(1A) receptor stimulation, which are strongly dependent on the genetic background. *Psychopharmacology (Berl)* **195**:273-83.

van Hooft JA, Yakel JL. **2003**. 5-HT3 receptors in the CNS: 3B or not 3B? *Trends Pharmacol Sci* **24**:157-60.

van Vreeswijk C, Sompolinsky H. **1998**. Chaotic balanced state in a model of cortical circuits. *Neural Comput* **10**:1321-71.

Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE. **2000**. 5-HT7 receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* **21**:70-7.

Varea E, Blasco-Ibanez JM, Gomez-Climent MA, Castillo-Gomez E, Crespo C, et al. **2007**. Chronic fluoxetine treatment increases the expression of PSA-NCAM in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* **32**:803-12.

Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M. **2001**. Evidence for a role of GABA interneurones in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* **106**:783-92.

Vetter P, Roth A, Hausser M. **2001**. Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol* **85**:926-37.

Vickery RG, Mai N, Kaufman E, Beattie DT, Pulido-Rios T, et al. **2007**. A comparison of the pharmacological properties of guinea-pig and human recombinant 5-HT4 receptors. *Br J Pharmacol* **150**:782-91.

Vilaro MT, Cortes R, Gerald C, Branchek TA, Palacios JM, et al. **1996**. Localization of 5-HT4 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* **43**:356-60.

Vilaro MT, Cortes R, Mengod G. **2005**. Serotonin 5-HT4 receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions. *J Comp Neurol* **484**:418-39.

Vitalis T, Cases O, Passemard S, Callebert J, Parnavelas JG. **2007**. Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur J Neurosci* **26**:331-44.

Vogels TP, Abbott LF. **2009**. Gating multiple signals through detailed balance of excitation and inhibition in spiking networks. *Nat Neurosci* **12**:483-91.

- W -

Waeber C, Sebben M, Nieoullon A, Bockaert J, Dumuis A. **1994**. Regional distribution and ontogeny of 5-HT4 binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology* **33**:527-41.

Waeber C, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A. **1996**. Regional distribution and ontogeny of 5-HT4 binding sites in rat brain. *Behav Brain Res* **73**:259-62.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, et al. **2003**. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* **299**:76.

Wang XJ, Buzsaki G. **1996**. Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci* **16**:6402-13.

Wang Y, Gu Q, Cynader MS. **1997**. Blockade of serotonin-2C receptors by mesulergine reduces ocular dominance plasticity in kitten visual cortex. *Exp Brain Res* **114**:321-8.

Wang XJ. **2001**. Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends Neurosci* **24**:455-63.

Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. **2002**. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* **12**:395-410.

Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, et al. **2004**. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* **561**:65-90.

Wang Y, Markram H, Goodman PH, Berger TK, Ma J, et al. **2006**. Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nat Neurosci* **9**:534-42.

Wang DD, Kriegstein AR. **2009**. Defining the role of GABA in cortical development. *J Physiol* **587**:1873-9.

Wassef A, Baker J, Kochan LD. **2003**. GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* **23**:601-40.

Waters J, Larkum M, Sakmann B, Helmchen F. **2003**. Supralinear Ca2+ influx into dendritic tufts of layer 2/3 neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* **23**:8558-67.

Wehr M, Zador AM. **2003**. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* **426**:442-6.

Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, Gonzalez-Maeso J, et al. **2006**. Cortical 5-HT2A receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science* **313**:536-40.

Weliky M, Kandler K, Fitzpatrick D, Katz LC. **1995**. Patterns of excitation and inhibition evoked by horizontal connections in visual cortex share a common relationship to orientation columns. *Neuron* **15**:541-52.

West DC, Mercer A, Kirchhecker S, Morris OT, Thomson AM. **2006**. Layer 6 cortico-thalamic pyramidal cells preferentially innervate interneurons and generate facilitating EPSPs. *Cereb Cortex* **16**:200-11.

Wheeler BW, Gunnell D, Metcalfe C, Stephens P, Martin RM. **2008**. The population impact on incidence of suicide and non-fatal self harm of regulatory action against the use of selective serotonin reuptake inhibitors in under 18s in the United Kingdom: ecological study. *BMJ* **336**:542-5.

Whitaker-Azmitia PM. **2001**. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* **56**:479-85.

White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. **1976**. The structure of the ventral nerve cord of Caenorhabditis elegans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**:327-48.

Wierenga CJ, Ibata K, Turrigiano GG. **2005**. Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J Neurosci* **25**:2895-905.

Wiesel TN, Hubel DH. **1963**. Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *J Neurophysiol* **26**:1003-17.

Wiesel TN, Hubel DH. **1965**. Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J Neurophysiol* **28**:1029-40.

Wilent WB, Contreras D. **2005**. Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex. *Nat Neurosci* **8**:1364-70.

Williams SR, Stuart GJ. **1999**. Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* **521 Pt 2**:467-82.

Williams SR, Stuart GJ. **2000**. Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **83**:3177-82.

Williams SR, Stuart GJ. **2003a**. Role of dendritic synapse location in the control of action potential output. *Trends Neurosci* **26**:147-54.

Williams SR, Stuart GJ. **2003b**. Voltage- and site-dependent control of the somatic impact of dendritic IPSPs. *J Neurosci* **23**:7358-67.

Williams SR. **2004**. Spatial compartmentalization and functional impact of conductance in pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **7**:961-7.

- X -

Xia Z, Gray JA, Compton-Toth BA, Roth BL. **2003**. A direct interaction of PSD-95 with 5-HT2A serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem* **278**:21901-8.

Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA. **2002**. Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer v of rat visual cortex. *J Neurophysiol* **88**:740-50.

Xu T, Pandey SC. **2000**. Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull* **51**:499-505.

Xu X, Callaway EM. **2009**. Laminar specificity of functional input to distinct types of inhibitory cortical neurons. *J Neurosci* **29**:70-85.

Xu NJ, Henkemeyer M. **2009**. Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nat Neurosci* **12**:268-76.

- Y -

Yoshimura Y, Dantzker JL, Callaway EM. **2005**. Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* **433**:868-73.

Young KA, Holcomb LA, Bonkale WL, Hicks PB, Yazdani U, et al. **2007**. 5HTTLPR polymorphism and enlargement of the pulvinar: unlocking the backdoor to the limbic system. *Biol Psychiatry* **61**:813-8.

Yuen EY, Jiang Q, Chen P, Feng J, Yan Z. **2008**. Activation of 5-HT2A/C receptors counteracts 5-HT1A regulation of n-methyl-D-aspartate receptor channels in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J Biol Chem* **283**:17194-204.

Yuen EY, Jiang Q, Chen P, Gu Z, Feng J, et al. **2005**. Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurosci* **25**:5488-501.

- Z -

Zanelli S, Naylor M, Kapur J. **2009**. Nitric oxide alters GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*

Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, et al. **2007a**. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**:633-9.

Zhang F, Aravanis AM, Adamantidis A, de Lecea L, Deisseroth K. **2007b**. Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat Rev Neurosci* **8**:577-81.

Zhang L, Spigelman I, Carlen PL. **1991**. Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *J Physiol* **444**:25-49.

Zhang LI, Tan AY, Schreiner CE, Merzenich MM. **2003**. Topography and synaptic shaping of direction selectivity in primary auditory cortex. *Nature* **424**:201-5.

Zhang ZW. **2003**. Serotonin induces tonic firing in layer V pyramidal neurons of rat prefrontal cortex during postnatal development. *J Neurosci* **23**:3373-84.

Zhou FC, Tao-Cheng JH, Segu L, Patel T, Wang Y. **1998**. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res* **805**:241-54.

Zhou FM, Hablitz JJ. **1999**. Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* **82**:2989-99.

Zhu JJ. **2000**. Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca2+ action potentials in adult rat tuft dendrites. *J Physiol* **526 Pt 3**:571-87.

Zhu Y, Stornetta RL, Zhu JJ. **2004**. Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *J Neurosci* **24**:5101-8.

Zhuang X, Masson J, Gingrich JA, Rayport S, Hen R. **2005**. Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J Neurosci Methods* **143**:27-32.

ANNEXES

European Journal of Neuroscience, Vol. 26, pp. 289–301, 2007 doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05671.x

Involvement of NR2A- or NR2B-containing *N*-methyl-D-aspartate receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage

Nicolas Le Roux, Muriel Amar, Alexandre Moreau and Philippe Fossier
CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, Gif sur Yvette, F-91198, France

Keywords: cortical networks, critical period, long-term potentiation, NR2A, NR2B, rat

Abstract

In the cortex, *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) play a critical role in the control of synaptic plasticity processes. We have previously shown in rat visual cortex that the application of a high-frequency stimulation (HFS) protocol used to induce long-term potentiation in layer 2/3 leads to a parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by cortical layer 5 pyramidal neurones without changing the excitation/inhibition balance of the pyramidal neurone, indicating a homeostatic control of this parameter. We show here that the blockade of NMDARs of the neuronal network prevents the potentiation of excitatory and inhibitory inputs, and this result leaves open to question the role of the NMDAR isoform involved in the induction of long-term potentiation, which is actually being strongly debated. In postnatal day (P)18–23 rat cortical slices, the blockade of synaptic NR2B-containing NMDARs prevents the induction of the potentiation induced by the HFS protocol, whereas the blockade of NR2A-containing NMDARs reduced the potentiation itself. In P29–P32 cortical slices, the specific activation of NR2A-containing receptors fully ensures the potentiation of excitatory and inhibitory inputs. These results constitute the first report of a functional shift in subunit composition of NMDARs during the critical period (P12–P36), which explains the relative contribution of both NR2B- and NR2A-containing NMDARs in synaptic plasticity processes. These effects of the HFS protocol are mediated by the activation of synaptic NMDARs but our results also indicate that the homeostatic control of the excitation/inhibition balance is independent of NMDAR activation and is due to specialized recurrent interactions between excitatory and inhibitory networks.

Introduction

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are among the most important receptors in the central nervous system. Largely expressed in the brain, they play a major role in glutamatergic transmission due to their unique functional properties, which include a high Ca^{2+} permeability, slow activation and deactivation kinetics, and a voltage-sensitive block by external Mg^{2+} (Jahr & Stevens, 1990; Lester *et al.*, 1990). As a result of these properties, NMDARs play key roles in numerous physiological and pathological brain processes such as synaptic plasticity (Choi & Rothman, 1990), schizophrenia (Coyle *et al.*, 2002, 2003) or epilepsy (Dingledine *et al.*, 1990).

The role of NMDARs in the two major forms of synaptic plasticity that contribute to phenomena of learning and memory, long-term potentiation (LTP) and long-term depression, has been largely determined. Modest elevations of intracellular calcium due to NMDAR activation are thought to trigger depression, whereas large increases of intracellular calcium trigger potentiation (Bear & Malenka, 1994; Yang *et al.*, 1999).

N-methyl-D-aspartate receptors are heterotetramers that consist of the NMDAR NR1 subunit, which binds glycine or D-serine and one or more of the NR2 subunits NR2A–NR2D that bind glutamate (Forrest *et al.*, 1994; Hollmann & Heinemann, 1994). Although NR3A (Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995) and NR3B (Chatterton *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2002) have also been recently identified, it is reported that NR2A and NR2B subunits dominate in the forebrain (Monyer *et al.*, 1994).

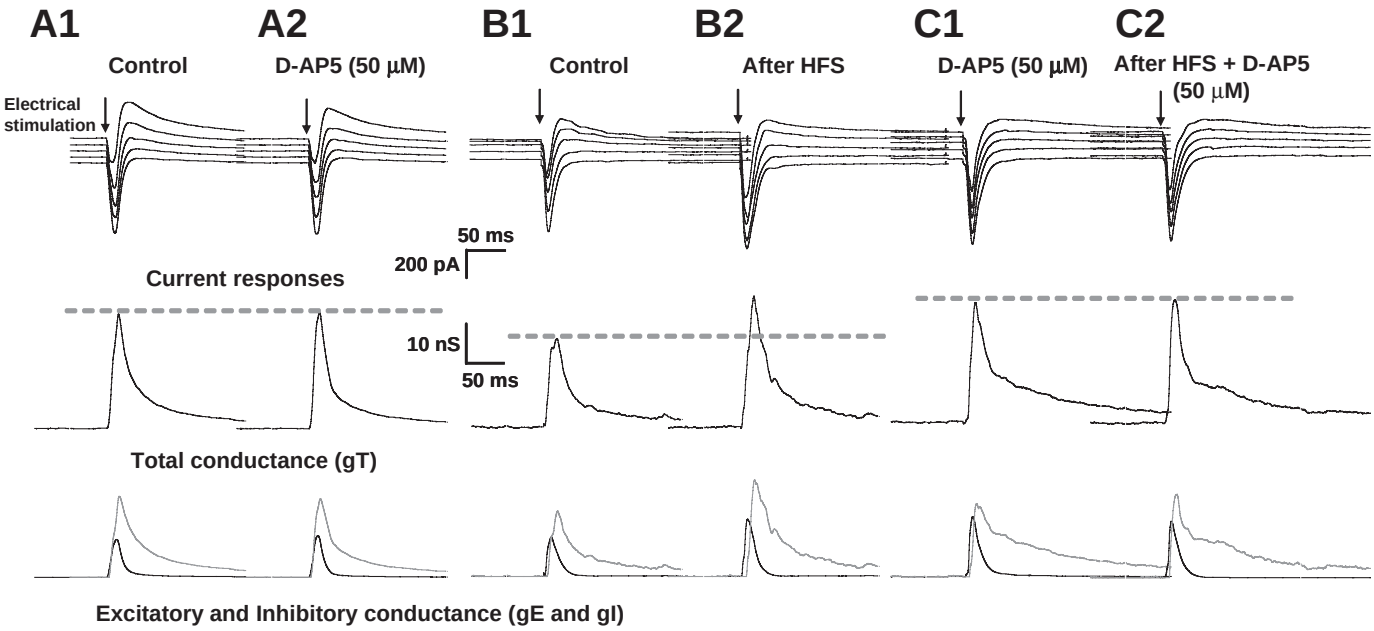
The functional properties of the receptor strongly depend on the type of NR2 subunit incorporated (Cull-Candy *et al.*, 2001; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004), which changes with age. In the cortex, the NR2B subunit is predominantly expressed early in development (Babb *et al.*, 2005), whereas expression of the NR2A subunit increases later. According to the NR2 composition, NMDARs will have different roles in synaptic plasticity and it has been proposed that potentiation and depression are differentially mediated by NR2A and NR2B, respectively (Liu *et al.*, 2004a; Massey *et al.*, 2004). This differential effect could be related to the specific localization of NMDAR subtypes; the NR1/NR2A complex, characterized by rapid offset kinetics, would be present at the synapse, whereas the NR1/NR2B complex, characterized by slow kinetics, would mainly lie in extrasynaptic sites (Rumbaugh & Vicini, 1999; Tovar & Westbrook, 1999). However, recent studies suggest that NR2A and NR2B each contribute equally to the induction of potentiation and depression (Toyoda *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

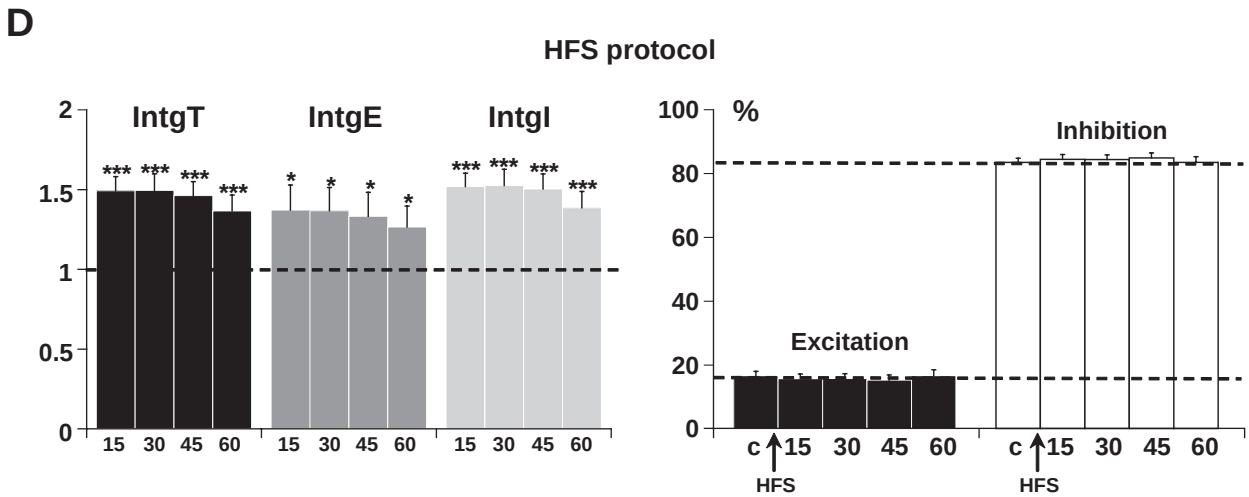
Correspondence: Dr Nicolas Le Roux, as above.
E-mail: leroux@nbcm.cnrs-gif.fr

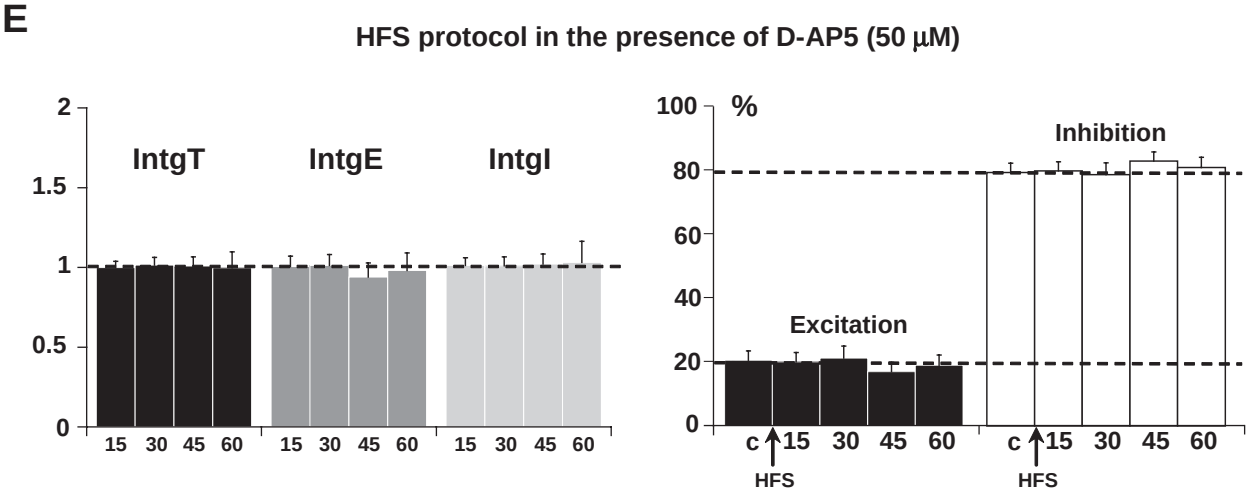
Received 21 March 2007, revised 21 May 2007, accepted 30 May 2007

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

It has been shown in the rat visual cortex that the NR1 subunit is coexpressed with both the NR2A and NR2B subunits (Hawkins *et al.*, 1999; Tongiorgi *et al.*, 2003; Babb *et al.*, 2005). The role of NMDARs in the induction of potentiation in the visual cortex is well established (Bear & Kirkwood, 1993; Bliss & Collingridge, 1993) but which NR2 subunit(s) might be involved in this plasticity process remains







© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

controversial. We have previously shown that application of a high-frequency stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 does not change the excitatory : inhibitory (E : I) ratio due to parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by pyramidal neurones (Le Roux *et al.*, 2006). Here, we investigate the role of NMDARs in the induction of the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of layer 5 pyramidal neurones after application of an HFS protocol in layer 2/3 in rat visual cortex [between postnatal day (P)18 and 23 or between P29 and P32]. We find that, for young rats (between P18 and P32), the potentiation of excitatory and inhibitory inputs by an HFS protocol mainly depends on the activation of NR2B-containing receptors, whereas for P29–P32 rats this plasticity becomes dependent on NR2A-containing receptors. We show that the prevention of potentiating effects on excitation and inhibition by blockade of NMDARs did not change the E : I ratio. Our results bring direct evidence of a functional shift in subunit composition of NMDARs during the critical period (P12–P36), which would explain the relative contribution of both NR2B- and NR2A-containing NMDARs in synaptic plasticity processes.

Materials and methods

Slice preparation

Parasagittal slices containing primary visual cortex were obtained from P18–P23 or P29–P32 Wistar rats. Briefly, in accordance with the guidelines of the American Neuroscience Association, a rat was decapitated, its brain quickly removed and placed in chilled (5 °C) artificial cerebrospinal extracellular solution. Slices (250 μm thick) were made from the primary visual cortex using a vibratome and then incubated for at least 1 h at 36 °C in a solution containing (in mM): 126 NaCl, 26 $NaHCO_3$, 10 glucose, 2 $CaCl_2$, 1.5 KCl, 1.5 $MgSO_4$ and 1.25 KH_2PO_4 (pH 7.5, 310–330 mOsm). This solution was bubbled continuously with a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2.

Electrophysiological recordings and cell identification

Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 1D (Axon Instruments, USA), filtered by a low-pass Bessel filter with a cut-off frequency set at 2 kHz and digitally sampled at 4 kHz. Layer 5 pyramidal neurones, identified from the shape of their soma and primary dendrites and from their current-induced excitability pattern, were studied using the patch-clamp technique in whole-cell configuration. Somatic whole-cell recordings were performed at room temperature (20°C) using borosilicate glass pipettes (of 3–5 MΩ resistance in the bath) filled with a solution containing (in mM): 140 K-gluconate, 10 HEPES, 4 ATP, 2 $MgCl_2$, 0.4 GTP, 0.5 EGTA (pH 7.3 adjusted with KOH, 270–290 mOsm). The membrane potential was corrected off-line by −10 mV to account for the junction potential. Estimation of the access resistance (Rs) is critical to quantitatively evaluate the relative change of input conductance in response to synaptic activation. After capacitance neutralization, bridge balancing was performed on-line in current-clamp conditions, which provided us with an initial estimate of Rs. This value was checked and revised as necessary off-line by fitting the voltage response to a hyperpolarizing current pulse with the sum of two exponentials. Under voltage-clamp conditions, the holding potential was corrected off-line using this Rs value. Only cells with a resting membrane potential more negative than −55 mV and recordings with an Rs lower than 25 MΩ were kept for further analysis. The firing behaviour of neurones was determined in response to depolarizing current pulses ranging from −100 to 200 pA under current-clamp conditions.

The stimulating electrodes were positioned in layer 2–3. Electrical stimulations (1–10 μA, 0.2 ms duration) were delivered in these layers using 1 MΩ impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT, WPI). The intensity of the stimulation was adjusted in current-clamp conditions to induce a subthreshold postsynaptic response due to coactivation of excitatory and inhibitory circuits. Under voltage-clamp conditions, the frequency of stimulation was 0.05 Hz and five to eight trials were repeated for a given holding potential.

A control recording was made after 15 min of patch-clamp equilibration at 0.05 Hz and then drugs were continuously superfused for 20 min. A 'drug recording' was made in the same conditions. We next applied an HFS protocol in order to induce long-term modifications of synaptic strength in the recruited circuits. The HFS protocol was elicited with theta burst stimulation known to induce LTP at the synaptic level. It consisted of three trains of 13 bursts applied at a frequency of 5 Hz, each burst containing four pulses at 100 Hz (Abraham & Huggett, 1997). Recordings were made at 0.05 Hz after 15, 30, 45 and 60 min application of the HFS protocol. A low-frequency stimulation (LFS) protocol was also used, which consisted of a 1 Hz stimulation applied for 15 min.

Drugs

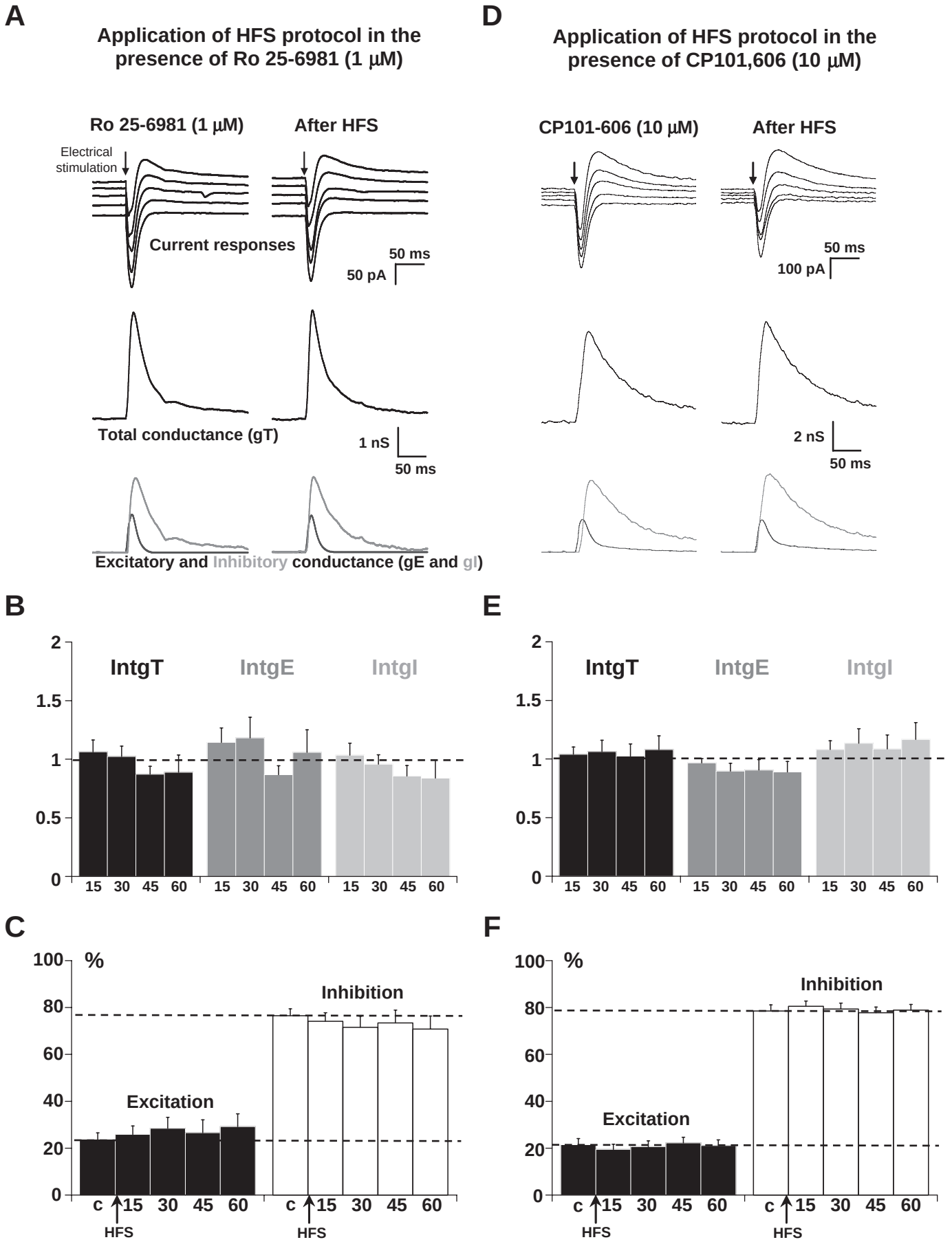
D-AP5 and Ro-256981 were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), NVP-AAM077 was a gift from Dr Y.P. Auberson (Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Switzerland) and CP 101,606 was a gift from Pfizer (Groton, CT, USA). Drugs were dissolved in the perfusate for at least 15 min before recordings.

Synaptic response analysis

Data were analysed off-line with specialized software (ACQUIS1™ and ELPHY™ written by Gérard Sadoc, Biologic UNIC–CNRS, France). The method is based on the continuous measurement of conductance dynamics during stimulus-evoked synaptic responses, as primarily

FIG. 1. Effects of *N*-methyl-D-aspartate receptor blockade on the potentiation of layer 5 pyramidal neurone inputs. (A–C) Top traces: current responses of a layer 5 pyramidal neurone to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3: (A1) under control conditions and (A2) 20 min after perfusion of 50 μM D-AP5; holding potentials scaled from −75 (bottom trace) to −55 mV (top trace, steps equal to 5 mV). (B1) Under control conditions and (B2) 15 min after the high-frequency stimulation (HFS) protocol; holding potentials scaled from −70 (bottom trace) to −50 mV (top trace, steps equal to 5 mV). (C1) 20 min after application of 50 μM D-AP5 and (C2) 15 min after the HFS protocol in the presence of D-AP5; holding potentials scaled from −75 (bottom trace) to −55 mV (top trace, steps equal to 5 mV). Middle traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Bottom traces: decomposition of gT in excitatory (gE, dark grey) and inhibitory (gI, light grey) conductance changes. Note that, for stimulation in layer 2/3 in the presence of D-AP5, no significant change of the response was observed. The HFS protocol induced an increase of gT, gE and gI, which was prevented in the presence of D-AP5. (D) Left part: relative changes (compared with control) of total conductance integral (IntgT) (black), excitatory conductance integral (IntgE) (dark grey) and inhibitory conductance integral (IntgI) (light grey) after application of the HFS protocol in layer 2/3 under control conditions ($n = 26$) (***$P < 0.001$ and *$P < 0.05$, *t*-test). Right part: relative contribution of excitatory and inhibitory conductances to the total conductance change after HFS (c, control before the HFS protocol). (E) Left part: relative changes (compared with control) of IntgT (black), IntgE (dark grey) and IntgI (light grey) after HFS in layer 2/3 ($n = 15$) in the presence of 50 μM D-AP5. Right part: relative contribution of excitatory and inhibitory conductances to the total conductance change after HFS in the presence of 50 μM D-AP5 (c, control before the HFS protocol).

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd



© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

described *in vivo* on cat cortex (Borg-Graham *et al.*, 1998; Monier *et al.*, 2003) and recently validated on rat visual cortex (Le Roux *et al.*, 2006). This method has received further validation on other experimental models (Shu *et al.*, 2003; Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006; Le Roux *et al.*, 2006). Evoked synaptic currents were measured and averaged at a given holding potential. In I–V curves for each delay (t), the value of the holding potential (V_h) was corrected (V_{hc}) from the ohmic drop due to the leakage current through Rs by the equation $V_{hc}(t) = V_h(t) - I(t) \times Rs$. An average estimate of the input conductance waveform of the cell was calculated from the best linear fit (mean least square criterion) of the I–V curve for each delay (t) following the stimulation onset. Only cells showing a Pearson correlation coefficient for the I–V linear regression higher than 0.95 between −90 and −40 mV were considered in order to calculate the conductance change of the recorded pyramidal neurone from the slope of the linear regression.

The evoked synaptic conductance term [gT(t)] was derived from the input conductance by subtracting the resting conductance (g_{rest}) estimated 90 ms before the electrical stimulation. The apparent reversal potential of the synaptic current at the soma [$E_{syn}(t)$] was taken as the voltage abscissa of the intersection point between the I–V curve obtained at a given time (t) and that determined at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, $E_{syn}(t)$ characterizes the stimulation-locked dynamics of the balance between excitation and inhibition.

Decomposition of the synaptic conductance

To decompose the global evoked synaptic conductance [gT(t)] into excitatory and inhibitory components [gE(t) and gI(t)], we used the following simplifications: $I_{syn}(t) = gE(t)\ (E_{syn}(t) - E_{exc}) + gI(t)\ (E_{syn}(t) - E_{inh})$ and $gT(t) = gE(t) + gI(t)$ where $I_{syn}(t)$ is the total synaptic current, $E_{syn}(t)$ is the apparent reversal potential at the soma (see previous paragraph), gE(t) and gI(t) are excitatory and inhibitory conductances, respectively, and E_{exc} and E_{inh} are the reversal potentials for excitation and inhibition. The values of these reversal potentials were equal to 0 mV for excitation (E_{exc}) and −80 mV for inhibition (E_{inh}). The value of −80 mV used in the decomposition method is the reversal potential of $GABA_A$ (and not an intermediate value between $GABA_A$ and $GABA_B$) because, in the presence of QX314 (which blocks K^+ efflux), no variation of the synaptic response was observed.

We showed that the I–V curve in the presence of excitatory synaptic transmission blockers (CNQX and D-AP5) is linear between −80 and +10 mV with a reversal potential equal to −80 mV (see the supplementary material of Le Roux *et al.*, 2006). In the presence of bicuculline, which blocks the inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neurone, the I–V curve for excitation is linear between −80 and +10 mV with a reversal potential equal to 0 mV (data not shown) as already shown by other studies (Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006). Under our experimental conditions of stimulation of cortical layers leading to subthreshold postsynaptic responses, $E_{syn}(t)$, which was extrapolated from I–V curves, took any intermediate values between −80 and −40 mV (see the supplementary material of Le Roux *et al.*, 2006), i.e. within the limits of our voltage excursion (−90 to −40 mV) corresponding to the linearity of I–V curves and between the respective values of E_{inh} and E_{exc} in such a way that the mathematical conditions of the oversimplification used to calculate gI(t) and gE(t) were fulfilled.

Like all somatic recordings, our recordings cannot make rigorous estimates of synaptic events in the distal dendrites and the conductance estimates are ratios of the overall excitatory and inhibitory drive contained in the local stimulated network (Haider *et al.*, 2006). However, our measurements give relative changes in conductance magnitude that reflect the cumulative contributions of excitation and inhibition arriving at proximal portions of the neurone. These relative conductance changes at the somatic level are precisely the result of synaptic dendritic integration that we wish to record at the somatic level because they determine the output signal from the neurone (Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006).

To quantify the synaptic conductance changes we calculated the integral (int) over a time window of 200 ms. The contribution of each component was expressed by the ratio of its integral value [excitatory conductance integral (IntgE) or inhibitory conductance integral (IntgI)] to that of total conductance change [total conductance integral (IntgT)].

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SD of n cells. Paired samples for IntgT, IntgE, IntgI, percentage excitation or percentage inhibition between the control condition (before HFS) and a given time after HFS (15, 30, 45 or 60 min) were analysed using the parametric t-test. Data were considered statistically significant for $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ and $***P \leq 0.001$.

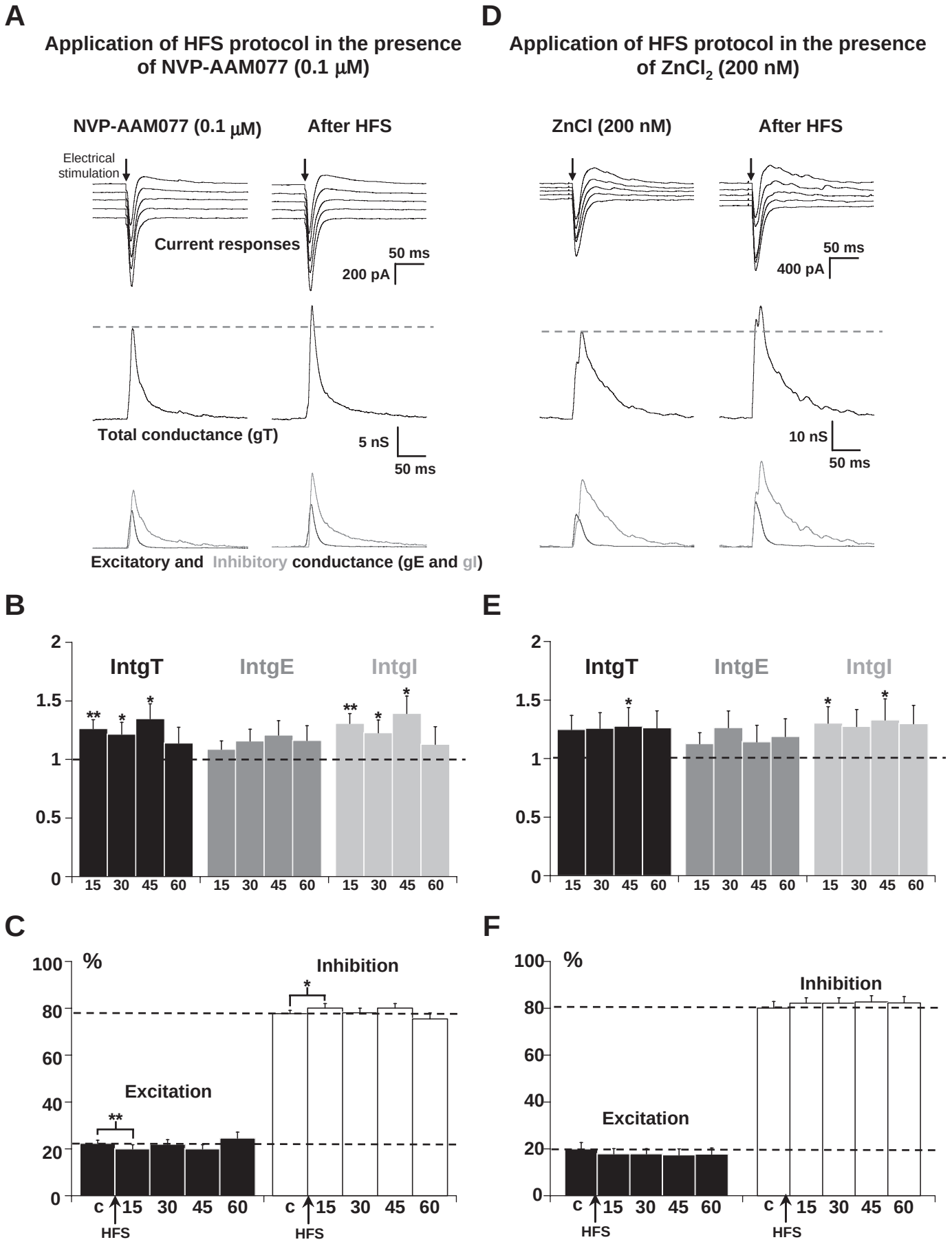
Results

Involvement of NMDARs in the potentiation of excitatory and inhibitory inputs on cortical layer 5 pyramidal neurones induced by HFS protocol application in layer 2/3

Figure 1A–C presents representative current recordings in a layer 5 voltage-clamped pyramidal neurone to electrical stimulation (0.05 Hz) in layer 2/3. Current responses show a strong inward current followed by an outward component (Fig. 1A). Decomposition of these current responses into distinct conductance changes showed that, as already reported (Le Roux *et al.*, 2006), inhibition (gI) represents roughly 80% (light grey trace) and excitation (gE) 20% (dark grey trace) of the global conductance change (black trace, Fig. 1, A1). The application of 50 μM D-AP5, a specific antagonist of NMDARs (Yoshimura *et al.*, 2003; Huemmeke *et al.*, 2004), for 20 min did not induce significant

FIG. 2. Effects of the blockade of NR2B-containing receptors on the potentiation of layer 5 pyramidal neurone inputs for postnatal day 18–23 rats. (A) Left column: representative recordings before high-frequency stimulation (HFS) application. Right column: 60 min after application of HFS in layer 2/3 in the presence of 1 μM Ro-256981. Top traces: current responses of a layer 5 pyramidal neurone to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged from −55 to −75 mV. The amplitude of current responses was unchanged after HFS application in the presence of Ro-256981. Middle traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Bottom traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). (B) Relative changes (compared with control) of total conductance integral (IntgT) (black bars), excitatory conductance integral (IntgE) (dark grey bars) and inhibitory conductance integral (IntgI) (light grey bars) after HFS in layer 2/3 ($n = 12$) in the presence of 1 μM Ro-256981. (C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change after HFS in the presence of 1 μM Ro-256981 (c, control before the HFS protocol). (D–F) Application of the HFS protocol in the presence of 10 μM CP 101,606 ($n = 18$). Legends are identical to those in A–C. No variations of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after HFS (D and E) and the excitatory : inhibitory ratio was unchanged (F).

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd



© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

differences in the global, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 1, A2). These results clearly show that the excitatory and inhibitory components recorded in a layer 5 pyramidal neurone in response to LFS (0.05 Hz) of layer 2/3 does not depend on activation of NMDARs but corresponds to the activation of AMPA and $GABA_A$ receptors mainly located on the apical dendrite of the layer 5 pyramidal neurone.

In the brain, information is encoded as action potential trains of higher frequency than that used in our protocol (0.05 Hz). We applied an HFS protocol with a higher frequency (see Materials and methods), usually used to induce LTP in numerous preparations. Application of this HFS protocol in layer 2/3 induced an LTP of both excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurones. Figure 1B shows representative current recordings in a voltage-clamp pyramidal neurone, under control condition (Fig. 1, B1) and 15 min after application of an HFS protocol (Fig. 1, B2). HFS application elicits enhanced current responses and increases conductance changes. The statistical analysis of the global population ($n = 24$) is presented in Fig. 1D and shows that, at 15, 30, 45 and 60 min after the HFS protocol, the total, excitatory and inhibitory conductance changes are potentiated by about 45, 35 and 48%, respectively. However, no significant change in excitation (IntgE) and inhibition (IntgI) conductance integrals expressed as percent of IntgT was measured (Fig. 1D, right part) in such a way that the E : I ratio was unchanged.

It is worth noting that the detected potentiation is probably related to the HFS protocol as, in the absence of such a protocol, control experiments show no significant change of IntgT, IntgE or IntgI for 1 h ($n = 17$, data not shown).

In order to examine the involvement of NMDAR activation in these potentiating effects of HFS on excitatory and inhibitory inputs, the HFS protocol was applied in the presence of 50 μM D-AP5. No significant increase of current responses and conductance changes was measured (Fig. 1, C1 and C2). No variation of the total conductance change and of inhibitory or excitatory conductance changes was observed through the statistical analysis of the total neuronal population ($n = 15$; Fig. 1E). Under this condition, the HFS protocol failed to induce potentiation of excitatory and inhibitory inputs. No significant changes in excitation (IntgE) and inhibition (IntgI) conductance integrals expressed as percent of IntgT were measured (Fig. 1E) and the E : I ratio did not change. These results indicate that NMDARs are recruited by HFS applied in layer 2/3.

Involvement of NR2A- and/or NR2B-containing receptors in the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of cortical layer 5 pyramidal neurones induced by HFS protocol application in layer 2/3

The involvement of NR2A- and/or NR2B-containing receptors in synaptic plasticity is presently strongly debated (Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004; Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005). To further characterize whether *N*-methyl-D-aspartate currents in layer 2/3 pyramidal neurones were due to the activation of NR2A- or NR2B-containing receptors, we then used antagonists for each of these receptors.

Role of NR2B-containing receptors in postnatal day 18–23 rats

Ro-256981 (Yang *et al.*, 2006) or CP 101,606 (traxoprodil) (Chenard *et al.*, 1995; Menniti *et al.*, 1997) was used to specifically block NR2B-containing receptors. Representative recordings in the presence of 1 μM Ro-256981 before and after application of the HFS protocol showed that the HFS effect was blocked by the NR2B antagonist (Fig. 2A). The statistical analysis of the global population ($n = 12$; Fig. 2B) confirms that no significant variations of the global, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after application of the HFS protocol in layer 2/3 in the presence of Ro-256981. Consequently, the E : I ratio was unchanged (Fig. 2C). Identical results were obtained after application of the HFS protocol in the presence of CP 101,606 ($n = 18$; Fig. 2D–F). These results reproduced those observed in the presence of D-AP5 and provide evidence for an involvement of NR2B-containing receptors in the HFS-induced potentiation of both excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurones.

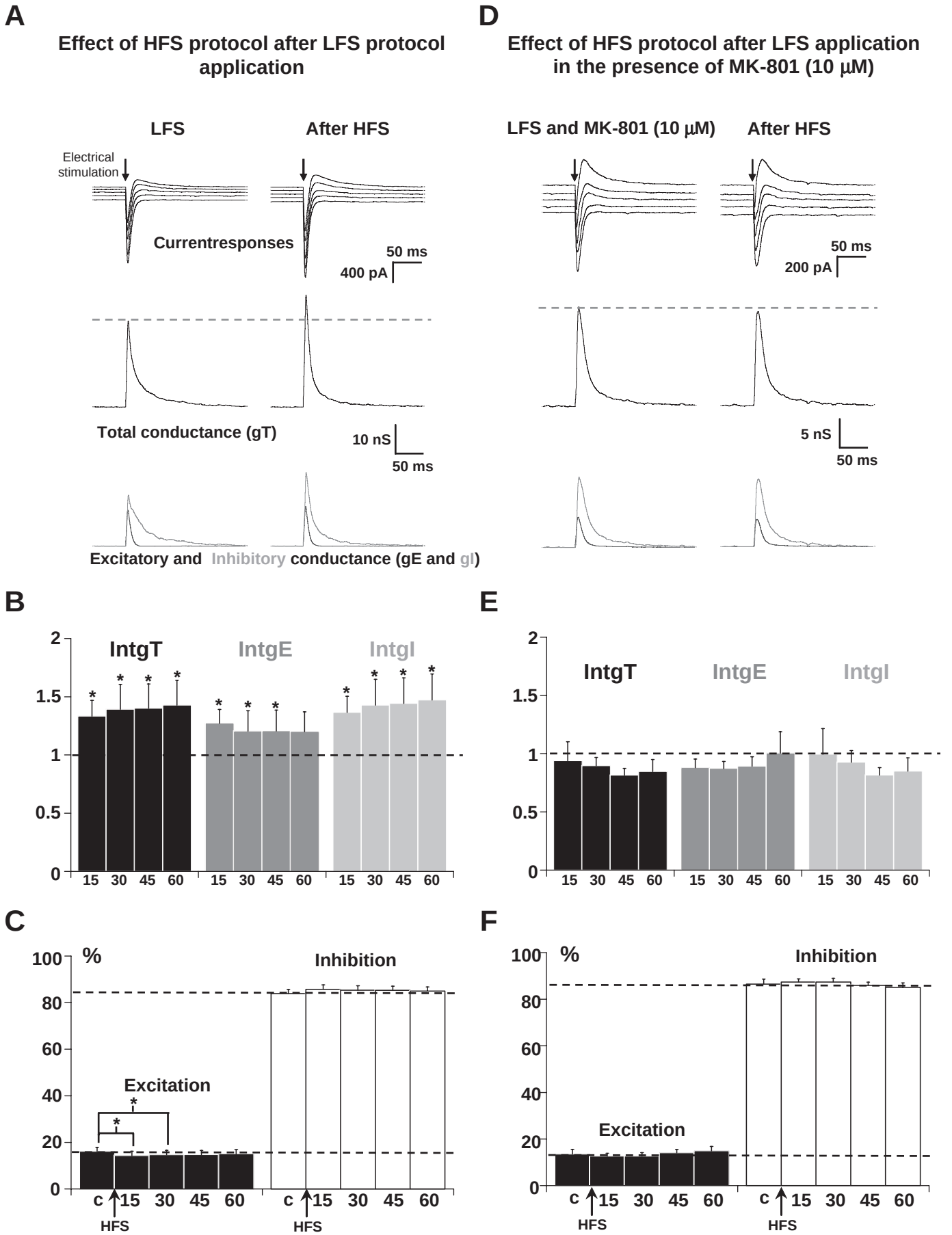
Role of NR2A-containing receptors

NVP-AAM077 (Izumi *et al.*, 2006) or Zn^{2+} (Paoletti & Neyton, 2006) was used to block NR2A-containing receptors. Representative recordings in the presence of 0.1 μM of NVP-AAM077, before and after application of the HFS protocol, showed an increase in the amplitude of current recordings (Fig. 3A, upper traces). Decomposition in conductance showed an increase of total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 3A, middle and lower traces). The statistical analysis of the global population ($n = 13$; Fig. 3B) indicated that application of the HFS protocol in the presence of NVP-AAM077 still induced a significant potentiation of the global and inhibitory conductance changes for 45 min. IntgT was enhanced by 26% ($P < 0.01$), 21% ($P < 0.05$) and 34% ($P < 0.05$) at 15, 30 and 45 min, respectively, after the HFS protocol. IntgI was significantly enhanced in the same proportions but IntgE was not significantly increased ($P > 0.05$). In any case, no potentiating effect remained at 60 min after the HFS protocol. Consequently, the E : I ratio was decreased ($P < 0.01$, Fig. 3C) at 15 min after the HFS protocol but recovered its control value at 30, 45 and 60 min after the HFS protocol.

$ZnCl_2$ was also used to selectively block NR2A-containing receptors because low concentrations of Zn^{2+} block NR2A receptors more than NR2B receptors (Amar *et al.*, 2001; Kohr, 2006; Neyton & Paoletti, 2006). As observed for NVP-AAM077, similar results were obtained in the presence of 200 nM of $ZnCl_2$, with excitatory and inhibitory conductance changes all being increased (Fig. 3D). This result was confirmed by the statistical analysis of the global population ($n = 13$; Fig. 3E), which showed that HFS application in the presence

FIG. 3. Effects of the blockade of NR2A-containing receptors on the potentiation of layer 5 pyramidal neurone inputs for postnatal day 18–23 rats. (A) Left column: representative recordings before high-frequency stimulation (HFS) application. Right column: 60 min after application of HFS in layer 2/3 in the presence of 0.1 μM NVP-AAM077. Top traces: current responses of a layer 5 pyramidal neurone to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged from −55 to −75 mV. The amplitudes of current responses were slightly increased after HFS application. Middle traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Bottom traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were all increased. (B) Relative changes (compared with control) of total conductance integral (IntgT) (black bars), excitatory conductance integral (IntgE) (dark grey bars) and inhibitory conductance integral (IntgI) (light grey bars) after HFS in layer 2/3 ($n = 13$) in the presence of 0.1 μM NVP-AAM077 (**$P < 0.01$ and *$P < 0.05$, *t*-test). (C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change after HFS in the presence of 0.1 μM NVP-AAM077 (c, control before the HFS protocol). (D–F) Application of the HFS protocol in the presence of 200 nM $ZnCl_2$ ($n = 13$). Legends are identical to those in A–C. (D) Imposed membrane potential ranged from −60 to −80 mV. (E and F) Total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased after HFS.

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd



© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

of Zn^{2+} led to a mean increase of 26, 18 and 30% for the total, excitatory and inhibitory conductance changes, respectively. In this case, a slight but not significant ($P > 0.05$) decrease of the E : I ratio was observed (Fig. 3F). In the presence of NR2A-containing receptor blockers, the potentiating effects of the HFS protocol on layer 5 pyramidal neurones still occurred but were reduced.

Involvement of extrasynaptic NR2B-containing receptors in potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurones

NR2B receptors are known to be present in both synaptic and extrasynaptic domains at glutamatergic synapses (Cull-Candy *et al.*, 2001). To check the involvement of synaptic and/or extrasynaptic NR2B-containing receptors in HFS-induced potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurones, synaptic NMDARs were blocked according to the protocol described by Massey *et al.* (2004) using MK-801, an antagonist of NMDARs that acts only on open channels. MK-801 (10 μM) was bath-applied and an LFS protocol was delivered in order to activate synaptic NMDARs that can then be blocked, whereas extrasynaptic receptors are not activated by this protocol of stimulation. MK-801 was then washed out for 30 min and an HFS protocol of stimulation was applied in layer 2/3.

To start, a control condition (omitting MK-801) was used in order to check that application of the LFS protocol does not prevent the potentiation induced by the HFS protocol. Significant potentiations were observed for IntgT (by 39%, $P < 0.05$), IntgI (by 42%, $P < 0.05$) and IntgE (by 22%, $P < 0.05$) (Fig. 4A for representative recordings and Fig. 4B for the statistical analysis of the global population, $n = 14$) and the E : I ratio slightly decreased (Fig. 4C). However, the increased percentage of IntgE was lower than that obtained after a direct HFS protocol. This discrepancy might be due to the prolonged depressive effects (beyond 30 min) of the LFS protocols (mainly on IntgE) that we have shown (Le Roux *et al.*, 2006). Nevertheless, it was possible to obtain a potentiating effect with an HFS protocol and we could thus test the HFS protocol in the presence of MK-801. In the presence of MK-801, no potentiation of excitatory and inhibitory inputs was obtained but a slight decrease of IntgT, IntgE and IntgI was observed (Fig. 4D for representative recordings and Fig. 4E for statistical analysis of the global population, $n = 13$) and the E : I ratio remained stable (Fig. 4F), indicating that synaptic NMDARs can account for the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of layer 5 pyramidal neurones.

Role of NR2A- and/or NR2B-containing receptors in the potentiation of excitatory and inhibitory inputs in postnatal day 29–32 rats

Some studies have suggested that the activation of NR2A but not of NR2B induces LTP (Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004), whereas other studies have proposed that both types of NMDARs can contribute to the induction of LTP (Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). These discrepancies may be related to temporal regulation of NR2 subunits (Monyer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004b). The NR2A : NR2B ratio increases with maturation (Yoshimura *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004c). Our results indicate that, for rats between P18 and P23, synaptic NR2B-containing receptors are functional, whereas NR2A-containing receptors may not yet be fully functional. To test this hypothesis, a new series of experiments was performed on P29–P32 rats.

Role of NR2B-containing receptors in postnatal day 29–32 rats

Representative recordings in the presence of 1 μM Ro-256981, before and after application of the HFS protocol, showed an increase of the amplitude of current recordings (Fig. 5A, upper traces). Decomposition in conductance changes showed an increase of total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 5A, middle and lower traces). The statistical analysis of the global population ($n = 12$; Fig. 5B) indicated that application of the HFS protocol in the presence of Ro-256981 still induced a significant potentiation of the global and inhibitory conductance changes for 45 min. IntgT was enhanced by 42%, IntgE by 40% and IntgI by 51% after the HFS protocol application. Due to parallel potentiation of IntgE and IntgI, no significant change of the E : I ratio was observed (Fig. 5C).

Role of NR2A-containing receptors in postnatal day 29–32 rats

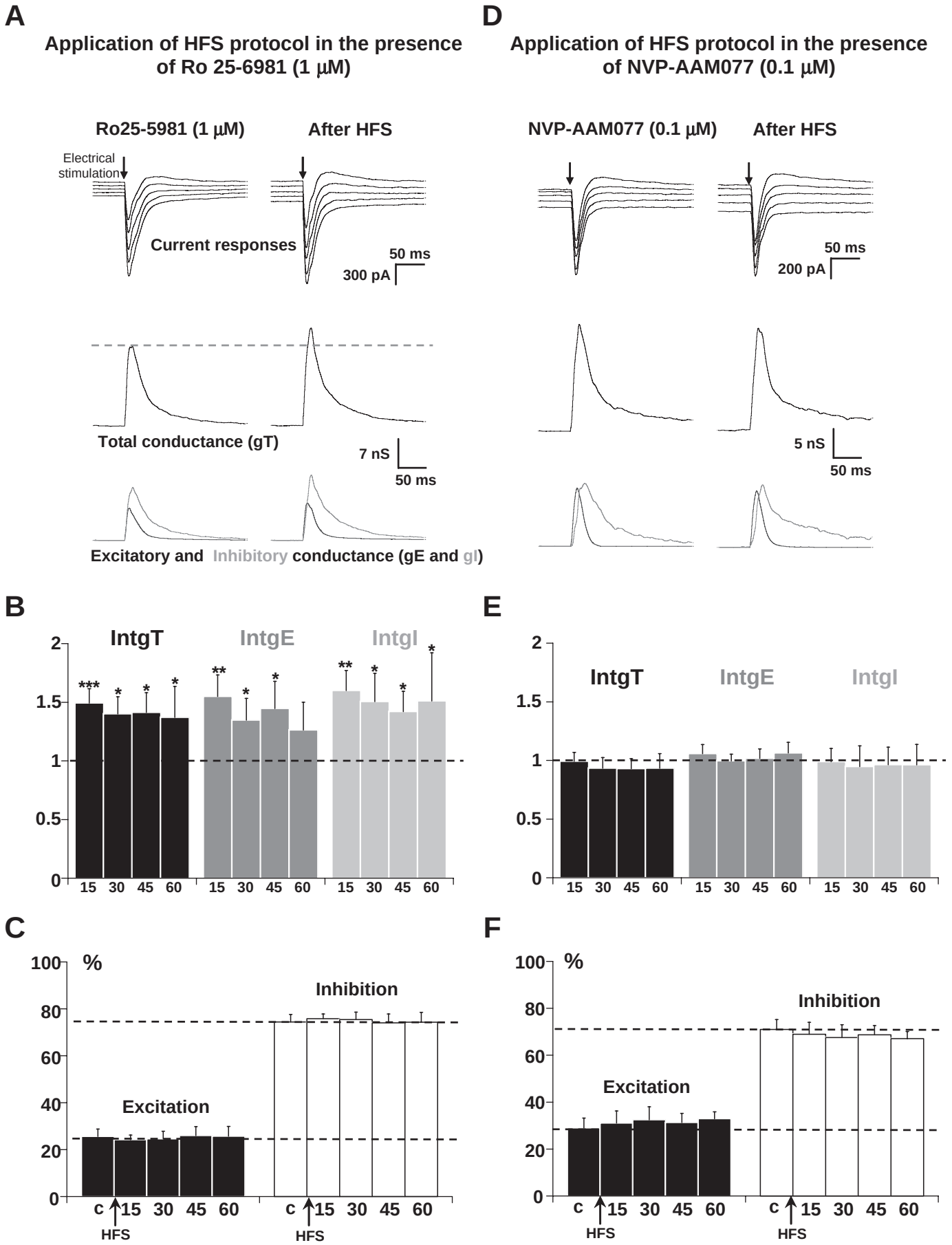
Representative recordings in the presence of 0.1 μM NVP-AAM077 before and after application of the HFS protocol showed no significant variation (Fig. 5D). The statistical analysis of the global population ($n = 13$; Fig. 5E) confirmed the block of the effects of the HFS protocol in the presence of the NR2A-containing receptor blocker for P29–P32 rats. Consequently, the E : I ratio was unchanged (Fig. 5F).

Discussion

N-methyl-D-aspartate receptor activation is required for the potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurones after application of an HFS protocol in layer 2/3. Our results provide evidence of a major recruitment of synaptic NR2B-containing receptors in P18–P23 rats, relative to the involvement of NR2A-containing receptors. As well as their possible differential role in physiological processes such as learning and memory (Collingridge *et al.*, 2004), NR2A- and NR2B-containing receptors are thought to be differentially involved in certain central disorders such as chronic pain or dementia (Kemp & McKernan, 2002; Chazot, 2004; Paoletti & Neyton, 2006). It therefore becomes important to determine the contribution and function of distinct NMDAR subtypes. However, this physiological classification is highly dependent on the selectivity of

FIG. 4. Effect of synaptic *N*-methyl-D-aspartate receptor blockade on the potentiation of layer 5 pyramidal neurone inputs. (A) Left column: representative recordings after application of the low-frequency stimulation (LFS) protocol in layer 2/3. Right column: the LFS protocol was followed by a high-frequency stimulation (HFS) protocol and recordings were performed 60 min after the HFS protocol. Top traces: current responses of a layer 5 pyramidal neurone to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged from −60 to −80 mV. The amplitudes of current responses were increased after HFS application. Middle traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Bottom traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were all increased. (B) Relative changes (compared with control) of total conductance integral (IntgT) (black bars), excitatory conductance integral (IntgE) (dark grey bars) and inhibitory conductance integral (IntgI) (light grey bars) after HFS in layer 2/3 ($n = 14$) after application of the LFS protocol (*$P < 0.05$, *t*-test). (C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change after application of the LFS protocol without MK-801 (c, control before the HFS protocol). (D–F) Application of HFS after application of an LFS protocol in the presence of 10 μM MK-801 ($n = 13$). Legends are identical to those in A–C. No significant variations of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after HFS.

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd



© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

antagonists that can be used. Ro-256981 (ifenprodil) and CP 101,606 (traxoprodil), which bind the N-terminal lysine/isoleucine/valine-binding protein-like domain of NR2B, are now considered as selective antagonists of NR2B-containing receptors (Fischer *et al.*, 1997; Berberich *et al.*, 2005; Kohr, 2006). However, the specific blockade of NR2A-containing receptors is strongly debated (Feng & Macdonald, 2004; Paoletti & Neyton, 2006). First, Zn^{2+} binds the (lysine/isoleucine/valine-binding protein)-like domain of NR2A and displays a better selectivity for NR2A than for NR2B with a maximal selectivity of 70% (Amar *et al.*, 2001; Kohr, 2006; Neyton & Paoletti, 2006). Second, NVP-AAM077 was originally described as a highly selective antagonist of NR2A-containing receptors (Auberson *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004) but later studies on rodents indicate that this compound lacks selectivity for NR2A vs. NR2B receptors (Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Neyton & Paoletti, 2006). Other studies reported that NVP-AAM077 presents some selectivity at concentrations lower than 1 μM (Bartlett *et al.*, 2006; Izumi *et al.*, 2006) and concluded that it was not possible to find a concentration of NVP-AAM077 that fully blocks the NR2A receptors while sparing NR2B. According to the work by Bartlett *et al.* (2006), we used 0.1 μM NVP-AAM077 to check the specific blockade of NR2A receptors. Indeed, whatever the NR2A antagonist used, the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of layer 5 pyramidal neurones occurred but was reduced by about 40% in P18–P23 rats. This result could be due to the blockade of NR2A but also to an unspecific blockade of NR2B subunits.

Recent studies have suggested that the activation of NR2A but not NR2B induces LTP (Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004) although other studies have proposed that both types of NMDARs can contribute to the induction of LTP (Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). These discrepancies could be related to the differential distribution of NMDAR subtypes. For example, an important role for extrasynaptic receptors exclusively containing the NR2B subunit (Cull-Candy *et al.*, 2001) is reported in synaptic plasticity (Massey *et al.*, 2004) or in neuronal cell death (Hardingham *et al.*, 2002; Hardingham, 2006). However, both NR2A- and NR2B-NMDAR subtypes can be located on either synaptic or extrasynaptic sites (Thomas *et al.*, 2006). Here, we show that predominantly synaptic NMDARs are implicated in the observed potentiating effects.

Another possible explanation of these discrepancies is to consider changes in the spatial distribution of NMDARs during the developmental stages. Although the NR1 subunit is ubiquitously expressed in the central nervous system, NR2 subunit expression is temporally regulated (Monyer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004b) with the NR2A : NR2B ratio increasing during maturation (Yoshimura *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004c). In the rat visual cortex, morphological studies showed that NR1 and NR2B subunits are already expressed at birth and reach their highest level of expression during the second and third postnatal weeks (Kew *et al.*, 1998; Tongiorgi *et al.*, 2003; Babb *et al.*, 2005). In contrast, NR2A subunits are poorly expressed at birth but progressively increase as development proceeds (Kew *et al.*, 1998) and the insertion of NR2A receptors displaces NR2B receptors at extrasynaptic sites (Liu *et al.*, 2004c). Our results clearly show that the potentiation initially depends on NR2B-containing receptors in P18–P23 rats but becomes NR2A dependent for P29–P32 rats. Thus, in order to understand the particular role of NR2A or NR2B in the potentiation process, it is crucial to consider the temporal and spatial NMDAR expression. Hence, rather than a differential role for NR2A- or NR2B-containing receptors in the induction of LTP supposed by recent works (Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005), we propose that both types can be involved in the potentiation but their respective involvement depends on the developmental stage of the cortex.

We show that, without underestimating the problem of selectivity of the NR2A- or NR2B-containing receptor antagonists, it is necessary to consider the developmental stages of the animal. In addition, we cannot exclude the possibility that, for P18–P23 rats, NR2A-containing receptors were present but not yet fully functional (not antagonist sensitive), whereas for P29–P32 rats specific blockers were rather efficient.

The blockade of NMDARs prevents the potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurones to HFS in layer 2/3 resulting in an unchanged E : I ratio. These results suggest that the NMDAR activation is not required for the induction of the homeostatic control of the E : I balance but is necessary for the homeostatic plasticity expression. Only a few studies report a similar observation in which the blockade of NMDARs prevents the potentiation of inhibitory synapses [inhibitory postsynaptic currents recorded in cerebellar stellate cells (Liu & Lachamp, 2006)]. It is obvious that we cannot localize facilitated synapses in the stimulated networks by an HFS protocol and we observed that the stimulation of inhibitory interneurones is mainly disynaptic, involving a synapse between a glutamatergic terminal and the interneurone (see the supplementary material of Le Roux *et al.*, 2006). Thus, the potentiation of inhibitory inputs following the HFS protocol in layer 2/3 is probably indirect but, in any case, parallel increases of the strength of excitatory and inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neurone were observed resulting in a close control of the E : I ratio. Indeed, normal brain function requires a delicate balance between excitation and inhibition in neuronal networks; an imbalance of excitation and inhibition underlies various neurological diseases such as epilepsy (Cossart *et al.*, 2005), Parkinson's disease (Llinas *et al.*, 1999) and schizophrenia (Wassef *et al.*, 2003). A correlation between excitatory and inhibitory neuronal responses to sensory stimuli has been found in many cortical neurones in adult mammalian sensory cortices. For example, in cat primary visual cortex, excitation and inhibition exhibit similar tuning preference and tuning width in orientation-selective neurones (Anderson *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2002; Hirsch *et al.*, 2003; Monier *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2005). In addition, a proportionality of recurrent

FIG. 5. Effects of the blockade of NR2B- or NR2A-containing receptors on the potentiation of layer 5 pyramidal neurone inputs for postnatal day (P)29–32 rats. (A) Left column: representative recordings from the statistical analysis of $n = 12$ experiments before high-frequency stimulation (HFS) application. Right column: 60 min after application of HFS in layer 2/3 in the presence of 1 μM Ro-256981. Top traces: current responses of a layer 5 pyramidal neurone to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged from −55 to −75 mV. The amplitude of current responses was increased after HFS application. Middle traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Bottom traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were all increased. (B) Relative changes (compared with control) of total conductance integral (IntgT) (black bars), excitatory conductance integral (IntgE) (dark grey bars) and inhibitory conductance integral (IntgI) (light grey bars) after HFS in layer 2/3 ($n = 12$) in the presence of 1 μM Ro-256981. (C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change after HFS in the presence of 1 μM Ro-256981 (c, control before the HFS protocol). (D–F) Application of the HFS protocol in the presence of 0.1 μM NVP-AAM077 ($n = 13$). Legends are identical to those in A–C. No variations of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after HFS (D and E) and the excitatory : inhibitory ratio was unchanged (F). $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ and $***P \leq 0.001$.

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

excitation and inhibition in cortical networks has been demonstrated to be associated with the persistent activity and is thought to underlie the working memory (Shu *et al.*, 2003). Therefore, neuronal networks adapt to environmental changes by learning and memory, in which the strength of excitatory or inhibitory synapses is changed. We show, using a protocol of stimulation classically used in long-term plasticity, that the E : I ratio can remain unchanged while the strength of excitatory and inhibitory inputs alters. The present results provide evidence for the activation of the homeostatic control of the E : I ratio previously reported by Le Roux *et al.* (2006). This control is independent of the activation of NMDARs but appears to be linked to recurrent interactions between excitatory and inhibitory circuits through layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurones. This cortical organization can underlie the HFS-induced potentiation of some excitatory and inhibitory synapses (and the imprinting of some information) and may control the main output pathway of the cortex, layer 5 pyramidal neurones, through a homeostatic mechanism avoiding hyper- or hypo-excitability.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Y.P. Auberson (Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Switzerland) for the kind gift of NVP-AAM077. We are grateful to Dr D.W. Owens (Pfizer global research and development) for the kind gift of CP 101,606. The authors thank Dr S. O'Regan and Dr R. Lewis for critical reading of the manuscript.

Abbreviations

E : I, excitatory : inhibitory; HFS, high-frequency stimulation; IntgE, excitatory conductance integral; IntgI, inhibitory conductance integral; IntgT, total conductance integral; LFS, low-frequency stimulation; LTP, long-term potentiation; NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor; Rs, access resistance.

References

Abraham, W.C. & Huggett, A. (1997) Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus*, **7**, 137–145.

Amar, M., Perin-Dureau, F. & Neyton, J. (2001) High-affinity Zn block in recombinant N-methyl-D-aspartate receptors with cysteine substitutions at the Q/R/N site. *Biophys. J.*, **81**, 107–116.

Anderson, J.S., Carandini, M. & Ferster, D. (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J. Neurophysiol.*, **84**, 909–926.

Auberson, Y.P., Allgeier, H., Bischoff, S., Lingenhoehl, K., Moretti, R. & Schmutz, M. (2002) 5-Phosphonomethylquinoxalinediones as competitive NMDA receptor antagonists with a preference for the human 1A/2A, rather than 1A/2B receptor composition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1099–1102.

Babb, T.L., Mikuni, N., Najm, I., Wylie, C., Olive, M., Dollar, C. & MacLennan, H. (2005) Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy Res.*, **64**, 23–30.

Bartlett, T.E., Bannister, N.J., Collett, V.J., Dargan, S.L., Massey, P.V., Bortolotto, Z.A., Fitzjohn, S.M., Bashir, Z.I., Collingridge, G.L. & Lodge, D. (2007) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology*, **52**, 60–70.

Bear, M.F. & Kirkwood, A. (1993) Neocortical long-term potentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**, 197–202.

Bear, M.F. & Malenka, R.C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **4**, 389–399.

Berberich, S., Punnakkal, P., Jensen, V., Pawlak, V., Seeburg, P.H., Hvalby, O. & Kohr, G. (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.*, **25**, 6907–6910.

Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31–39.

Borg-Graham, L.J., Monier, C. & Fregnac, Y. (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature*, **393**, 369–373.

Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S.A. & Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, **415**, 793–798.

Chazot, P.L. (2004) The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr. Med. Chem.*, **11**, 389–396.

Chenard, B.L., Bordner, J., Butler, T.W., Chambers, L.K., Collins, M.A., De Costa, D.L., Ducat, M.F., Dumont, M.L., Fox, C.B., Mena, E.E., Menniti, F.S., Nielsen, J., Pagnozzi, M.J., Richter, K.E.G., Ronau, R.T., Shalaby, I.A., Stemple, J.Z. & White, W.F. (1995) (1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol: a potent new neuroprotectant which blocks N-methyl-D-aspartate responses. *J. Med. Chem.*, **38**, 3138–3145.

Choi, D.W. & Rothman, S.M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.*, **13**, 171–182.

Ciabarra, A.M., Sullivan, J.M., Gahn, L.G., Pecht, G., Heinemann, S. & Sevarino, K.A. (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J. Neurosci.*, **15**, 6498–6508.

Collingridge, G.L., Isaac, J.T. & Wang, Y.T. (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 952–962.

Cossart, R., Bernard, C. & Ben-Ari, Y. (2005) Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci.*, **28**, 108–115.

Coyle, J.T., Tsai, G. & Goff, D.C. (2002) Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets in schizophrenia. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, **1**, 183–189.

Coyle, J.T., Tsai, G. & Goff, D. (2003) Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1003**, 318–327.

Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 327–335.

Cull-Candy, S.G. & Leszkiewicz, D.N. (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE*, **255**, re16.

Dingledine, R., McBain, C.J. & McNamara, J.O. (1990) Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 334–338.

Feng, H.J. & Macdonald, R.L. (2004) Proton modulation of alpha 1 beta 3 delta GABAA receptor channel gating and desensitization. *J. Neurophysiol.*, **92**, 1577–1585.

Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J.N., Mohacsi, E., Heitz, M.P. & Kemp, J.A. (1997) Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1285–1292.

Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H.D., Ng, L., Luk, D.C., Sheng, M., Stewart, C.L., Morgan, J.I., Connor, J.A. & Curran, T. (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*, **13**, 325–338.

Haider, B., Duque, A., Hasenstaub, A.R. & McCormick, D.A. (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J. Neurosci.*, **26**, 4535–4545.

Hardingham, G.E. (2006) 2B synaptic or extrasynaptic determines signalling from the NMDA receptor. *J. Physiol.*, **572**, 614–615.

Hardingham, G.E., Fukunaga, Y. & Bading, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.*, **5**, 405–414.

Hawkins, L.M., Chazot, P.L. & Stephenson, F.A. (1999) Biochemical evidence for the co-association of three N-methyl-D-aspartate (NMDA) R2 subunits in recombinant NMDA receptors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 27 211–27 218.

Higley, M.J. & Contreras, D. (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J. Neurosci.*, **26**, 448–457.

Hirsch, J.A., Martinez, L.M., Pillai, C., Alonso, J.M., Wang, Q. & Sommer, F.T. (2003) Functionally distinct inhibitory neurons at the first stage of visual cortical processing. *Nat. Neurosci.*, **6**, 1300–1308.

Hollmann, M. & Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, **17**, 31–108.

Huemmeke, M., Eysel, U.T. & Mittmann, T. (2004) Lesion-induced enhancement of LTP in rat visual cortex is mediated by NMDA receptors containing the NR2B subunit. *J. Physiol.*, **559**, 875–882.

Izumi, Y., Auberson, Y.P. & Zorumski, C.F. (2006) Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *J. Neurosci.*, **26**, 7181–7188.

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

Jahr, C.E. & Stevens, C.F. (1990) Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J. Neurosci.*, **10**, 3178–3182.

Kemp, J.A. & McKernan, R.M. (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat. Neurosci.*, **5** (Suppl.), 1039–1042.

Kew, J.N., Richards, J.G., Mutel, V. & Kemp, J.A. (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J. Neurosci.*, **18**, 1935–1943.

Kohr, G. (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.*, **326**, 439–446.

Le Roux, N., Amar, M., Baux, G. & Fossier, P. (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 3507–3518.

Lester, R.A., Clements, J.D., Westbrook, G.L. & Jahr, C.E. (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature*, **346**, 565–567.

Liu, S.J. & Lachamp, P. (2006) The activation of excitatory glutamate receptors evokes a long-lasting increase in the release of GABA from cerebellar stellate cells. *J. Neurosci.*, **26**, 9332–9339.

Liu, H.N., Kurotani, T., Ren, M., Yamada, K., Yoshimura, Y. & Komatsu, Y. (2004a) Presynaptic activity and $Ca2^{+}$ entry are required for the maintenance of NMDA receptor-independent LTP at visual cortical excitatory synapses. *J. Neurophysiol.*, **92**, 1077–1087.

Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P. & Wang, Y.T. (2004b) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, **304**, 1021–1024.

Liu, X.B., Murray, K.D. & Jones, E.G. (2004c) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J. Neurosci.*, **24**, 8885–8895.

Llinas, R.R., Ribary, U., Jeanmonod, D., Kronberg, E. & Mitra, P.P. (1999) Thalamocortical dysrhythmia: a neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 15 222–15 227.

Marino, J., Schummers, J., Lyon, D.C., Schwabe, L., Beck, O., Wiesing, P., Obermayer, K. & Sur, M. (2005) Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. *Nat. Neurosci.*, **8**, 194–201.

Martinez, L.M., Alonso, J.M., Reid, R.C. & Hirsch, J.A. (2002) Laminar processing of stimulus orientation in cat visual cortex. *J. Physiol.*, **540**, 321–333.

Massey, P.V., Johnson, B.E., Moult, P.R., Auberson, Y.P., Brown, M.W., Molnar, E., Collingridge, G.L. & Bashir, Z.I. (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J. Neurosci.*, **24**, 7821–7828.

Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S. & Yuzaki, M. (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **100**, 43–52.

Menniti, F., Chenard, B., Collins, M., Ducat, M., Shalaby, I. & White, F. (1997) CP-101,606, a potent neuroprotectant selective for forebrain neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **331**, 117–126.

Monier, C., Chavane, F., Baudot, P., Graham, L.J. & Fregnac, Y. (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron*, **37**, 663–680.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, **12**, 529–540.

Neyton, J. & Paoletti, P. (2006) Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *J. Neurosci.*, **26**, 1331–1333.

Paoletti, P. & Neyton, J. (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **7**, 39–47.

Rumbaugh, G. & Vicini, S. (1999) Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.*, **19**, 10 603–10 610.

Shu, Y., Hasenstaub, A. & McCormick, D.A. (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, **423**, 288–293.

Sucher, N.J., Akbarian, S., Chi, C.L., Leclerc, C.L., Awobuluyi, M., Deitcher, D.L., Wu, M.K., Yuan, J.P., Jones, E.G. & Lipton, S.A. (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J. Neurosci.*, **15**, 6509–6520.

Thomas, C.G., Miller, A.J. & Westbrook, G.L. (2006) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, **95**, 1727–1734.

Tongiorgi, E., Ferrero, F., Cattaneo, A. & Domenici, L. (2003) Dark-rearing decreases NR2A N-methyl-D-aspartate receptor subunit in all visual cortical layers. *Neuroscience*, **119**, 1013–1022.

Tovar, K.R. & Westbrook, G.L. (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J. Neurosci.*, **19**, 4180–4188.

Toyoda, H., Zhao, M.G. & Zhuo, M. (2005) Roles of NMDA receptor NR2A and NR2B subtypes for long-term depression in the anterior cingulate cortex. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 485–494.

Wassef, A., Baker, J. & Kochan, L.D. (2003) GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J. Clin. Psychopharmacol.*, **23**, 601–640.

Wehr, M. & Zador, A.M. (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*, **426**, 442–446.

Weitlauf, C., Honse, Y., Auberson, Y.P., Mishina, M., Lovinger, D.M. & Winder, D.G. (2005) Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.*, **25**, 8386–8390.

Yang, S.N., Tang, Y.G. & Zucker, R.S. (1999) Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[Ca2^{+}]i$ elevation. *J. Neurophysiol.*, **81**, 781–787.

Yang, J., Woodhall, G.L. & Jones, R.S. (2006) Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. *J. Neurosci.*, **26**, 406–410.

Yoshimura, Y., Ohmura, T. & Komatsu, Y. (2003) Two forms of synaptic plasticity with distinct dependence on age, experience, and NMDA receptor subtype in rat visual cortex. *J. Neurosci.*, **23**, 6557–6566.

Zhao, M.G., Toyoda, H., Lee, Y.S., Wu, L.J., Ko, S.W., Zhang, X.H., Jia, Y., Shum, F., Xu, H., Li, B.M., Kaang, B.K. & Zhuo, M. (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*, **47**, 859–872.

© The Authors (2007). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

EJN European Journal of Neuroscience

European Journal of Neuroscience, Vol. 27, pp. 3244–3256, 2008 doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06288.x

Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks

N. Le Roux, M. Amar, A. Moreau, G. Baux and P. Fossier
CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, Gif sur Yvette F-91198, France

Keywords: cortical networks, $GABA_A$ receptors, homeostatic plasticity, long-term potentiation

Abstract

In the cortex, homeostatic plasticity appears to be a key process for maintaining neuronal network activity in a functional range. This phenomenon depends on close interactions between excitatory and inhibitory circuits. We previously showed that application of a high frequency of stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 induces parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons, leading to an unchanged excitation/inhibition (E/I) balance. These coordinated long-term potentiations of excitation and inhibition correspond to homeostatic plasticity of the neuronal networks. We showed here, on the rat visual cortex, that blockade (with gabazine) or overactivation (with 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol) of $GABA_A$ receptors enhanced the E/I balance and prevented the potentiation of excitatory and inhibitory inputs after an HFS protocol. These impairements of the GABAergic transmission led to a long-term depression-like effect after an HFS protocol. We also observed that the blockade of inhibition reduced excitation (by 60%), and conversely, the blockade of excitation decreased inhibition (by 90%). These results support the idea that inhibitory interneurons are critical for recurrent interactions underlying homeostatic plasticity in cortical networks.

Introduction

Layer 5 pyramidal neurons in the cortex elaborate cortical output signals as a function of the balance between excitatory and inhibitory inputs received (Marder & Prinz, 2002). This excitation/inhibition (E/I) balance is closely regulated in order to keep neuronal responsiveness in a functional range. An imbalance was reported to underlie various pathologies, such as epilepsy and schizophrenia (Cline, 2005). The E/I balance of cortical layer 5 pyramidal neurons is dynamically maintained to a set-point composed of 20% excitation and 80% inhibition (Le Roux *et al.*, 2006), whereas inhibitory interneurons represent 20% of the neuronal population of the cortex (Peters & Kara, 1985). These results highlight the particular role of inhibitory interneurons in control of the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

The dynamic equilibrium between strengths of excitatory and inhibitory inputs depends on compensatory changes between excitation and inhibition received by a cell (Turrigiano, 1999; Liu *et al.*, 2007). Deregulation of normal activity (by pharmacological treatment or visual deprivation) induces a normalization or a scaling of this activity (after 24–48 h) through changes of the excitatory synaptic drive (Turrigiano *et al.*, 1998; Maffei *et al.*, 2004, 2006). This phenomenon was described in terms of homeostatic plasticity (Turrigiano & Nelson, 2004; Davis, 2006), which ensures that neurons have the ability to integrate new information, by modification of the strength of their inputs, while a stable E/I ratio is maintained.

Using a method that allows the decomposition of the response of a layer 5 pyramidal neuron, following electrical stimulation in layer 2/3, into its excitatory and inhibitory components (Borg-Graham *et al.*, 1998; Monier *et al.*, 2003), we previously showed that application of a high frequency of stimulation (HFS) protocol induces parallel increases of excitatory and inhibitory inputs received by layer 5 pyramidal neurons (Le Roux *et al.*, 2006). Therefore, the E/I balance was not modified, and this process corresponds to a homeostatic plasticity process that differs from synaptic scaling because it consists of parallel and immediate changes in synaptic drives and requires synaptic *N*-methyl-D-aspartate receptor activation (Le Roux *et al.*, 2007).

Most of the data about homeostatic plasticity come from work on excitatory synapses. However, in the normal functioning brain, the regulation of inhibitory synaptic strength is also important for the timing of the critical period (Freund & Gulyas, 1997; Zilberter, 2000), for the synchronization of neuronal activity (Tamas *et al.*, 2000; McBain & Fisahn, 2001; Freund, 2003), and for learning and memory (Bradler & Barrioneuvo, 1989; Steele & Mauk, 1999). This inhibitory plasticity is also involved in pathological conditions such as drug abuse or epilepsy (Lu *et al.*, 2000; Nugent *et al.*, 2007). Despite this major involvement in the control of normal brain functions, mechanisms responsible for the induction of inhibitory synapse plasticity remain poorly understood (Caillard *et al.*, 1999a,b; Gaiarsa *et al.*, 2002). Moreover, homeostatic plasticity is based on coordinated changes of the strength of excitatory and inhibitory synaptic drives. Therefore, it is crucial to determine some key cellular mechanisms underlying the inhibitory control of activity in conditions where the interactions between excitation and inhibition remain functional.

Our aim was to determine the involvement of $GABA_A$ synaptic drive in the regulation of cortical network activity and the homeostatic potentiation that occurred. We found that increasing $GABA_A$ receptor activation induced a disruption of the E/I balance. We show that any deregulation of the GABAergic system, due to overactivation or blockade of $GABA_A$ receptors, prevents normal plasticity processes induced by HFS [usually used to induce long-term potentiation (LTP)] and leads to depression of excitatory and inhibitory inputs on the layer

Correspondence: Dr N. Le Roux, as above.
E-mail: leroux@nbcm.cnrs-gif.fr

Received 5 December 2007, revised 10 April 2008, accepted 22 April 2008

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

5 pyramidal neuron, a long-term depression-like effect ordinarily induced by a specific protocol of stimulation.

Materials and methods

Slice preparation

Parasagittal slices containing primary visual cortex were obtained from 18- to 25-day-old Wistar rats. In accordance with the guidelines of the American Neuroscience Association, a rat was decapitated, and its brain was quickly removed and placed in chilled (5 °C) artificial cerebrospinal extracellular solution. Slices of 250 μm thickness were obtained from the primary visual cortex, using a vibratome, and then incubated for at least 1 h at 36 °C in a solution containing: 126 mM NaCl, 26 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose, 2 mM $CaCl_2$, 1.5 mM KCl, 1.5 mM $MgSO_4$, and 1.25 mM KH_2PO_4 (pH 7.5, 310/330 mOsm). This solution was bubbled continuously with a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2.

Electrophysiological recordings and cell identification

Slices were placed on the X–Y translation stage of a Zeiss microscope, equipped with a video-enhanced differential interference contrast system, and perfused continuously. The optical monitoring of the patched cell was achieved with standard optics using a 40× long-working-distance water immersion lens. Layer 5 pyramidal neurons, identified from the shape of their soma and primary dendrites and from their current-induced excitability pattern, were studied using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Somatic whole-cell recordings were performed at room temperature using borosilicate glass pipettes (of 3–5 MΩ resistance in the bath) filled with a solution containing: 140 mM potassium gluconate, 10 mM HEPES, 4 mM ATP, 2 mM $MgCl_2$, 0.4 mM GTP, and 0.5 mM EGTA (pH 7.3, adjusted with KOH, 270–290 mOsm).

Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 1D (Axon Instruments, USA), filtered by a low-pass Bessel filter with a cut-off frequency set at 2 kHz, and digitally sampled at 4 kHz. The membrane potential was corrected off-line by about −10 mV to account for the junction potential. Estimation of the access resistance (R_s) is critical for the quantitative evaluation of the relative change of input conductance in response to synaptic activation. After capacitance neutralization, bridge balancing was done on-line under current-clamp conditions, which provided an initial estimate of R_s. The R_s value was checked and revised, as necessary off-line, by fitting the voltage response to a hyperpolarizing current pulse with the sum of two exponentials. Under voltage-clamp conditions, the holding potential was corrected off-line using this R_s value. Only cells with a resting membrane potential more negative than −55 mV and allowing recordings with an R_s value lower than 25 MΩ were kept for further analysis. The firing behavior of neurons was determined in response to depolarizing current pulses ranging from −100 to 200 pA under current-clamp conditions.

The stimulating electrodes were positioned in layer 2/3. Electrical stimulations (1−10 μA, 0.2 ms duration) were delivered in this layer using 1 MΩ impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT, WPI). The intensity of the stimulation was adjusted in current-clamp conditions to induce a subthreshold postsynaptic response due to coactivation of excitatory and inhibitory circuits. Responses with antidromic spikes were discarded. Under voltage-clamp conditions, the frequency of stimulation was 0.05 Hz, and five to eight trials were repeated for a given holding potential.

A control recording was made after 15 min of patch-clamp equilibration at 0.05 Hz, and then drugs were continuously perfused for 20 min; a 'drug recording' was made in the same conditions. We next applied an HFS protocol in order to induce long-term modifications of synaptic strengths in the recruited circuits. The HFS protocol was elicited with theta burst stimulation, which is known to induce LTP at the synaptic level. It consists of three trains of 13 bursts applied at a frequency of 5 Hz, each burst containing four pulses at 100 Hz (Abraham & Huggett, 1997). Recordings were made at 0.05 Hz after 15, 30, 45 and 60 min of HFS protocol application.

Drugs

Agonist and antagonists of $GABA_A$ receptors [bicuculline, 4,5,6, 7-terahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridine-3-ol (THIP or Gaboxadol) and gabazine (GBZ, SR95531), purchased from Sigma (St Louis, MO, USA)], were dissolved in the perfusate for at least 15 min before recordings.

Synaptic responses analysis

Data were analysed off-line with specialized software (Acquis1™ and Elphy™: written by Gérard Sadoc, Biologic UNIC–CNRS, France). The method is based on the continuous measurement of conductance dynamics during stimulus-evoked synaptic response, as primarily described *in vivo* on cat cortex (Borg-Graham *et al.*, 1998; Monier *et al.*, 2003) and recently validated on rat visual cortex (Le Roux *et al.*, 2006). This method has received further validation on other experimental models (Shu *et al.*, 2003; Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006; Cruikshank *et al.*, 2007). Evoked synaptic currents were measured and averaged at a given holding potential. In current–voltage (*I–V*) curves for every possible delay (t), the value of holding potential (V_h) was corrected (V_{hc}) for the ohmic drop due to the leakage current through R_s by the equation: $V_{hc}(t) = V_h(t) - I(t) \times R_s$. An average estimate of the input conductance waveform of the cell was calculated from the best linear fit (mean least square criterion) of the *I–V* curve for each delay (t) following the stimulation onset. Only cells showing a Pearson correlation coefficient for the *I–V* linear regression higher than 0.95 between −90 and −40 mV were considered for calculation of the conductance change of the recorded pyramidal neuron from the slope of the linear regression.

The evoked synaptic conductance term [$g_T(t)$] was derived from the input conductance by subtracting the resting conductance (g_{rest}). Under our experimental conditions, the global spontaneous activity was very weak, and thus the synaptic activity at rest was null. Consequently, the g_{rest} value was estimated 90 ms before the electrical stimulation. The apparent reversal potential of the synaptic current at the soma [$E_{syn}(t)$] was taken as the voltage abscissa of the intersection point between the *I–V* curve obtained at a given time (t) and that determined at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, $E_{syn}(t)$ characterizes the stimulation-locked dynamics of the balance between excitation and inhibition.

Decomposition of the synaptic conductance

To decompose the global evoked synaptic conductance [$g_T(t)$] into excitatory and inhibitory components [$g_E(t)$ and $g_I(t)$], we used the following simplifications:

$$I_{syn}(t) = g_E(t)[E_{syn}(t) - E_{exc}] + g_I(t)\,[E_{syn}(t) - E_{inh}]$$

and

$$g_T(t) = g_E(t) + g_I(t)$$

where $I_{syn}(t)$ is the total synaptic current, $E_{syn}(t)$ is the apparent reversal potential at the soma (see the previous paragraph), $g_E(t)$ and

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

$g_I(t)$ are excitatory and inhibitory conductances respectively, and E_{exc} and E_{inh} are the reversal potentials for excitation and inhibition. Values of these reversal potentials were equal to 0 mV for excitation (E_{exc}) and to −80 mV for inhibition (E_{inh}), lumping the combined effects of the activation of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptors in a single inhibitory component potential (Anderson *et al.*, 2000; Borg-Graham, 2001; Monier *et al.*, 2003, 2008). The value of −80 mV used in the decomposition method is the reversal potential of $GABA_A$ (and not an intermediate value between $GABA_A$ and $GABA_B$), because in the presence of QX314 (which blocks K^+ efflux), no significant variation of the synaptic response was observed. Moreover, Monier *et al.* (2008) showed that the $GABA_B$ conductance change never exceeded more than 2% of the global conductance change.

We showed that the *I–V* curve in the presence of excitatory synaptic transmission blockers (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, D-AP5) was linear between −80 and +10 mV, with a reversal potential equal to −80 mV (Le Roux *et al.*, 2006). In the presence of bicuculline, which blocks inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron, the *I–V* curve for excitation is linear between −80 and +10 mV, with a reversal potential equal to 0 mV (data not shown), as already shown by other studies (Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006). Under our experimental conditions of stimulation of cortical layers leading to subthreshold postsynaptic responses, $E_{syn}(t)$, which was extrapolated from *I–V* curves, took any intermediate value between −80 and −40 mV (see the supplementary data of Le Roux *et al.*, 2006), i.e. within the limits of our voltage excursion (−90 to −40 mV) corresponding to the linearity of *I–V* curves and between the respective values of E_{inh} and E_{exc} in such a way that the mathematical conditions of the oversimplification used to calculate $g_I(t)$ and $g_E(t)$ were fulfilled.

Like all somatic recordings, our recordings do not allow rigorous estimates of synaptic events in the distal dendrites, and the conductance estimates are ratios of the overall excitatory and inhibitory drives contained in the local network stimulated (Haider *et al.*, 2006). However, our measurements give relative changes in conductance magnitude that reflect the cumulative contributions of excitation and inhibition arriving at proximal portions of the neuron. These relative conductance changes at the somatic level define a narrow window over which input integration and spike output can occur (Higley & Contreras, 2006).

To quantify the synaptic conductance changes, the integral (Int) over a time window of 200 ms was calculated for the total conductance change ($Intg_T$) and for the excitatory and inhibitory conductance changes ($Intg_E$ and $Intg_I$, respectively). The contribution of each component was expressed by the ratio of its integral value ($Intg_E$ or $Intg_I$) to that of total conductance change ($Intg_T$).

Reconstitution of the membrane potential

The dynamics of the membrane potential (V_{recT}) were reconstituted from the experimentally derived excitatory and inhibitory conductance profiles, on the basis of the prediction given by the combination of the different synaptic activation sources:

$$\frac{dV_m(t)}{dt} = \frac{g_{rest} + gT(t)}{\tau g_{rest}}\left[\frac{g_{rest}E_{rest} + gT(t)E_{syn}(t)}{g_{rest} + gT(t)} - V_m(t)\right]$$

where τ is the membrane time constant measured at rest by injecting a 50 pA hyperpolarizing current step, and E_{rest} is the resting potential.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard deviation of the mean of *n* cells. Statistical analyses were performed using the parametrical *t*-test for paired samples. In this latter case, data were expressed as percentages of control values. Data were considered to be statistically significant for $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, and $P \leq 0.001$.

Results

Effects of the blockade of $GABA_A$ receptors on the E/I balance

To further characterize the involvement of $GABA_A$ receptors in the homeostatic regulation process of the E/I balance in the visual cortex that has been previously reported (Le Roux *et al.*, 2006), we first blocked $GABA_A$ receptors using GBZ, a specific blocker of $GABA_A$ receptors. We used two concentrations of GBZ that do not fully block $GABA_A$ receptors (Cope *et al.*, 2005) in order to determine the limits within which the inhibitory control of the E/I balance remains functional.

Representative recordings of current responses of a layer 5 pyramidal neuron to layer 2/3 stimulations are presented in Fig. 1A under control conditions and 20 min after application of 30 nM GBZ, a low concentration that is supposed to block extrasynaptic $GABA_A$ receptors (Cope *et al.*, 2005). The total conductance change (g_T) of the pyramidal neuron (Fig. 1A, medium traces), calculated from current recordings (see Materials and methods), did not significantly change in the presence of GBZ. Decomposition of g_T into its excitatory and inhibitory components (g_E and g_I, respectively) showed no significant variation of either component (Fig. 1A, lower traces). This observation was confirmed by the statistical analysis of the neuronal population ($n = 11$). Relative conductance changes are presented in Fig. 1B (left part): $Intg_T$, $Intg_E$ and $Intg_I$ were not significantly modified. Under these conditions, excitatory and inhibitory conductance changes, expressed as percentages of total conductance change, were not significantly changed in the presence of GBZ (Fig. 1B, right part). Consequently, the E/I ratio is not significantly modified (from 22.3 ± 3% to 25.3 ± 3%).

Application of 200 nM GBZ induced a significant decrease of $Intg_I$ by 38.8 ± 1.2% and an increase of $Intg_E$ by 56.1 ± 2.2% ($n = 17$), as compared to control values (Fig. 1C and D). Consequently, the E/I ratio was significantly enhanced ($P < 0.001$) from 17.8%/82.2% to 38.4%/61.6% in the presence of 200 nM GBZ (Fig. 1D).

Effects of overactivation of $GABA_A$ receptors on the E/I balance

We next overstimulated the GABAergic system by perfusing neurons with THIP, an agonist of $GABA_A$ receptors (Drasbek *et al.*, 2007).

For a given concentration of agonist (10 μM), the amplitude of the current elicited by THIP is higher than that elicited by GABA (data not shown). This indicates that THIP, as compared to GABA, is a better agonist of $GABA_A$ receptors, as previously reported (Cope *et al.*, 2005; Drasbek & Jensen, 2006; Liang *et al.*, 2006).

A low concentration of THIP (200 nM) did not affect current responses to layer 2/3 stimulation, or global conductance change and its excitatory and inhibitory components (Fig. 2A and B). The statistical analysis of the neuronal population ($n = 20$) shows that the total, excitatory and inhibitory conductance changes were not significantly modified ($P > 0.05$, $n = 20$). Under these conditions, the E/I ratio remained unchanged (Fig. 2B).

In the presence of 10 μM THIP, the current responses and the total, excitatory and inhibitory conductance changes were decreased (Fig. 2C). This observation was confirmed by the statistical analysis of the neuronal population ($n = 24$, Fig. 2D). $Intg_T$ was decreased

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

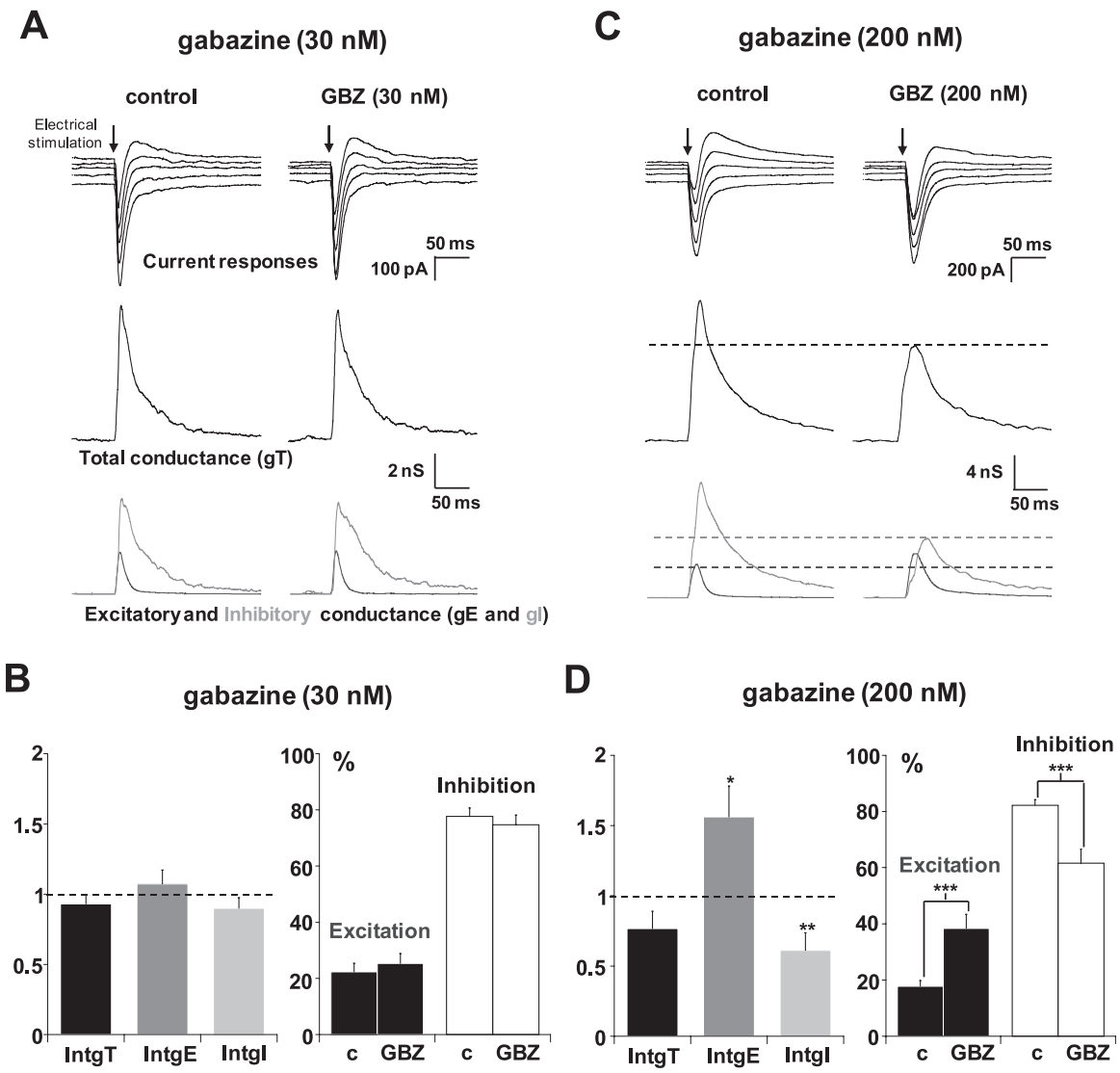


FIG. 1. Effects of $GABA_A$ receptor blockade on the excitation/inhibition (E/I) balance of layer 5 pyramidal neurons. (A) The left column shows a representative recording in the control condition and the right column shows a recording made after application of 30 nM gabazine (GBZ) for 20 min. Upper traces: current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3; holding potentials scaled from −75 mV (bottom trace) to −55 mV (steps equal to 5 mV). Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (g_T). Lower traces: decomposition of g_T in excitatory and inhibitory conductance changes (g_E, dark gray; g_I, light gray). No significant variations of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed. (B) Left part: relative changes (as compared to control) of $Intg_T$ (black bars), $Intg_E$ (dark gray bars) and $Intg_I$ (light gray bars) after application of 30 nM GBZ (n = 11). Right part: excitation (black bars) and inhibition (white bars) conductance changes expressed as percentages of the total conductance change. The E/I ratio remains unchanged. (C) The left column shows a representative recording in the control condition and the right column shows a representative recording after application of 200 nM GBZ for 20 min. In the presence of 200 nM, the inward current was increased, whereas the outward component was decreased. (D) Left part: relative changes (as compared to control) of $Intg_T$ (black bars), $Intg_E$ (dark gray bars) and $Intg_I$ (light gray bars) after application of 200 nM GBZ (n = 17). Right part: excitation (black bars) and inhibition (white bars) conductance changes expressed as percentages of the total conductance change in the control condition (left, c) and in the presence of GBZ (right). Excitation increased from 17.8 ± 2.5% of the total conductance change to 38.5 ± 5.0%, and inhibition decreased from 82.2 ± 2.5% to 61.5 ± 5.0%. ***P < 0.001, **P < 0.01 and *P < 0.05, t-test.

from 446.8 ± 82.7 a.u. (arbitrary units) for the control to 267.6 ± 50.9 a.u. in the presence of THIP, $Intg_E$ from 65.2 ± 11.2 a.u. to 56.3 ± 11.9 a.u., and $Intg_I$ from 381.6 ± 73.6 a.u. to 211.3 ± 42.3 a.u. Excitatory conductance change, expressed as percentage of total conductance change, was significantly increased from 16.9 ± 2.0% for control to 22.8 ± 2.4% in the presence of THIP, and the percentage of inhibition was significantly decreased from 83.1 ± 2.0% to 77.2 ± 2.4% (Fig. 2D). Consequently, the E/I ratio was slightly but significantly increased by 5.9% (P < 0.01, t-test, n = 24).

Homeostatic potentiation induced by application of an HFS protocol in layer 2/3

We previously described a homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons by application of an HFS protocol in layer 2/3. Marked increases of global, excitatory and inhibitory conductance changes were observed (Le Roux *et al.*, 2006). Similar results were obtained in a new series of experiments (Fig. 3A). Statistical analysis of the global population (n = 19, Fig. 3B) shows that the total conductance change was increased by 50%, due to

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

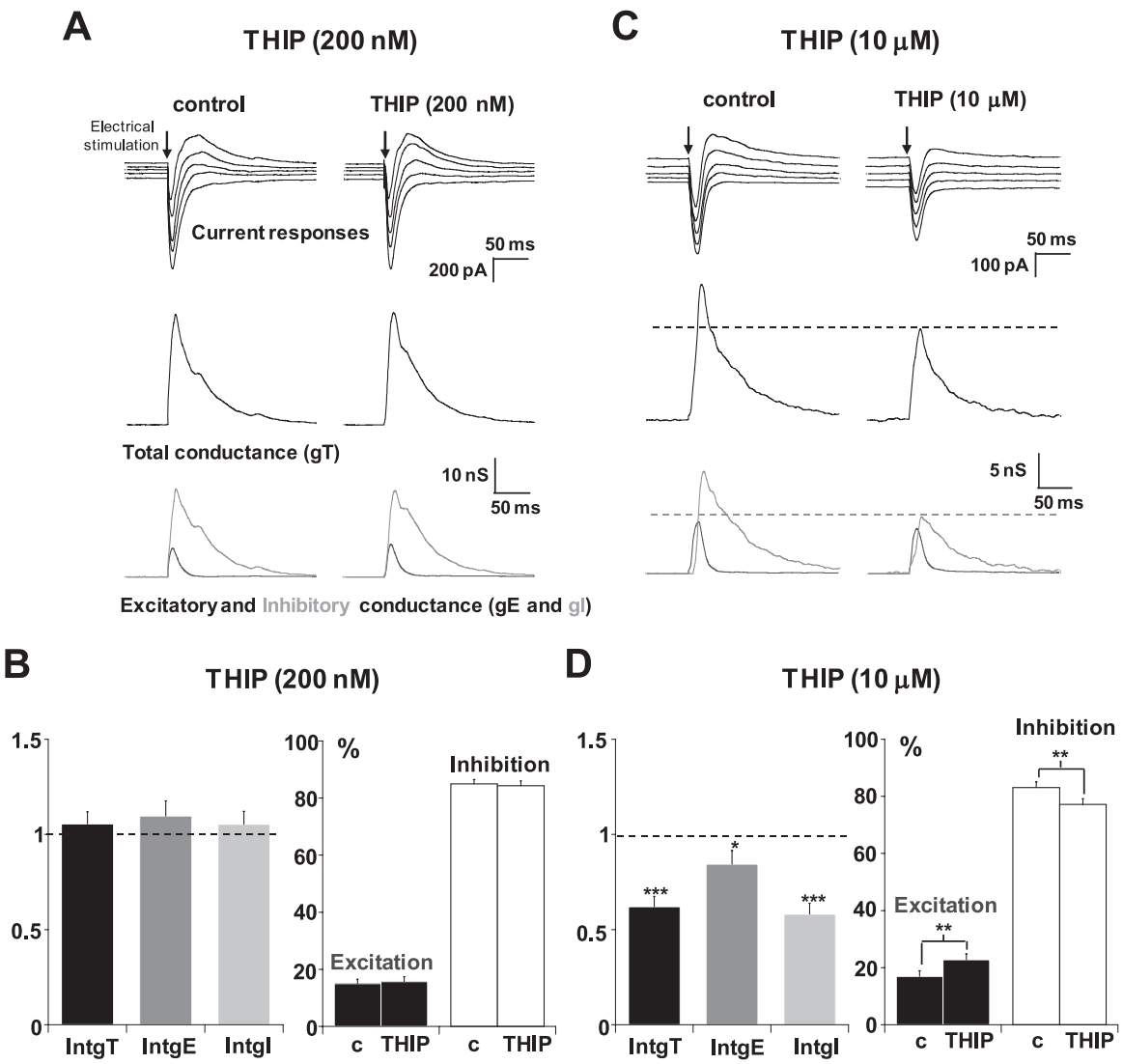


FIG. 2. Effects of $GABA_A$ receptor activation on the excitation/inhibition balance of layer 5 pyramidal neurons. (A and C) Left columns show representative recordings in the control condition, and right columns show recordings made after 20 min of application of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridin-3-ol (THIP) (200 nM or 10 μM, respectively). Upper traces: current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3; holding potentials scaled from −70 mV (bottom trace) to −50 mV (steps equal to 5 mV). Medium traces: decomposition of the responses in total conductance changes (g_T). Lower traces: decomposition of g_T in excitatory (g_E, dark gray) and inhibitory (g_I, light gray) conductance changes. Note that the current responses and the conductance changes remain unchanged in the presence of 200 nM THIP (A), whereas they are decreased in the presence of 10 μM THIP (C). (B) The left part shows relative changes (as compared to control) of $Intg_T$ (black bars), $Intg_E$ (dark gray bars) and $Intg_I$ (light gray bars) after application of 200 nM THIP (n = 20). The right part shows excitation (black bars) and inhibition conductances (white bars) expressed as percentages of the total conductance change (c: control). No significant changes of excitation and inhibition were observed. (D) Left part: relative changes (as compared to control) of $Intg_T$ (black bars), $Intg_E$ (dark gray bars) and $Intg_I$ (light gray bars) after application of 10 μM THIP (n = 24). Right part: excitation (black bars) and inhibition conductances (white bars) expressed as percentages of the total conductance change (c: control on the left and in the presence of THIP on the right). Excitation was increased from 16.9 ± 2.0% to 22.8 ± 2.4% and inhibition was decreased from 83.1 ± 2.0% to 77.2 ± 2.4%. ***P < 0.001, **P < 0.01 and *P < 0.05, t-test.

parallel increases in excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 3C) lasting for 1 h. This results in an unchanged E/I ratio.

Lack of time-dependent effects of THIP and GBZ on the E/I balance

Our aim was to determine the involvement of $GABA_A$ synaptic drive in the regulation of cortical activity and the homeostatic potentiation that occurred after the application of an HFS protocol in layer 2/3. To be confident that possible long-lasting changes of the excitatory and inhibitory conductances resulted from the HFS stimulation, and not to a time-dependent effect of the drugs, we determined the E/I balance in the presence of THIP or GBZ, for 1 h without application of HFS.

After a first 20 min recording in the presence of 10 μM THIP, the HFS protocol was omitted and recordings were performed 15, 30, 45 and 60 min later. Representative current recordings are shown in Fig. 4A, with the corresponding analysis of the total conductance change and of its excitatory and inhibitory components. No time-dependent effect of THIP appeared. Moreover, the statistical analysis of the neuronal population (n = 5, Fig. 4B) shows that the E/I balance did not change further with time and was equal to the value obtained in Fig. 2D.

The same experimental protocol was applied in the presence of 200 nM GBZ. Current recordings were unchanged (not shown), and the statistical analysis of the neuronal population (n = 5, Fig. 4C) reveals the lack of a significant time-dependent effect of GBZ on the E/I balance for 1 h.

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

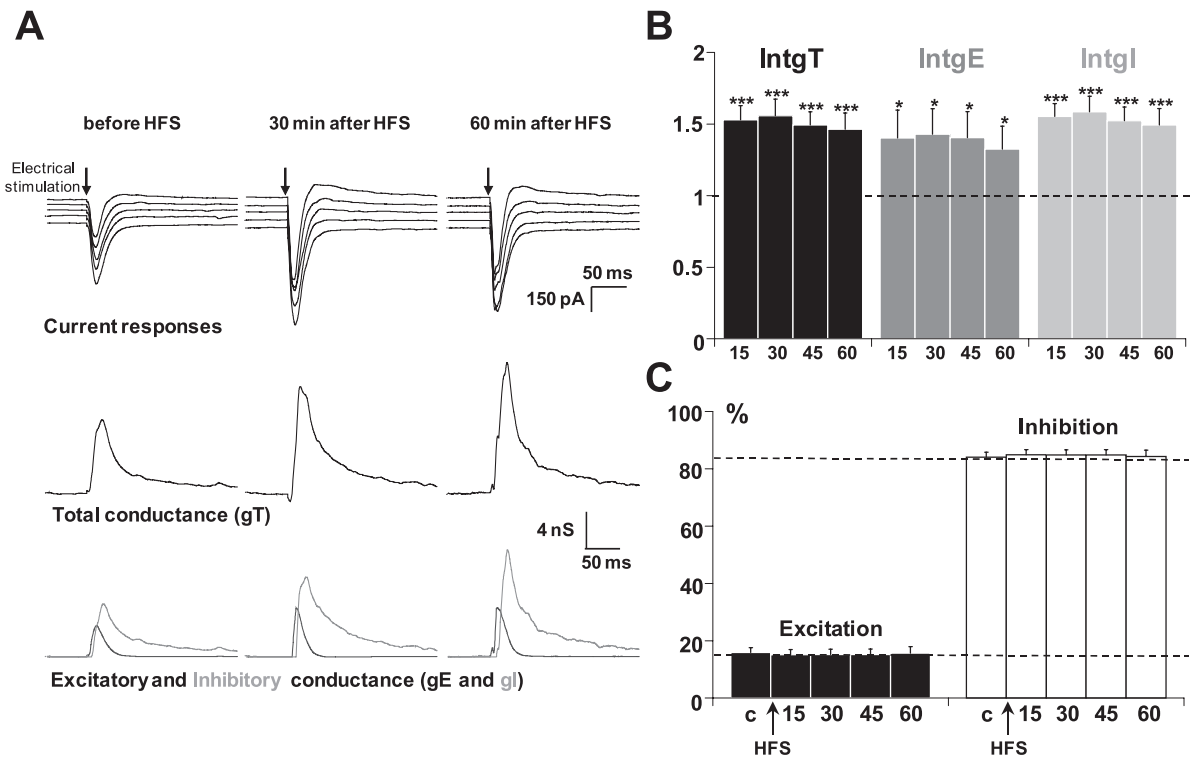


FIG. 3. Effects of the application of a high frequency of stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 on the excitation/inhibition balance of layer 5 pyramidal neurons. (A) The left column shows representative recordings from the statistical analysis of $n = 19$ experiments in control conditions, the middle column shows recordings made 30 min after application of an HFS protocol in layer 2/3, and the right column shows recordings made 60 min after application of HFS. Upper traces: current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. The imposed membrane potential ranged from −55 to −75 mV. Note that the amplitude of current responses was increased after HFS application. Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (g_T). Lower traces: decomposition of g_T in excitatory and inhibitory conductance changes (g_E, dark gray; g_I, light gray). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased after HFS application. (B) Relative changes (as compared to control) of $Intg_T$ (black bars), $Intg_E$ (dark grey bars) and $Intg_I$ (light gray bars) after application of an HFS protocol in layer 2/3 in control conditions ($n = 19$). ***$P < 0.001$ and *$P < 0.05$, *t*-test. (C) Relative contributions of excitation (black) and inhibition (white) conductance changes to the total conductance change, various times (15, 30, 45 and 60 min) after HFS (c: control before HFS protocol).

Potentiation of excitatory and inhibitory inputs induced by an HFS protocol is prevented by the blockade of $GABA_A$ receptors

An HFS protocol performed in the presence of 30 nM GBZ induced a time-dependent depression of $Intg_T$ and $Intg_I$ (Fig. 5A and B). Sixty minutes after application of the HFS protocol, $Intg_T$ and $Intg_I$ were decreased by 34.1 ± 8.1% and 39.9 ± 5.9% respectively ($n = 13$), whereas $Intg_E$ remained almost stable. After application of the HFS protocol, the E/I ratio was significantly increased ($P < 0.01$, *t*-test) from 25.9%/74.1% to 36.1%/63.9% by GBZ (Fig. 5C).

An HFS protocol performed in the presence of 200 nM GBZ produced a marked depression of $Intg_T$ and $Intg_I$ (Fig. 5D and E). Sixty minutes after application of the HFS protocol, excitation was increased by 33%, whereas inhibition was decreased by the same amount ($n = 15$, Fig. 5F), leading to an increased E/I ratio.

Potentiation of excitatory and inhibitory inputs induced by an HFS protocol is prevented by overactivation of $GABA_A$ receptors

Application of an HFS protocol in the presence of 200 nM THIP induced, after 15 min, a sustained depression of the integrals of total as well as of inhibitory and excitatory conductance changes (Fig. 6A for representative recordings, and Fig. 6B for statistical analysis of the global population, $n = 18$). $Intg_E$, when expressed as a percentage of $Intg_T$, was increased by 6%, whereas $Intg_I$ was decreased by 6%, after 60 min (Fig. 6C). This resulted in a slight increase of the E/I ratio after HFS application.

In the presence of 10 μM THIP, application of an HFS protocol in layer 2/3 failed to potentiate excitatory and inhibitory conductance changes. On the contrary, a time-dependent depression of these conductance changes was observed (Fig. 6D for representative recordings, and Fig. 6E for statistical analysis of the global population, $n = 12$). Sixty minutes after HFS application, the relative conductance changes of $Intg_E$ and $Intg_I$ (as compared to control before the HFS protocol) were significantly decreased by about 20% ($P < 0.05$) and 35% ($P < 0.001$), respectively. The more important depression of inhibition (expressed as percentage of total conductance change) than of excitation (Fig. 6F) resulted in a significant enhancement of the E/I ratio by 4% ($P < 0.01$, *t*-test).

These results show that whatever the concentration of THIP used, an HFS protocol fails to induce parallel potentiations of excitatory and inhibitory inputs but induces depressions of these inputs on layer 5 pyramidal neurons. Moreover, the E/I balance was increased, indicating that the homeostatic control of plasticity changes (potentiation or depression) was lost.

Interactions between excitatory and inhibitory circuits and their plasticity

The plasticity observed in this phenomenon can depend on modifications of the strength of synapses located either in neuronal circuits

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

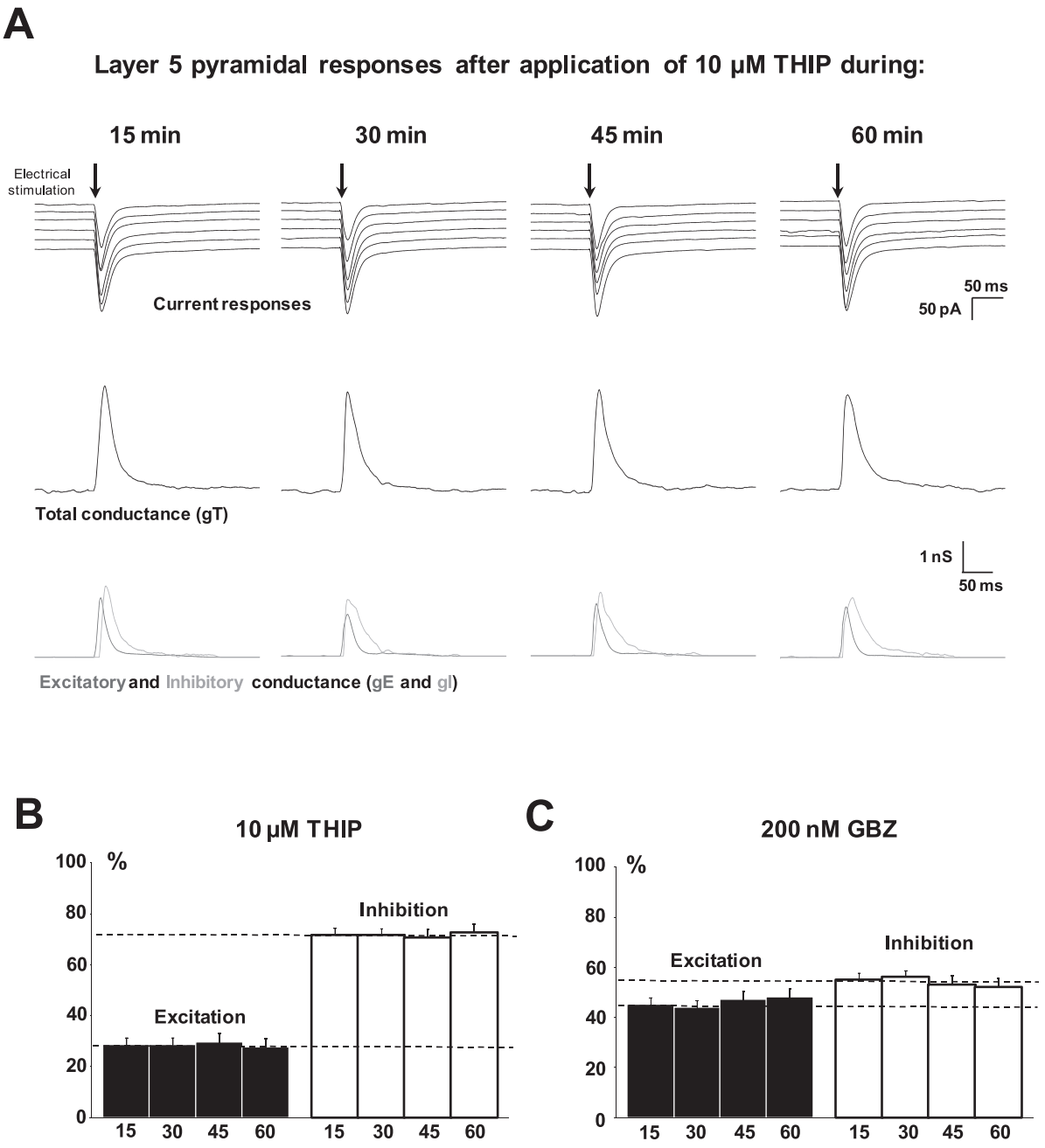


FIG. 4. Lack of time-dependent effect of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridin-3-ol (THIP) or gabazine (GBZ) on the excitation/inhibition (E/I) balance. (A) Representative recordings and corresponding conductance determinations in the presence of 10 µM THIP applied for 1 h after a first 20 min period of application. Upper traces: current responses of a representative layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. The imposed membrane potential ranged from −55 to −75 mV. Medium traces: decomposition of the responses in total conductance (g_T). Lower traces: decomposition of g_T in excitatory and inhibitory conductance (g_E, dark gray; g_I, light gray). No change in total, inhibitory or excitatory conductance was observed during THIP application. (B) Relative contributions of excitation (black) and inhibition (white) conductance changes to the total conductance change. Recordings were performed 15, 30, 45 or 60 min after a control recording (t = 0) made 20 min after application of 10 µM THIP. Bars represent the ratio between recordings after 15, 30, 45 or 60 min and the t = 0 control recording. Note that the E/I ratio remained stable. (C) Relative contributions of excitation (black) and inhibition (white) conductance changes to the total conductance change during 60 min in the presence of 200 nM GBZ. No significant change of the E/I ratio was observed.

upstream of layer 5 pyramidal neurons, activated by the stimulation applied in layer 2/3, or on the layer 5 pyramidal neuron itself. The blockade of excitation with 50 µM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (the selective inhibitor of á-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionic acid receptors) suppressed the excitatory conductance change of the response (Fig. 7A). Under this condition, a reduction by 90% of the inhibitory conductance change (91.3 ± 4.8%, n = 6) was observed, indicating that inhibitory afferents recruited by the electrical stimulation in layer 2/3 are mainly disynaptic (inhibitory interneurons activated by afferent glutamatergic neurons). This result suggests that LTP of inhibition may be due to the potentiation of excitatory synapses on inhibitory interneurons.

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

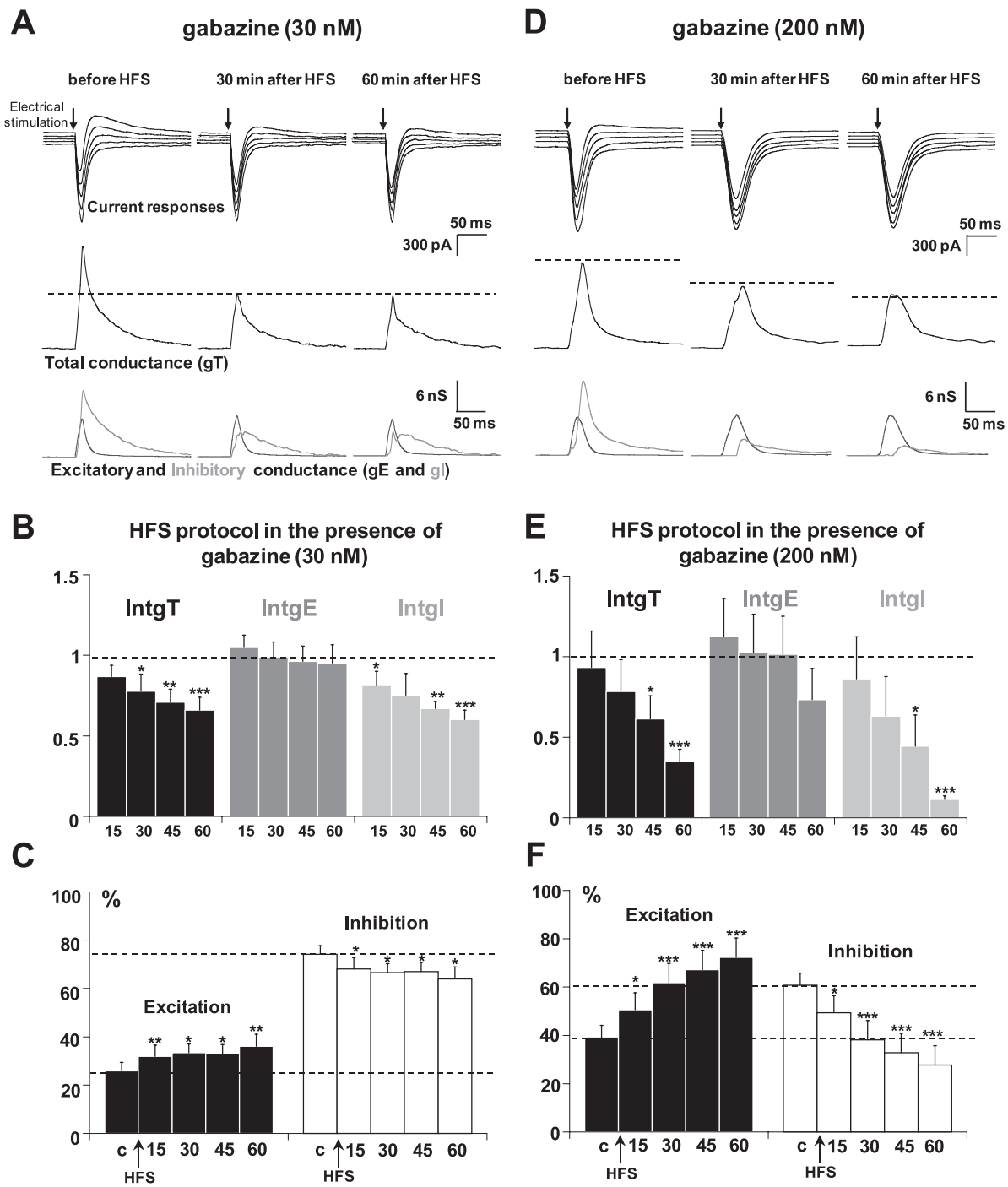


FIG. 5. Effects of a high frequency of stimulation (HFS) protocol in the presence of gabazine (GBZ). (A) The left column shows a representative recording from the statistical analysis of n = 13 experiments in the presence of 30 nM GBZ before HFS application, the middle column shows a recording made 30 min after application of an HFS protocol, and the right column shows a recording made 60 min after application of an HFS protocol in layer 2/3. Upper traces: current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. The imposed membrane potential ranged from −55 to −75 mV. The inward current was not modified, whereas the outward component was decreased. Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (g_T). Lower traces: decomposition of g_T in excitatory and inhibitory conductance changes (g_E, dark gray; g_I, light gray). The total and inhibitory conductance changes were decreased after HFS application. (B) Relative changes (as compared to control) of $Intg_T$ (black bars), $Intg_E$ (dark gray bars) and $Intg_I$ (light gray bars) after an HFS protocol in layer 2/3 (n = 14) in the presence of 30 nM GBZ. ***P < 0.001, **P < 0.01 and *P < 0.05, t-test. (C) Relative contributions of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after application of an HFS protocol in the presence of 200 nM GBZ (c: control before HFS protocol). Note that the excitation/inhibition (E/I) ratio strongly increased. (D–F) Application of an HFS protocol in the presence of 200 nM GBZ (n = 14). The total and inhibitory conductance changes were decreased (D and E) and the E/I ratio was increased (F).

In the presence of 10 μM bicuculline (the selective blocker of GABAergic receptors), the inhibitory component of the response was abolished and the excitatory component was decreased by 60% (Fig. 7B). This surprising result indicates that the strength of excitatory inputs received by a layer 5 pyramidal neuron following stimulation in layer 2/3 also partly depends on functional inhibition in the neuronal network.

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

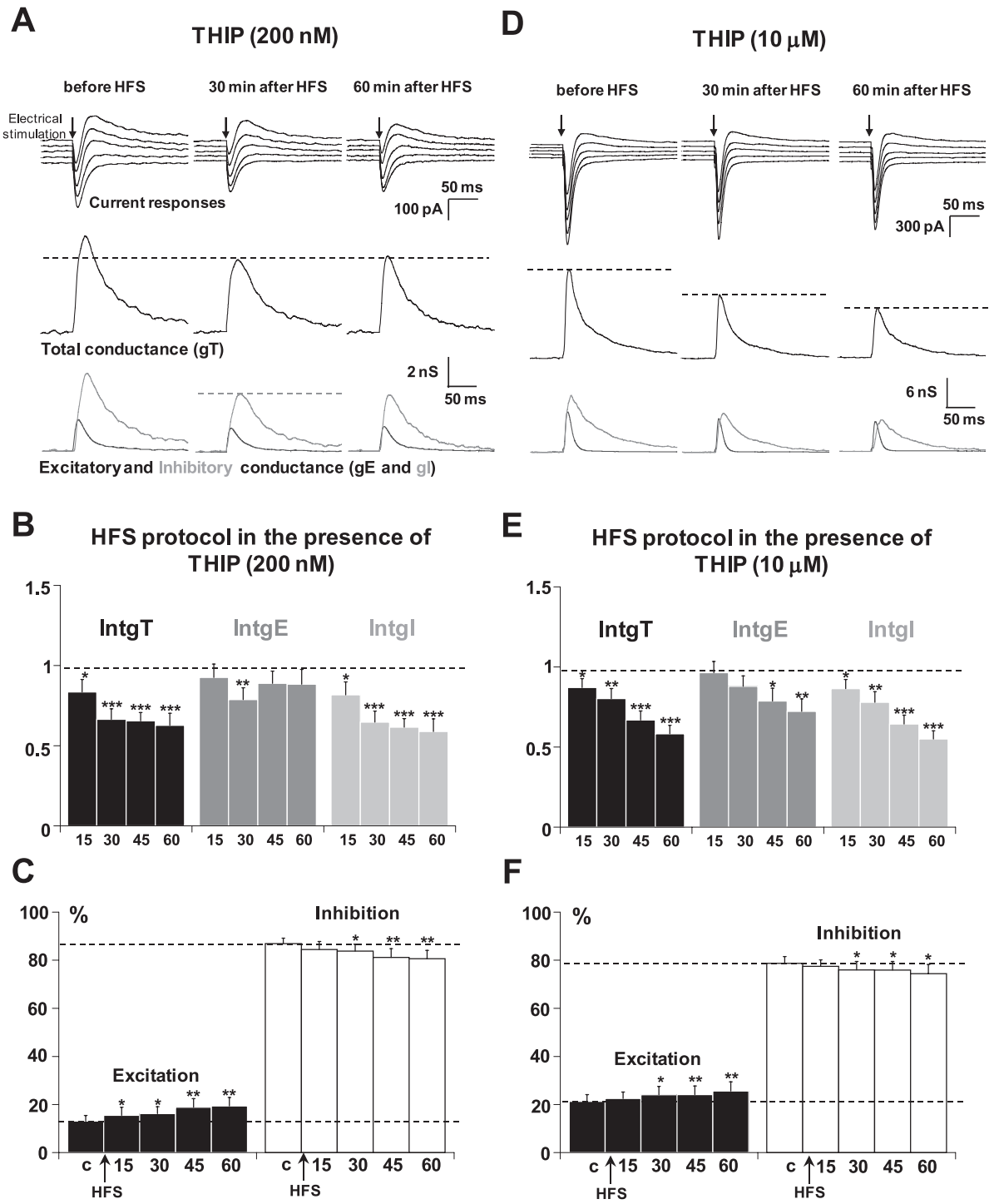


FIG. 6. Effects of a high frequency of stimulation (HFS) protocol in the presence of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridin-3-ol (THIP). (A) The left column shows a representative recording from the statistical analysis of $n = 18$ experiments in the presence of 200 nM THIP before HFS application, the middle column shows a recording made 30 min after application of an HFS protocol, and the right column shows a recording made 60 min after application of HFS in layer 2/3. Upper traces: current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. The imposed membrane potential ranged from −55 to −75 mV. Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (g_T). Lower traces: decomposition of g_T in excitatory and inhibitory conductance changes (g_E, dark gray; g_I, light gray). Total, inhibitory and excitatory conductance changes were decreased after HFS application. (B) Relative changes (as compared to control) of Intg_T (black bars), Intg_E (dark gray bars) and Intg_I (light gray bars) after HFS in layer 2/3 ($n = 18$) in the presence of 200 nM THIP. ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$ and *$P < 0.05$, *t*-test). (C) Relative contributions of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 200 nM THIP (c: control before HFS protocol). Note that the excitation/inhibition (E/I) ratio was increased. (D–F) Application of an HFS protocol in the presence of 10 μM THIP ($n = 16$). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were decreased (D and E) and the E/I ratio was increased (F).

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

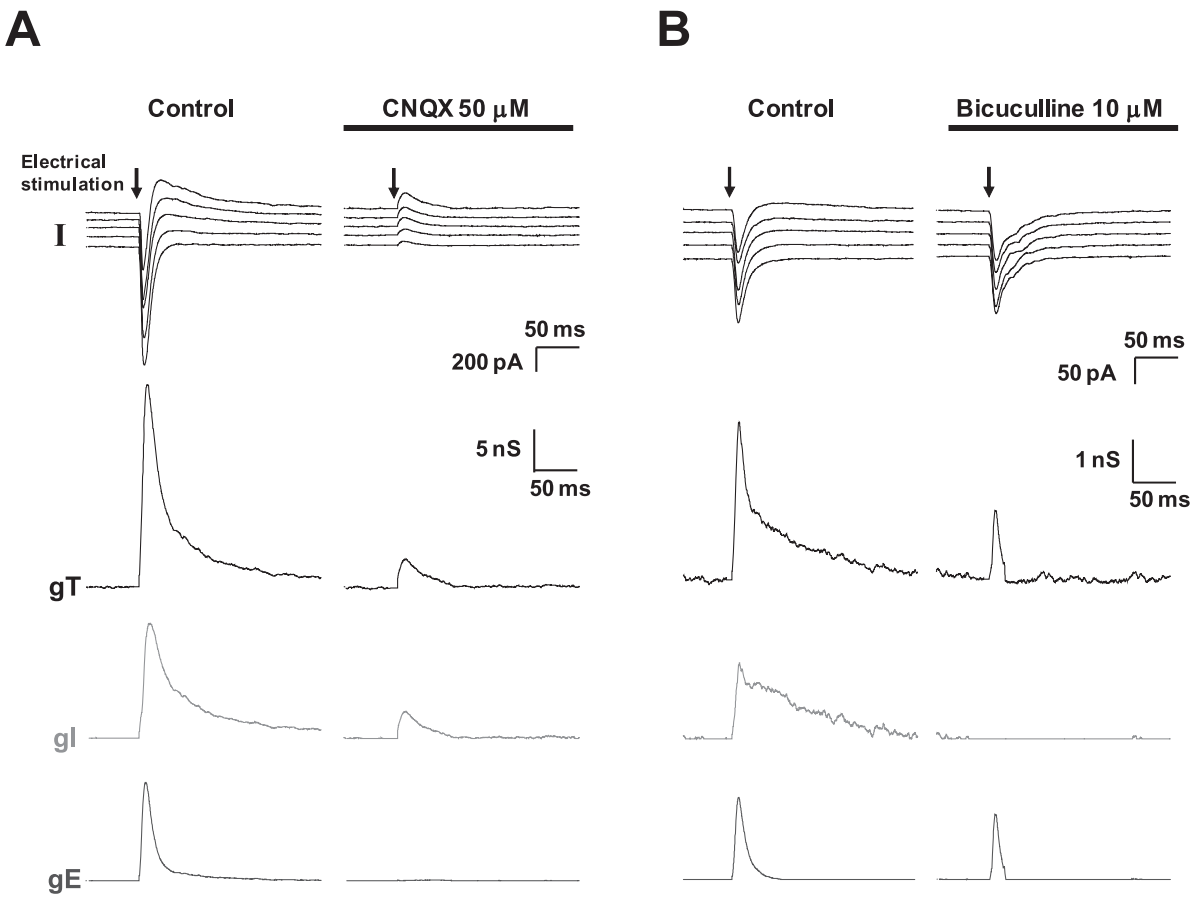


FIG. 7. The inhibition recorded in a layer 5 pyramidal neuron in response to electrical stimulation of layer 2/3 is mainly disynaptic. Upper traces: current responses obtained after stimulation (arrow) of layers 2/3. Medium traces: decomposition of the responses in global conductance change (g_T). Lower traces: decomposition of g_T in excitatory and inhibitory conductance changes. (A) Left column: control conditions. Right column: after the blockade of glutamatergic receptors by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). Note that in the presence of CNQX, the excitatory component of the response was abolished, whereas the inhibitory component was decreased by about 85%, indicating that inhibition is mainly disynaptic. (B) Left column: control conditions. Right column: after the blockade of GABAergic receptors by bicuculline. Note that the inhibitory component was abolished, whereas the excitatory component was decreased by about 60%.

Discussion

Our data show that an HFS protocol applied to layer 2/3 induces homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons, leading to an unchanged E/I ratio, provided that GABAergic receptors are functional. The blockade or the overactivation of these receptors induces the loss of the E/I balance control and prevents the induction of homeostatic potentiation. Although our results indicate that it remains difficult to finely modulate $GABA_A$ receptor activation, it appears that inhibition is closely related to the excitation processes and that those interactions between excitation and inhibition mainly underlie the regulation of cortical network activity. As the E/I balance mainly refers to integrative properties of the apical dendrites of layer 5 pyramidal neurons, our results can be discussed first at the level of presynaptic entries on the pyramidal neuron, in order to question local modulatory effects of the drugs on presynaptic terminals, and second at the level of the cortical organization, because homeostatic potentiation of excitation and inhibition was prevented.

Presynaptic modulation of GABA release

Besides inhibitory connections of interneurons on the distal part of apical dendrites of layer 5 pyramidal neurons, projections of interneurons on the proximal part of the apical dendrite, i.e. on cellular loci where direct modulation of shunting inhibition will be efficient (Wells *et al.*, 2000), are further substantiated by changes of shunting inhibition following an HFS protocol in layer 2/3 that have already been reported (Le Roux *et al.*, 2006). Double bouquet cells and bipolar cells, which have their soma located in layer 2/3, and axons that project on the apical dendrites of layer 5 pyramidal neurons (Markram *et al.*, 2004), could mainly be involved in these inhibitory afferent inputs. Therefore, the activation or the blockade of presynaptic GABA receptors might change inhibitory inputs and shunting inhibition, leading to the loss of the E/I balance in our experiments. However, it has been reported that THIP does not act on the release of GABA in rat cerebral cortex (Maurin, 1988), and that the blockade of GABA receptors with bicuculline facilitated, inhibited or had no effect on GABA release (Arbilla *et al.*, 1979; Kuriyama *et al.*, 1984; Lockerbie & Gordon-Weeks, 1985). Moreover, it has been suggested recently that presynaptic enhancement of GABA release with GBZ might be efficient in rat juvenile cerebellum but disappear in postnatal day (P)15 rats (Trigo *et al.*, 2007), i.e. before the developmental stage (P17–P20) that we used for our experiments. From these observations, presynaptic modulatory effects of THIP or GBZ on GABA release appear to be not very likely.

Recurrent organization through cortical layers

The neocortex is critical for sensation, perception, behavior, and cognition. These functions are ensured by the cortical network. Thus,

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

the regulation of network activity, which depends on the excitatory and inhibitory stimuli received, must be closely regulated, and maintaining a balance between excitation and inhibition is a dynamic process. In the cortex, changes in excitation are rapidly countered by changes in synaptic inhibition within several primary sensory areas (Anderson *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2003; Wehr & Zador, 2003; Wilent & Contreras, 2004; Gabernet *et al.*, 2005; Haider *et al.*, 2006; Le Roux *et al.*, 2006). These compensatory changes underlie the phenomenon of homeostatic plasticity, which ensures that modification of the strength of one component is compensated by coordinated changes of the other (Davis & Bezprozvanny, 2001; Turrigiano & Nelson, 2004), resulting in an unchanged E/I ratio (Le Roux *et al.*, 2006). However, the cellular mechanisms that ensure this balancing are poorly understood. Recurrent inhibitory circuits seem to be well suited to provide this dynamic regulation (Douglas & Martin, 1991; Shu *et al.*, 2003; Maffei *et al.*, 2004; Pouille & Scanziani, 2004; Le Roux *et al.*, 2006). The main hypothesis concerning the mechanisms of this regulation is based on the recurrent organization of the cortex, which produces a robust feed-forward inhibition in response to thalamocortical entries (Agmon & Connors, 1992; Gil & Amitai, 1996; Beierlein *et al.*, 2003; Gabernet *et al.*, 2005; Inoue & Imoto, 2006; Sun *et al.*, 2006). Moreover, recent data suggest a prominent role of feed-forward inhibition in the cortex, to strongly control excitation (Cruikshank *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2007) as well.

Among the different schemes for logical operations performed by interneurons in cortical layers (Kullmann & Lamsa, 2007), our findings are in favor of disynaptic inhibition following electrical stimulation in layer 2/3. Indeed, 90% of inhibition on layer 5 pyramidal neurons is activated by afferent glutamatergic neurons. Morphological observations are in agreement with this functional approach, because layer 5 pyramidal neurons receive inputs both from other layer 5 pyramidal neurons on their proximal basal dendrites (Markram *et al.*, 1997; Silberberg & Markram, 2007) and from layer 2/3 neurons (Thomson & Bannister, 1998), especially from interneurons that project onto the proximal parts of apical dendrites (Cipolloni *et al.*, 1998; Bannister, 2005). As we showed that the blockade of inhibition produces a 60% decrease of excitation on the layer 5 pyramidal neuron, a recurrent connectivity between layer 5 pyramidal neurons and layer 2/3 neurons is relevant. Chandelier cells in layer 2/3 can recruit pyramidal neurons through specialized $GABA_A$ receptors located on the axonal parts of the pyramidal neurons and driving depolarizing signals (Szabadics *et al.*, 2006). Then, similar to the disynaptic inhibition abolished by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, the reduction of the excitatory component in the presence of bicuculline could be due to the blockade of disynaptic recruitment of pyramidal cells by GABAergic chandelier cells. Such a network organization could explain why interneurons, which comprised 20% of the cortical neurons, account for 80% in the E/I balance. This idea is further substantiated by recent data indicating that activity in one pyramidal cell evokes inhibition in another pyramidal cell (Kapfer *et al.*, 2007; Silberberg & Markram, 2007). Excitatory activity in layer 2/3 of the somatosensory cortex has also been shown to specifically recruit a recurrent inhibitory circuit involving somatostatin interneurons located in layers 2/3 and 5. Through this circuit, a single pyramidal cell can cause inhibition of almost 40% of its neighbors (Kapfer *et al.*, 2007).

$GABA_A$ receptors and E/I balance of layer 5 pyramidal neurons

Low concentrations of THIP or GBZ did not change the E/I balance. Thus, it can be assumed that regulatory mechanisms controlling the E/I balance are potent enough to compensate for weak changes in cortical inhibitory activity.

In contrast, the effective blockade or the overactivation of $GABA_A$ receptors led to changes in the strength of the inhibitory synaptic inputs. The blockade of $GABA_A$ receptors did not change the strength of excitatory inputs but decreased inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons, leading to an important enhancement of the E/I balance. It has been shown that an E/I balance equal to 20%/80% corresponds to a set-point control keeping the layer 5 pyramidal neurons and cortical networks within a functional range (Le Roux *et al.*, 2006). This requires at least recurrent connectivity between excitatory and inhibitory neuronal circuits, and this condition is discussed above. Taking into account that 200 nM GBZ markedly increased the E/I balance, we conclude that this blockage of GABA receptors probably disrupts recurrent interactions between excitatory and inhibitory neuronal networks. Conversely, the use of a $GABA_A$ agonist decreased excitation and inhibition, resulting in a weak enhancement (by 5.9%) of the E/I balance. Thus, one can postulate that compensatory interactions between excitatory and inhibitory networks remain functional during $GABA_A$ receptor stimulation.

It is important to note that in the presence of a $GABA_A$ receptor agonist, the inhibitory conductance change was decreased. This can be explained by a switch of GABAergic responses following prolonged $GABA_A$ receptor activation from a hyperpolarizing to a depolarizing response, as observed in mature cortical neurons (Lambert *et al.*, 1991; Staley *et al.*, 1995; Kaila *et al.*, 1997; Taira *et al.*, 1997; Staley & Proctor, 1999; Gulledge & Stuart, 2003). This is probably due to a positive shift of the reversal potential of the Cl^- current as a result of Cl^- accumulation in neurons (Staley *et al.*, 1995; Backus *et al.*, 1998; Dallwig *et al.*, 1999; Frech *et al.*, 1999; Jedlicka & Backus, 2006). Prolonged activation of $GABA_A$ receptor with THIP can also desensitize the receptors and consequently lead to a decrease in the strength of inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons.

$GABA_A$ receptors and homeostatic plasticity

The HFS protocol induced a slight increase of the E/I balance when $GABA_A$ receptors were activated and a strong enhancement of the E/I balance (70%/30%) in the presence of GBZ. These results indicate that impairing the GABAergic transmission suppresses the coordinated processes, assuming homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons (Le Roux *et al.*, 2006), and leads to a long-term depression-like effect instead of the expected LTP. However, taking into account the extent of changes in the E/I balance, it can be assumed that the overactivation of $GABA_A$ receptors prevents the homeostatic control of excitatory and inhibitory neuronal circuits, and that their blockade can largely deregulate the mechanisms of homeostatic plasticity in neuronal networks. This supports the idea that inhibitory interneurons (as already discussed above) are critical for recurrent interactions underlying normal plasticity in cortical networks.

Plasticity of excitatory and inhibitory cortico-cortical inputs

The concept of homeostatic plasticity is based on interactions and coordination between excitatory and inhibitory neuronal circuits. Recent data indicate that inhibition increases linearly with the amount of excitation received by cortical neurons (Anderson *et al.*, 2000; Wehr & Zador, 2003; Wilent & Contreras, 2004). Adjustments of excitatory and inhibitory synaptic strengths have been observed in experiments on visual deprivation, in which changes in excitatory synaptic drive induce compensatory changes in the inhibitory synaptic drive to maintain stable levels of activity in the developing visual cortex (Turrigiano, 1999; Maffei *et al.*, 2004, 2006). Our previous

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

experiments indicate that simultaneous compensatory potentiations of excitation and inhibition are induced after application of an HFS protocol (Le Roux *et al.*, 2006). These results raise the question of the coordinated induction of the plasticity of excitatory and inhibitory synapses. Because the inhibition is mainly disynaptic, it can be proposed that the feed-forward inhibitory pathway involves at least upstream excitatory fibers originating from layer 5 that synapse on layer 2/3 interneurons. Such a scheme was also described in the hippocampus, where *N*-methyl-D-aspartate-receptor-dependent LTP in interneurons mainly depends on the feed-forward inhibitory pathway (Lamsa *et al.*, 2005), and in the retinotectal system (Liu *et al.*, 2007). These results indicate that GABAergic plasticity can be guided by glutamatergic transmission, and that inhibitory plasticity can mainly occur in parallel with excitatory plasticity. This fits also with the classic paradigm whereby, in the cortex, inhibitory connections preserve network stability by preventing runaway excitation (Tsodyks *et al.*, 1997). It needs simultaneous strengthening of disynaptic inhibition that may act to optimize the information-storage capacity of the network by preventing excessive excitation of the output neurons.

Acknowledgements

The authors thank Dr E. Benoit and Dr S. O'Regan for critical reading of the manuscript.

Abbreviations

E/I, excitation/inhibition; GBZ, gabazine; HFS, high frequency of stimulation; LTP, long-term potentiation; P, postnatal day; THIP, 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridin-3-ol.

References

Abraham, W.C. & Huggett, A. (1997) Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus*, **7**, 137–145.

Agmon, A. & Connors, B.W. (1992) Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *J. Neurosci.*, **12**, 319–329.

Anderson, J.S., Carandini, M. & Ferster, D. (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J. Neurophysiol.*, **84**, 909–926.

Arbilla, S., Kamal, L. & Langer, S.Z. (1979) Presynaptic GABA autoreceptors on GABAergic nerve endings of the rat substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.*, **57**, 211–217.

Backus, K.H., Deitmer, J.W. & Friauf, E. (1998) Glycine-activated currents are changed by coincident membrane depolarization in developing rat auditory brainstem neurones. *J. Physiol.*, **507**, 783–794.

Bannister, A.P. (2005) Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci. Res.*, **53**, 95–103.

Beierlein, M., Gibson, J.R. & Connors, B.W. (2003) Two dynamically distinct inhibitory networks in layer 4 of the neocortex. *J. Neurophysiol.*, **90**, 2987–3000.

Borg-Graham, L.J., Monier, C. & Fregnac, Y. (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature*, **393**, 369–373.

Borg-Graham, L.J. (2001) The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell. *Nat. Neurosci.*, **4**, 176–183.

Bradler, J.E. & Barrioneuvo, G. (1989) Long-term potentiation in hippocampal CA3 neurons: tetanized input regulates heterosynaptic efficacy. *Synapse*, **4**, 132–142.

Caillard, O., Ben-Ari, Y. & Gaiarsa, J.L. (1999a) Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.*, **18**, 109–119.

Caillard, O., Ben-Ari, Y. & Gaiarsa, J.L. (1999b) Mechanisms of induction and expression of long-term depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **19**, 7568–7577.

Cipolloni, P.B., Kimerer, L., Weintraub, N.D., Smith, D.V. & Keller, A. (1998) Distribution of inhibitory synapses on the somata of pyramidal neurons in cat motor cortex. *Somatosens. Mot. Res.*, **15**, 276–286.

Cline, H. (2005) Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr. Biol.*, **15**, R203–R205.

Cope, D.W., Hughes, S.W. & Crunelli, V. (2005) GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J. Neurosci.*, **25**, 11553–11563.

Cruikshank, S.J., Lewis, T.J. & Connors, B.W. (2007) Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat. Neurosci.*, **10**, 462–468.

Dallwig, R., Deitmer, J.W. & Backus, K.H. (1999) On the mechanism of GABA-induced currents in cultured rat cortical neurons. *Pflugers Arch.*, **437**, 289–297.

Davis, G.W. (2006) Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**, 307–323.

Davis, G.W. & Bezprozvanny, I. (2001) Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu. Rev. Physiol.*, **63**, 847–869.

Douglas, R.J. & Martin, K.A. (1991) A functional microcircuit for cat visual cortex. *J. Physiol.*, **440**, 735–769.

Drasbek, K.R. & Jensen, K. (2006) THIP, a hypnotic and antinociceptive drug, enhances an extrasynaptic GABAA receptor-mediated conductance in mouse neocortex. *Cereb. Cortex*, **16**, 1134–1141.

Drasbek, K.R., Hoestgaard-Jensen, K. & Jensen, K. (2007) Modulation of extrasynaptic THIP conductances by GABAA receptor modulators in mouse neocortex. *J. Neurophysiol.*, **97**, 2293–2300.

Frech, M.J., Deitmer, J.W. & Backus, K.H. (1999) Intracellular chloride and calcium transients evoked by gamma-aminobutyric acid and glycine in neurons of the rat inferior colliculus. *J. Neurobiol.*, **40**, 386–396.

Freund, T.F. (2003) Interneuron diversity series: rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.*, **26**, 489–495.

Freund, T.F. & Gulyas, A.I. (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**, 479–487.

Gabernet, L., Jadhav, S.P., Feldman, D.E., Carandini, M. & Scanziani, M. (2005) Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*, **48**, 315–327.

Gaiarsa, J.L., Caillard, O. & Ben-Ari, Y. (2002) Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci.*, **25**, 564–570.

Gil, Z. & Amitai, Y. (1996) Properties of convergent thalamocortical and intracortical synaptic potentials in single neurons of neocortex. *J. Neurosci.*, **16**, 6567–6578.

Gulledge, A.T. & Stuart, G.J. (2003) Action potential initiation and propagation in layer 5 pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex: absence of dopamine modulation. *J. Neurosci.*, **23**, 11363–11372.

Haider, B., Duque, A., Hasenstaub, A.R. & McCormick, D.A. (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J. Neurosci.*, **26**, 4535–4545.

Higley, M.J. & Contreras, D. (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J. Neurosci.*, **26**, 448–457.

Inoue, T. & Imoto, K. (2006) Feedforward inhibitory connections from multiple thalamic cells to multiple regular-spiking cells in layer 4 of the somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.*, **96**, 1746–1754.

Jedlicka, P. & Backus, K.H. (2006) Inhibitory transmission, activity-dependent ionic changes and neuronal network oscillations. *Physiol. Res.*, **55**, 139–149.

Kaila, K., Lamsa, K., Smirnov, S., Taira, T. & Voipio, J. (1997) Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K^+ transient. *J. Neurosci.*, **17**, 7662–7672.

Kapfer, C., Glickfeld, L.L., Atallah, B.V. & Scanziani, M. (2007) Supralinear increase of recurrent inhibition during sparse activity in the somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.*, **10**, 743–753.

Kullmann, D.M. & Lamsa, K.P. (2007) Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 687–699.

Kuriyama, K., Kanmori, K., Taguchi, J. & Yoneda, Y. (1984) Sress-induced enhancement of suppression of (^{3}H)GABA release from striatal slices by presynaptic autoreceptor. *J. Neurochem.*, **42**, 943–950.

Lambert, N.A., Borroni, A.M., Grover, L.M. & Teyler, T.J. (1991) Hyperpolarizing and depolarizing GABAA receptor-mediated dendritic inhibition in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*, **66**, 1538–1548.

Lamsa, K., Heeroma, J.H. & Kullmann, D.M. (2005) Hebbian LTP in feed-forward inhibitory interneurons and the temporal fidelity of input discrimination. *Nat. Neurosci.*, **8**, 916–924.

Le Roux, N., Amar, M., Baux, G. & Fossier, P. (2006) Homeostatic control of the excitation–inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 3507–3518.

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

Le Roux, N., Amar, M., Moreau, A. & Fossier, P. (2007) Involvement of NR2A- or NR2B-containing *N*-methyl-D-aspartate receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage. *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 289–301.

Liang, J., Zhang, N., Cagetti, E., Houser, C.R., Olsen, R.W. & Spigelman, I. (2006) Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J. Neurosci.*, **26**, 1749–1758.

Liu, Y., Zhang, L.I. & Tao, H.W. (2007) Heterosynaptic scaling of developing GABAergic synapses: dependence on glutamatergic input and developmental stage. *J. Neurosci.*, **27**, 5301–5312.

Lockerbie, R.O. & Gordon-Weeks, P.R. (1985) Gamma-aminobutyric $acid_A$ ($GABA_A$) receptors modulate (^{3}H)GABA release from isolated neuronal growth cones in the rat. *Neurosci. Lett.*, **55**, 273–277.

Lu, Y.M., Mansuy, I.M., Kandel, E.R. & Roder, J. (2000) Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron*, **26**, 197–205.

Maffei, A., Nelson, S.B. & Turrigiano, G.G. (2004) Selective configuration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation. *Nat. Neurosci.*, **7**, 1353–1359.

Maffei, A., Nataraj, K., Nelson, S.B. & Turrigiano, G.G. (2006) Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. *Nature*, **443**, 81–84.

Marder, E. & Prinz, A.A. (2002) Modeling stability in neuron and network function: the role of activity in homeostasis. *Bioessays*, **24**, 1145–1154.

Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M., Roth, A. & Sakmann, B. (1997) Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex. *J. Physiol.*, **500**, 409–440.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. & Wu, C. (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 793–807.

Maurin, Y. (1988) Paradoxical antagonism by bicuculline of the inhibition by baclofen of the electrically evoked release of [3H]GABA from rat cerebral cortex slices. *Eur. J. Pharmacol.*, **155**, 219–227.

McBain, C.J. & Fisahn, A. (2001) Interneurons unbound. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 11–23.

Monier, C., Chavane, F., Baudot, P., Graham, L.J. & Fregnac, Y. (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron*, **37**, 663–680.

Monier, C., Fournier, J. & Fregnac, F. (2008) In vitro and in vivo measures of evoked excitatory and inhibitory conductance dynamics in sensory cortices. *J. Neurosci. Methods*, **169**, 323–365.

Nugent, F.S., Penick, E.C. & Kauer, J.A. (2007) Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature*, **446**, 1086–1090.

Peters, A. & Kara, D.A. (1985) The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. II. The nonpyramidal cells. *J. Comp. Neurol.*, **234**, 242–263.

Pouille, F. & Scanziani, M. (2004) Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature*, **429**, 717–723.

Ren, M., Yoshimura, Y., Takada, N., Horibe, S. & Komatsu, Y. (2007) Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons. *Science*, **316**, 758–761.

Shu, Y., Hasenstaub, A. & McCormick, D.A. (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, **423**, 288–293.

Silberberg, G. & Markram, H. (2007) Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron*, **53**, 735–746.

Staley, K.J. & Proctor, W.R. (1999) Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl^- and HCO_3^- transport. *J. Physiol.*, **519**, 693–712.

Staley, K.J., Soldo, B.L. & Proctor, W.R. (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science*, **269**, 977–981.

Steele, P.M. & Mauk, M.D. (1999) Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J. Neurophysiol.*, **81**, 1559–1566.

Sun, Q.Q., Huguenard, J.R. & Prince, D.A. (2006) Barrel cortex microcircuits: thalamocortical feedforward inhibition in spiny stellate cells is mediated by a small number of fast-spiking interneurons. *J. Neurosci.*, **26**, 1219–1230.

Szabadics, J., Varga, C., Molnar, G., Olah, S., Barzo, P. & Tamas, G. (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science*, **13**, 233–235.

Taira, T., Lamsa, K. & Kaila, K. (1997) Posttetanic excitation mediated by GABA(A) receptors in rat CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **77**, 2213–2218.

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

Thomson, A.M. & Bannister, A.P. (1998) Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex. *Neuroscience*, **84**, 669–683.

Trigo, F.F., Chat, M. & Marty, A. (2007) Enhancement of GABA release through endogenous activation of axonal GABAA receptors in juvenile cerebellum. *J. Neurosci.*, **27**, 12452–12463.

Tsodyks, M.V., Skaggs, W.E., Sejnowski, T.J. & McNaughton, B.L. (1997) Paradoxical effects of external modulation of inhibitory interneurons. *J. Neurosci.*, **17**, 4382–4388.

Turrigiano, G.G. (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci.*, **22**, 221–227.

Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B. (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 97–107.

Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C. & Nelson, S.B. (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, **391**, 892–896.

Wehr, M. & Zador, A.M. (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*, **426**, 442–446.

Wells, J.E., Porter, J.T. & Agmon, A. (2000) GABAergic inhibition suppresses paroxysmal network activity in the neonatal rodent hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.*, **20**, 8822–8830.

Wilent, W.B. & Contreras, D. (2004) Synaptic responses to whisker deflections in rat barrel cortex as a function of cortical layer and stimulus intensity. *J. Neurosci.*, **24**, 3985–3998.

Zilberter, Y. (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J. Physiol.*, **528**, 489–496.

© The Authors (2008). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

Neuroscience 163 (2009) 942–951

ROLES OF NITRIC OXIDE IN THE HOMEOSTATIC CONTROL OF THE EXCITATION–INHIBITION BALANCE IN RAT VISUAL CORTICAL NETWORKS

N. LE ROUX,[1] M. AMAR, A. W. MOREAU AND P. FOSSIER*

CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard-FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire–UPR9040, Gif sur Yvette, F-91198, France

Abstract—The level of excitability of cortical neurons depends on the balance between their excitatory and inhibitory inputs (excitation/inhibition [E/I] balance). In the cortex, the E/I balance received by a neuron is dynamically maintained through a coordinated regulation of the strength of these inputs, described in term of homeostatic plasticity. Using a method allowing the determination of the E/I balance in rat cortical layer 5 pyramidal neurons (L5-PNs, the main output stage of the cortex), while keeping the interactions between excitatory and inhibitory networks functional, we examined the effects of high or low frequency of stimulation (HFS or LFS) protocols in layer 4 (in order to mimic thalamo–cortical entries) on the E–I level of the neuronal network. We previously showed that the E/I balance of L5-PNs remains stable due to a dual potentiation or dual depression of E and I after HFS or LFS protocols. Here, using a specific neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, we show that the related potentiation or depression of E and I (underlying homeostatic plasticity processes) required nNOS activation. We also show that application of an unspecific blocker of nitric oxide synthase (NOS) or a nitric oxide (NO) scavenger induces an increase of the E/I balance suggesting a role for a tonic NO synthesis in the regulation of the network activity. It is concluded that, in the cortex, a phasic NO effect (due to activation of nNOS) is required for the induction of homeostatic plasticity processes whereas a tonic NO signal is involved in the regulation of a set-point value for the E/I balance. **© 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.**

Key words: homeostatic plasticity, E/I balance, nitric oxide, LTP, LTD.

The functioning of the nervous system requires that neuronal networks remain responsive to stimuli over a broad dynamic range. This is achieved by a delicate balance between excitation (E) and inhibition (I) received by a cell (Shadlen and Newsome, 1994; Abbott and Chance, 2005). A functional correlation between synaptic E and I in neuronal responses to stimuli was found in many cortical neurons (Anderson et al., 2000; Monier et al., 2003; Marino et al., 2005; Haider et al., 2006), indicating that E and I are co-regulated; thus the concept of homeostatic plasticity at a neuronal level appeared. It corresponds to physiological processes allowing a neuron to integrate new information by changing the strength of its synaptic inputs while keeping stable its level of excitability (Turrigiano, 1999, 2004; Davis and Bezprozvanny, 2001; Turrigiano and Nelson, 2004). We previously extended this concept to neuronal networks in the rat visual cortex by determination of the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons (L5-PNs), which elaborate cortical output signals following electrical stimulation of layer 4 (to mimic the main entry of thalamic inputs) and thus are relevant to estimate a network activity. Using a method previously described (Le Roux et al., 2006; Monier et al., 2008) that allows the preservation of functional interaction between E and I, we showed an E/I balance in L5-PNs equal to 20/80 (Le Roux et al., 2006). We also showed that application of high or low frequency stimulation (HFS or LFS) protocols in layer 4, used to induce LTP or LTD at synaptic levels, induced parallel potentiation or depression of E and I in L5-PNs, leading to an unchanged E/I ratio (Le Roux et al., 2006).

We previously showed that NMDA receptor activation is required for homeostatic plasticity induction in L5-PNs after electrical stimulation in layer 2/3 (Le Roux et al., 2007) or in layer 4 (unpublished observations). The role of nitric oxide (NO) in synaptic plasticity has been widely investigated particularly at the synaptic level of excitatory synapses (Garthwaite and Boulton, 1995; Hawkins et al., 1998; Haghikia et al., 2007) and NO synthesis is assumed to result from the activation of NMDA receptors at the postsynaptic site (Garthwaite et al., 1988; Brenman and Bredt, 1997; Murphy and Bliss, 1999). However, the mechanisms of the plasticity of inhibitory synapses are poorly understood, principally because of the heterogeneous population of inhibitory interneurons (Kawaguchi and Kondo, 2002). Therefore the role of NO in the regulation of the strength of inhibitory synapses remains to be elucidated. NO seems to increase the GABA release in cerebellum or hypothalamus (Wall, 2003; Li et al., 2004) but it can also reduce $GABA_A$ receptor activity (Robello et al.,

[1] Present address: INSERM UMR-839—Institut du Fer à Moulin, 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France.
*Corresponding author. Tel: +33-0-1-69-82-36-66.
E-mail address: fossier@nbcm.cnrs-gif.fr (P. Fossier).

Abbreviations: CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; C-PTIO, 2-(4-carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-1H-imidazolyl-1-oxy-3-oxide; D-AP5, 2-amino-5-phosphonovalerianic acid; D-arg, D-arginine; E, excitation; EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HFS, high frequency stimulation; I, inhibition; intgE, integral value of the excitatory conductance change; intgI, integral value of the inhibitory conductance change; intgT, integral value of the total conductance change; L-arg, L-arginine; LFS, low frequency stimulation; L-NAME, L-N^G-nitroarginine methyl ester; L5-PNs, layer 5 pyramidal neurons; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; PAPA-NONOATE, (Z)-1-[N-(3-aminopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate; Rm, membrane resistance; Vm, membrane potential.

0306-4522/09 $ - see front matter © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.010

1996; Wall, 2003). In the visual cortex, nitric oxide synthase (NOS) is highly expressed (Chung et al., 2004; Yousef et al., 2004) and was reported to control neuronal activity (Cudeiro et al., 1997).

By determination of the E/I balance of L5-PNs, we investigated here the role of NO synthesis in the regulation of excitatory and inhibitory synaptic strengths of the neuronal network. We show that the blockade of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) prevents the effects of HFS or LFS protocols on both E and I resulting in an unchanged E/I balance. Moreover, an increase of the E/I balance is observed using an unspecific blocker of NOS or a NO scavenger. These results are in favor of a basal tonic NO synthesis in the cortex. We conclude that, in cortical networks, a tonic NO signal can be suspected to maintain neuronal activity whereas a phasic NO signal is required for plasticity processes at the level of excitatory and inhibitory synapses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

General methods

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the American Neuroscience Association. Methods and solutions were as reported previously (Le Roux et al., 2006). Parasagittal slices containing primary visual cortex were obtained from P18 to P25 Wistar rats. Somatic whole-cell recordings were performed at room temperature, using borosilicate glass pipettes (of 3–5 MΩ resistance in bath) filled with a solution containing (in mM): K-gluconate, 140; HEPES, 10; ATP, 4; $MgCl_2$, 2; GTP, 0.4; and EGTA, 0.5 (pH 7.3 adjusted with KOH; 270–290 mOsm). Voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 1D (Axon Instruments, CA, USA), filtered by a low-pass Bessel filter with a cutoff frequency set at 2 kHz, and digitally sampled at 4 kHz. The membrane potential (Vm) was corrected off-line by −10 mV to account for the junction potential. The firing profile of patched neurons and their membrane resistance (Rm) were obtained using 1 s depolarizing steps ranging from −100 to 200 pA. Only cells having a resting Vm more negative than −55 mV and with an access resistance lower than 25 MΩ were kept for further analysis. The access resistance was compensated off-line in voltage clamp mode and neurons exhibiting more than 10% of the access resistance during the experiment were rejected. Electrical stimulations (1–10 μA, 0.2 ms duration) were delivered in layer 4 using 1 MΩ impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT; WPI, Hertfordshire, UK). The intensity of the stimulation corresponds to 50% of the maximum response.

Drugs

L-Arginine (L-arg) and D-arginine (D-arg) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), 2-(4-carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-1H-imidazolyl-1-oxy-3-oxide (C-PTIO), (Z)-1-[N-(3-aminopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate (PAPA-NONOATE), and L-NAME (L-N^G-Nitroarginine methyl ester) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Drugs were dissolved in the perfusate for at least 15 min before recordings.

Plasticity induction protocols

Under voltage-clamp five to 10 trials were repeated for each holding potential (0.05 Hz). A control recording was made after 15 min of patch-clamp equilibration at five to seven holding potentials. After this control recording, drug was added to the external medium and superfused on the slice during 20 min. Then a "drug recording" was performed in the same condition of stimulation as the control recording.

For experiments of potentiation or depression, HFS or LFS protocol was applied after a round of "drug recording" as described above. Fifteen, 30, 45 and 60 min after the beginning of the protocol of HFS or LFS, recordings of current responses were done as described above (frequency of stimulation 0.05 Hz) in order to compare to the control "drug recording." The HFS protocol was elicited with theta-burst stimulation (three trains of 13 bursts applied at a frequency of 5 Hz, each burst containing four pulses at 100 Hz, for a total duration of 2 min). The LFS protocol consisted of 1 Hz stimulation for 15 min.

Synaptic response analysis

Data were analyzed off-line with specialized software (Acquis1™ and Elphy™: written by Gérard Sadoc, Biologic UNIC–CNRS, France). The method is based on the continuous measurement of conductance dynamics during stimulus-evoked synaptic responses, as first described *in vivo* in cat cortex (Borg-Graham et al., 1998; Monier et al., 2003) and recently validated on rat visual cortex (Le Roux et al., 2006; Lucas-Meunier et al., in press). This method has received further validation on other experimental models (Shu et al., 2003; Wehr and Zador, 2003; Higley and Contreras, 2006; Le Roux et al., 2006; Monier et al., 2008). Evoked synaptic currents were measured and averaged at a given holding potential. In I–V curves for each delay (t), the value of the holding potential (Vh) was corrected (Vhc) from the ohmic drop due to the leakage current through Rs, by the equation: $Vhc(t)=Vh(t)-I(t)\times Rs$. An average estimate of the input conductance waveform of the cell was calculated from the best linear fit (mean least square criterion) of the I–V curve for each delay (t) following the stimulation onset. Only cells showing a Pearson correlation coefficient for the I–V linear regression higher than 0.95 between −90 and −40 mV were considered in order to calculate the conductance change of the recorded pyramidal neuron from the slope of the linear regression.

The evoked synaptic conductance term (gT(t)) was derived from the input conductance by subtracting the resting conductance (g_{rest}) estimated 90 ms before the electrical stimulation. The apparent reversal potential of the synaptic current at the soma (Esyn(t)) was taken as the voltage abscissa of the intersection point between the I–V curve obtained at a given time (t) and that determined at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, Esyn(t) characterizes the stimulation-locked dynamics of the balance between E and I.

Decomposition of synaptic conductance

To decompose gT(t) into excitatory and inhibitory components (gE(t) and gI(t), respectively), we used the following simplifications: $Isyn(t)=gE(t)[Esyn(t)-Eexc]+gI(t)[Esyn(t)-Einh]$ and $gT(t)=gE(t)+gI(t)$, where Isyn(t) is the global synaptic current, Esyn(t) the apparent reversal potential at the soma, and Eexc and Einh the reversal potentials for E and I currents, respectively (program written by Cyril Monier, CNRS, UNIC, France). We showed that the I/V curve in the presence of excitatory synaptic transmission blockers (CNQX, D-AP5) is linear between −80 and +10 mV with a reversal potential equal to −80 mV (Le Roux et al., 2006). In the presence of bicuculline that blocks inhibitory inputs on the L5-PN, the I/V curve for E is linear between −80 and +10 mV with a reversal potential equal to 0 mV (Le Roux et al., 2006; supplementary data) as already shown by other studies (Wehr and Zador, 2003; Higley and Contreras, 2006). Under our experimental conditions of stimulation of cortical layers leading to subthreshold postsynaptic responses, Esyn(t) which was extrapolated from I–V curves took any intermedi-

ate value between −80 and −40 mV (Le Roux et al., 2006; supplementary data) i.e. within the limits of our voltage excursion (−90 to −40 mV) corresponding to the linearity of I–V curves and between the respective values of Einh and Eexc in such a way that the mathematical conditions of the oversimplification used to calculate gI(t) and gE(t) were fulfilled.

Like all somatic recordings, our recordings cannot make rigorous estimates of synaptic events in the distal dendrites and the conductance estimates are ratios of the overall excitatory and inhibitory drive contained in the local network that has been stimulated (Haider et al., 2006). However, our measurements give relative changes in conductance magnitude which reflect the cumulative contributions of E and I arriving at proximal portions of the neuron. These relative conductance changes at the somatic level define a narrow window over which input integration and spike output can occur (Higley and Contreras, 2006).

The integral (Int) over a time window of 200 ms was used to quantify the synaptic conductance changes. The contribution of each component was expressed by the ratio of the integral value of excitatory or inhibitory conductance change (IntgE or IntgI) to that of total conductance change (IntgT).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean±the standard deviation of the mean (SD) of *n* cells. Paired samples for IntgT, IntgE, IntgI, % E or % I between the control condition (before HFS) and a given time after HFS (15, 30, 45 or 60 min) were analyzed using the parametrical *t*-test. Data were considered statistically significant for $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**) and $P \leq 0.001$ (***).

RESULTS

Effects of NO on the E/I balance in cortical pyramidal neurons

The effects of NO on the E/I balance of L5-PNs were characterized by supplying L-arg, the substrate of NOS, in order to enhance endogenous synthesis of NO, or by superfusing a NO donor (PAPA-NONOATE) to chemically increase the NO concentration in the cortical slice.

After a control recording (to a stimulation of layer 4 at 0.05 Hz, see Experimental Procedures), L-arg 200 μM was added in our external solution and superfused during 20 min. Then, a "drug recording" was made in the same condition of stimulation than control and showed that application of L-arg induced an increase in the amplitude of current responses, compared to the control recording, of a L5-PN to electrical stimulation (Fig. 1A1). The integral (see Experimental Procedures) of the IntgT increased from 516.8±84.8 a.u. to 745.6±118.5 a.u., which corresponds to a 46.2±11.1% ($P<0.001$, $n=15$) increase (Fig. 1A2). The IntgE was enhanced by 50.47±20.4% ($P<0.05$), from 91.0±11.5 a.u. to 133.6±22.9 a.u., and the IntgI increased by 48.6±14.7% ($P<0.01$), from 425.8±76.7 a.u. to 612.1±106.5 a.u. (Fig. 1A2).

Due to parallel increase of intgE and intgI, the percentage of E (expressed as percents of intgE to intgT) and the percentage of I (expressed as percents of intgI to intgT) remained stable (Fig. 1A2); the E/I balance is unchanged.

The membrane properties, Vm and Rm were not significantly modified ($P>0.05$) by the application of L-arg (Table 1).

To confirm that these effects result from NO-synthesis, we applied 200 μM D-arg which is not a substrate for NOS (Fig. 1B1). No significant modification of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed (Fig. 1B2).

In the presence of 10 μM PAPA-NONOATE, a strong increase in the amplitude of current responses of L5-PNs to electrical stimulation was observed (Fig. 1C1). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were significantly increased (Fig. 1C2). IntgT, intgE, and intgI respectively increased by 142.3±38.5% ($n=11$), 200.3±57.2%, and 135.6±38% (Fig. 1C2). The percentage of I was significantly decreased ($P<0.05$) from 77.7±3.9% to 74.7±3.4% resulting in an enhancement of the E/I ratio from 22/78 to 25/75. Under these conditions, Vm remained unchanged whereas Rm is significantly reduced ($P<0.05$) by 26.8±9.8% (Table 1) due to the over-expression of NO.

We conclude that, in the presence of L-arg, the potentiation of total, excitatory and inhibitory conductance changes was due to NO synthesis by NOS. Hence, NO can influence the strength of excitatory and inhibitory inputs on L5-PNs. Further investigations were initiated to determine if a basal synthesis of NO can exert such an effect.

This possibility was checked by blocking NOS activity with 10 μM L-NAME or by scavenging NO with 10 μM C-PTIO. Representative recordings of L5-PNs in the presence of the NOS antagonist showed no apparent modification of the total conductance change masking an increase in the excitatory conductance change and a decrease in the inhibitory conductance (Fig. 2A1). The statistical analysis in the presence of L-NAME ($n=18$) showed significant opposite effects on IntgE and IntgI which were increased ($P<0.05$) by 21±10% or decreased 21±9% respectively (Fig. 2A2). These changes resulted in an increase in the E/I ratio from 18.6±2.1%/81.4±2.1% to 24.1±3.0%/75.9%±3.0% (Fig. 2A2). Similar results were obtained in the presence of a NO scavenger (10 μM, C-PTIO), which also significantly ($P<0.05$, $n=14$) increased E (by 27±12%) and decreased I (by 24±11%) (Fig. 2B1 for representative recordings and Fig. 2B2 for statistical analysis of the global population) resulting in a meaningful enhancement of the E/I ratio (from 20.9±4.3%/79.1±4.5% to 28.7±4.5%/71.3%±4.6%). Under these conditions, Vm remained unchanged whereas Rm is significantly reduced ($P<0.05$) by 18.4% for L-NAME and by 19.3% for C-PTIO (Table 1).

From these experiments, the similar actions of a NOS inhibitor and a NO scavenger strongly suggested the presence of a tonic level of endogenous NO in the visual cortex. Previous reports have argued in favor of a tonic NO signal resulting from the specific activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and a phasic NO signal depending on nNOS activation (Hopper and Garthwaite, 2006). Whereas no specific eNOS antagonist is actually available, L-VNIO was reported as a specific antagonist of the nNOS (Alderton et al., 2001; Erdal et al., 2005; Hopper and Garthwaite, 2006). Application of 100 nM L-VNIO did not induce significant change of total, excitatory and inhib-

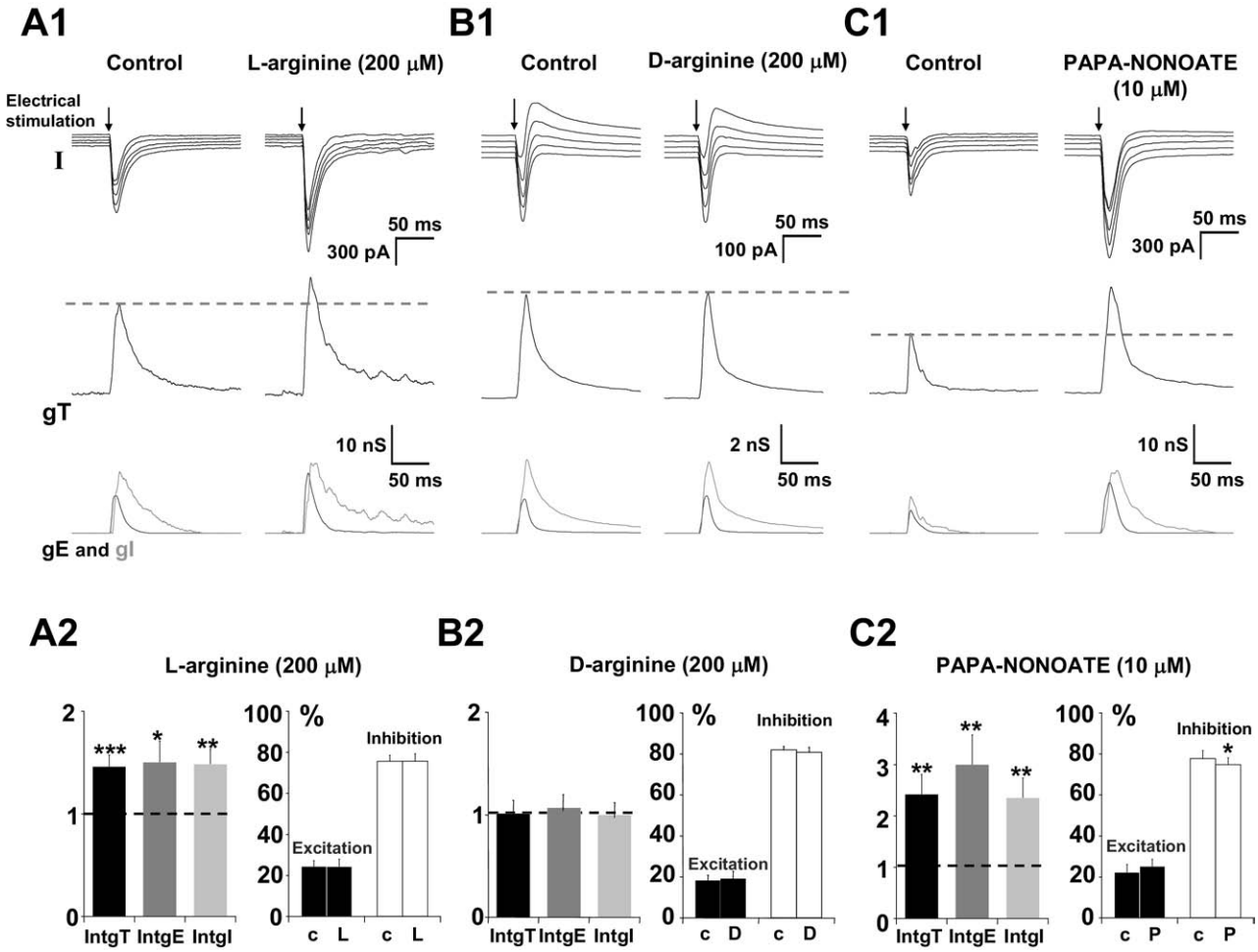


Fig. 1. Effects of an enhanced concentration of NO on the E/I balance of L5-PN. (A1–C1) Upper traces: current responses of a L5-PN to electrical stimulation at 0.05 Hz (black arrow) applied in layer 4: left column in control conditions and right column, for the same stimulation, 20 min after perfusion of 200 μM of L-arg (A); 200 μM of D-arg (B), and 10 μM of PAPA-NONOATE (C). Holding potentials ranged from −80 (bottom trace) to −60 mV (top trace, steps equal to 5 mV). Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Lower traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes. Note that, for stimulation in layer 4 in the presence of L-arg or PAPA-NONOATE, total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased. (A2) Left: relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey), and intgI (light grey), in the presence of 200 μM of L-arg (n=15) (*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, and * $P<0.05$). Right: relative contribution of excitatory and inhibitory conductance changes to the total conductance change in the presence of L-arg (c, control). (B2) Application of 200 μM of D-arg (n=12). Legends are identical to those in A2. (C2) Application of 10 μM of PAPA-NONOATE (n=11). Legends are identical to those in A2.

itory conductance changes (Fig. 2C1, for representative recordings and Fig. 2C2 for statistical analysis of the global population, n=15). Under these conditions, the E/I ratio was unchanged (Fig. 2C2).

Table 1. Effects of drugs superfusion on the Vm and Rm

	Vm (mV)		Rm (MΩ)	
	Control	Drug	Control	Drug
L-Arg	−76.9±1.0	−75.8±1.0	266.5±45.6	255.4±43.1
D-Arg	−75.3±1.7	−73.5±1.9	218.9±31.3	197.5±36.4
PAPA NONOATE	−72.2±1.9	−71.1±1.7	284.9±44.7	202.1±36.5*
L-NAME	−74.7±0.9	−73.7±1.2	243.1±40.4	198.3±30.1*
C-PTIO	−74.9±0.9	−72.6±0.9	205.9±40.8	166.1±30.2*
L-VNIO	−71.6±1.3	−71.1±1.4	295.2±46.9	286.6±45.5

L-Arg and D-arg were superfused at 200 μM, PAPA-NONOATE, L-NAME, and C-PTIO at 10 μM whereas L-VNIO was superfused at 100 nM. (* $P<0.05$).

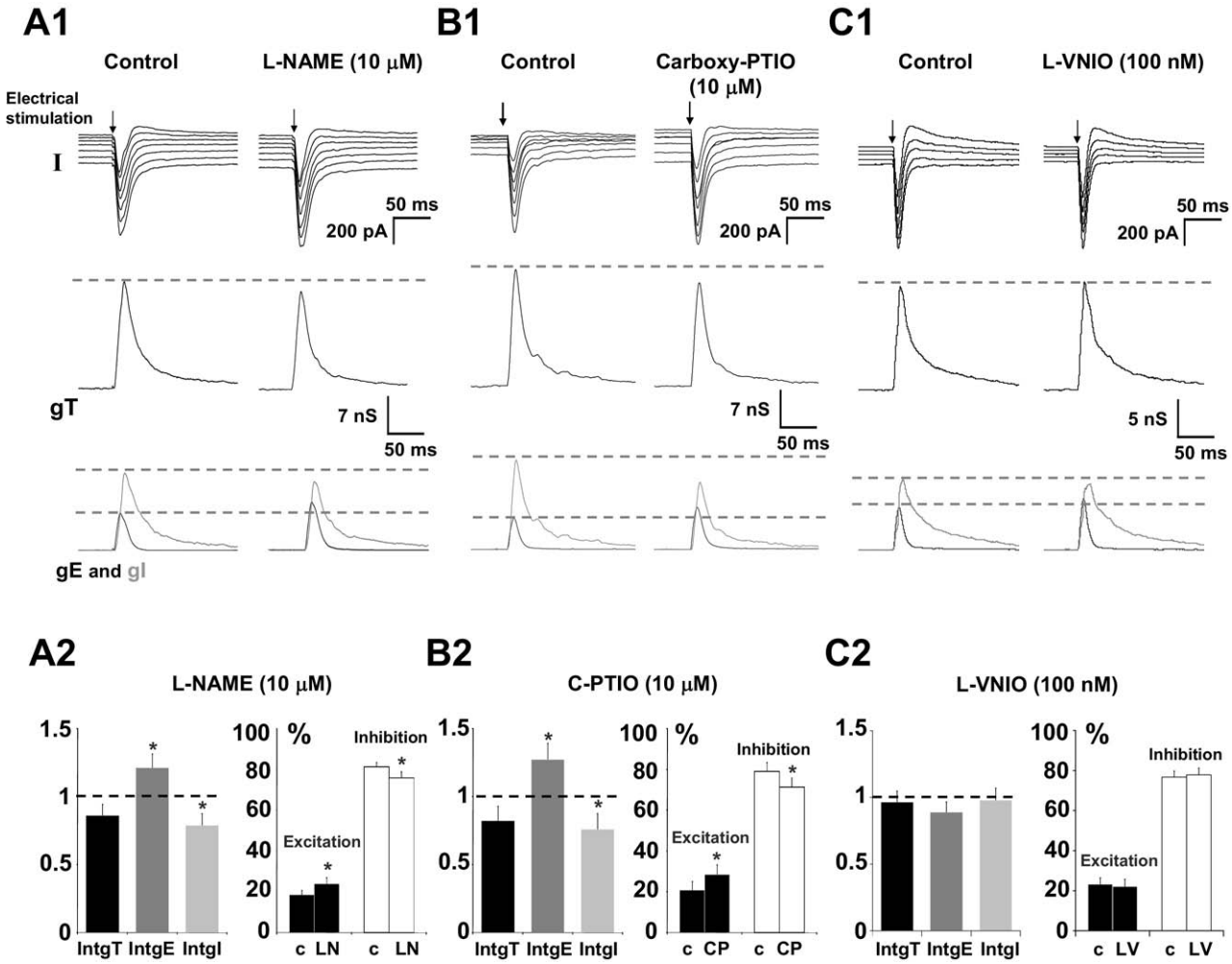


Fig. 2. Effects of the blockade of NO synthesis on the E/I balance of L5-PN. (A1–C1) Upper traces: current responses of a L5-PN to electrical stimulation at 0.05 Hz (black arrow) applied in layer 4: left column in control conditions and right column, for the same stimulation, 20 min after application of 10 μM of an unspecific blocker of NOS, L-NAME (A); of 10 μM of a NO-scavenger, C-PTIO (B) or of 100 nM of a specific nNOS blocker, L-VNIO (C). Holding potentials ranged from −80 (bottom trace) to −60 mV (top trace, steps equal to 5 mV). Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Lower traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes. (A2) Left: relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey), and intgI (light grey), in the presence of 10 μM of L-NAME (n=18). Right: relative contribution of excitatory and inhibitory conductance changes to the total conductance change in the presence of L-NAME. (B2) Application of 10 μM of C-PTIO (n=14). Legends are identical to those in A2. (C2) Application of 100 nM of L-VNIO (n=11). Legends are identical to those in A2.

NO synthesis is required for homeostatic potentiation of E and I inputs of L5-PNs

Homeostatic plasticity ensures that neuronal networks integrate new information, by modification of the strength of their excitatory and inhibitory connections while keeping a stable level of activity due to coordinated modification on the E and I (Le Roux et al., 2006). Here we show that, in the presence of L-arg, HFS protocol failed to induce significant potentiation of the excitatory or inhibitory component (Fig. 3). No significant variations of total, excitatory or inhibitory conductance changes were observed (Fig. 3A1 for representative recordings and Fig. 3A2 for statistical analysis of the global population, n=13) and consequently the E/I ratio was unchanged (Fig. 3A3). It can be argued that in the presence of L-arg, NOS activity was already maximal and no further increase of NO synthesis could occur, resulting in a lack of cumulative potentiating effects.

In the presence of the NOS blocker L-NAME, the application of a HFS protocol also failed to induce the potentiation of excitatory and inhibitory conductance changes (see Fig. 3B1 for representative recordings and Fig. 3B2 for statistical analysis of the global population, n=14). No significant change of the E/I balance occurred (Fig. 3B3).

In the presence of the nNOS isoform antagonist, L-VNIO, application of HFS protocol again did not modify total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 3C1 for representative recordings and Fig. 3C2 for statistical analysis of the global population, n=11). Consequently, the E/I ratio was unchanged (Fig. 3C3).

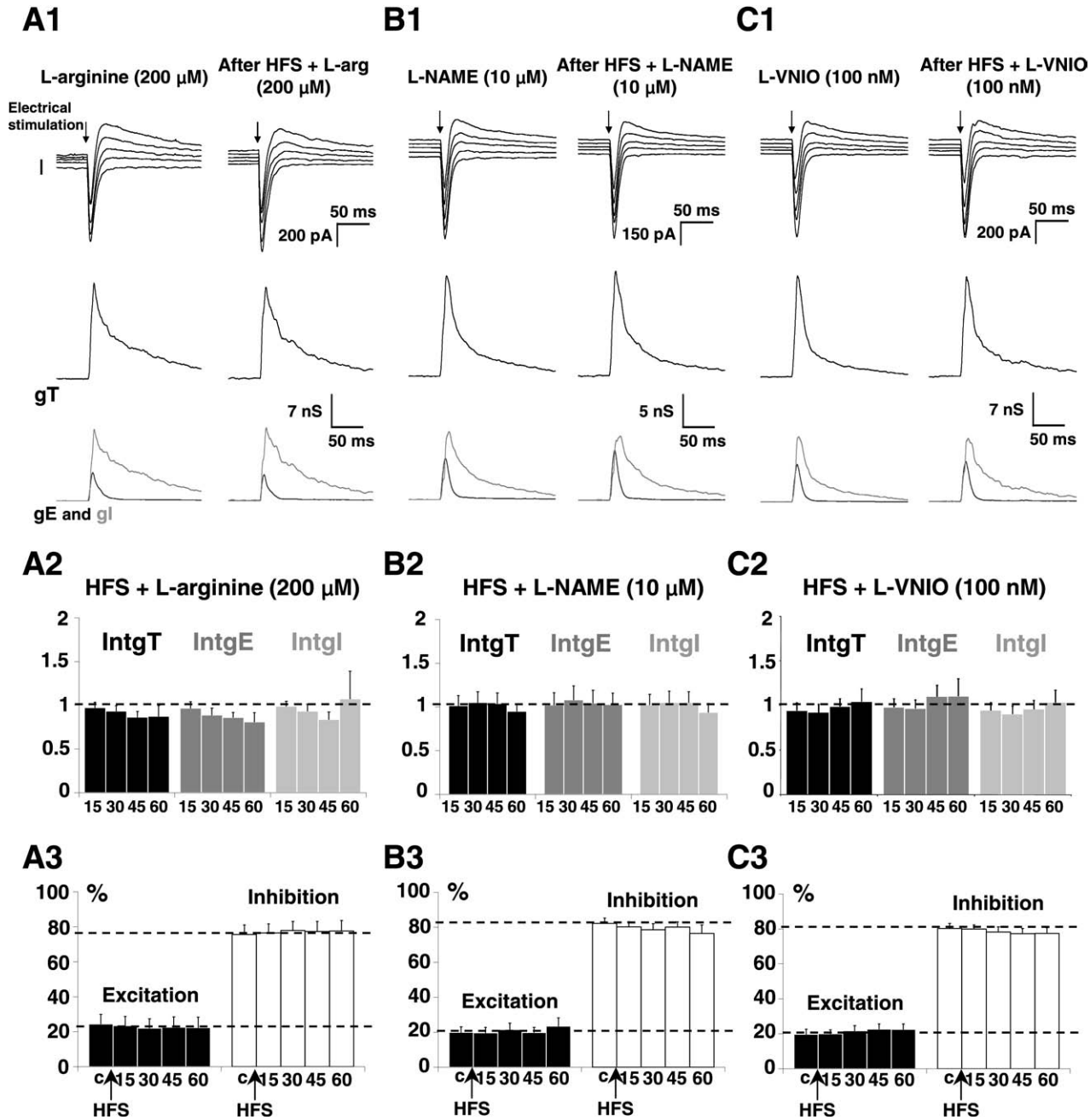


Fig. 3. Involvement of NO in the homeostatic potentiation of L5-PNs inputs. (A1–C1) Representative recordings of L5-PNs after electrical stimulation (0.05 Hz) applied in layer 4 in the presence of 200 μM of L-arg (A); 10 μM of L-NAME (B); or 100 nM L-VNIO (C). The left column shows a representative recording before HFS application, in the presence of the drug, and the right column 60 min after application of HFS in layer 4 with the same condition of stimulation as that in the the drug recording. Upper traces: current responses of a L5-PN to electrical stimulation. Imposed Vm ranged from −60 to −80 mV. Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Lower traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light rey). (A2) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars), and intgI (light grey bars), after HFS in layer 2/3 (n=13) in the presence of 200 μM L-arg. (A3) Relative contribution of E and I conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 200 μM L-arg (c, control before HFS protocol). (B2, B3) Application of HFS protocol in the presence of 10 μM of L-NAME (n=14). Legends are identical to those in A2, A3. (C2, C3) Application of HFS protocol in the presence of 100 nM of L-VNIO (n=14). Legends are identical to those in A2, A3.

To summarize these results, the HFS protocol was ineffective to potentiate E and I when an over-synthesis of NO was induced in the presence of L-arg or when the synthesis of NO was blocked. We conclude that the occurrence of a phasic NO signal is required to induce the homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on L5-PNs and

this phasic NO signal appears to be generated by the activation of the nNOS because a specific inhibitor also prevented the effects of the HFS protocol.

NO synthesis is required for homeostatic depression of excitatory and inhibitory inputs of L5-PNs

LFS protocol induces homeostatic depression of excitatory and inhibitory inputs on L5-PNs after electrical stimulation in layer 4 (Le Roux et al., 2006). We applied this protocol of stimulation in the presence of L-arg, the NOS agonist, or L-VNIO, the nNOS isoform antagonist. In both cases, we observed that in the presence of drugs, application of LFS protocol no longer modified total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 4A for L-arg, $n=13$ and Fig. 4B for L-VNIO, $n=14$) and the E/I ratio was unchanged. The large decrease (by 50%) of the conductance following 15 min recordings was not considered for analyzing the results because it corresponds to the end of the stimulation. These results indicate that nNOS activation is also required for the induction of homeostatic depression.

DISCUSSION

In this study, we examined the regulation of the strength of excitatory and inhibitory inputs on L5-PNs generated by stimulation in layer 4. Application of HFS or LFS protocol, which is able to induce Hebbian plasticity (LTP or LTD at the synaptic level) was shown to induce reciprocal changes in the strength of excitatory and inhibitory inputs resulting in a stable E/I balance of L5-PNs. These phenomena of homeostatic potentiation and depression ensure that neuronal network can integrate new information by modification of the strength of excitatory and inhibitory inputs without changing the level of excitability of the neuronal network. Our results are in favor of a major involvement of NO in the regulation of cortical network activity and in the induction of homeostatic plasticity processes.

NO effects on the E/I balance of L5-PNs

We showed that the superfusion of a NO donor induces important increases of E and I (more than double). The increase of E is more important than that of I and leads to an increase of the E/I balance leading to an increase of the excitability of the PN. However, an endogenous increase of NO synthesis induced by the application of L-arg, the substrate of the NOS, induced coordinated increases of E and I by about 50% and thus no significant modification of the E/I ratio. These results indicate that the NO synthesized by NOS probably has local specific effects on excitatory and inhibitory neurons that do not disturb the E/I balance of L5-PNs, contrary to untargeted and uncontrolled NO effects observed in the presence of a NO donor. This observation raises the question of the specificity of functional NOS isoforms in the activated cortical network. Both eNOS and nNOS were expressed in the rat visual cortex in layers 2 to 6 (Yousef et al., 2004): nNOS is expressed in a dense network of fibers and in several cells whereas eNOS is strongly expressed in cortical cells which represent about 60% of the total number of cortical cells. eNOS is also largely expressed in capillaries (Ignarro, 1990). Our experiments in the presence of a NOS antagonist or of a NO scavenger show similar results, an increase of E and a decrease of I, producing a weak increase in the E/I balance when cortical slices are free of NO. This would be in favor of a basal (or tonic) level of NO in the cortex decreasing the E/I balance. Such a possibility is somewhat surprising because the half-life of NO does not exceed a few seconds (Hopper and Garthwaite, 2006). In the presence of L-VNIO, the specific blocker of neuronal NOS, the E/I balance remains unchanged. Consequently, the tonic NO signal could arise from a basal activity of eNOS as suggested occurring in the hippocampus (Hopper and Garthwaite, 2006).

NO and homeostatic plasticity processes

It has been shown using knockout mice or after the blockade of tonic NO synthesis in the hippocampus that both nNOS and eNOS isoforms are required in synaptic plasticity processes (O'Dell et al., 1994; Bon and Garthwaite, 2003). In our experiments, assuming that the blockade of nNOS with L-VNIO is highly selective, the blockade of nNOS prevents the induction of both homeostatic potentiation and homeostatic depression processes while the basal NO synthesis by eNOS has a depressive action on the E/I balance. Interestingly, L-arg application induced similar potentiating effects of excitatory and inhibitory inputs on L5 pyramidal neurons that mimic the application of an HFS protocol (Le Roux et al., 2006). Moreover, no further potentiating or depressing effects were induced by the HFS or LFS protocol after a previous application of L-arg. Thus, the synthesis of NO is probably not linked to the amount of substrate but rather to a specific distribution of nNOS (see above). These observations are in favor of the generation of a phasic NO signal by HFS protocol. Similar observations were made in hippocampus, when administration of exogenous NO was paired with a weak tetanic stimulation of afferent fibers (Bohme et al., 1991; Bon et al., 1992; Arancio et al., 1996; Malen and Chapman, 1997; Bon and Garthwaite, 2003). Since a phasic NO signal is required for homeostatic potentiation processes, one can question the role of a NO signal in the case of the LFS protocol. Indeed, L-arg application or the nNOS antagonist also prevents the effects of the LFS protocol and, consequently, a phasic NO signal is also required for homeostatic depression processes. A strong and transient increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in the postsynaptic neuron is observed for the induction of LTP while a moderate change in the intracellular concentration of Ca^{2+} is needed for the LTD (Mulkey and Malenka, 1992; Malenka and Bear, 2004). Among the different pathways which contribute to induce the LTP, the activation of the constitutive nNOS via a Ca^{2+} calmodulin-dependent pathway has been largely documented and this can explain why the blockade of the nNOS prevented the LTP.

It seems that intracellular Ca^{2+} changes can induce dephosphorylating processes during the induction of LTD (Lee et al., 1998, 2003). However, the relationship

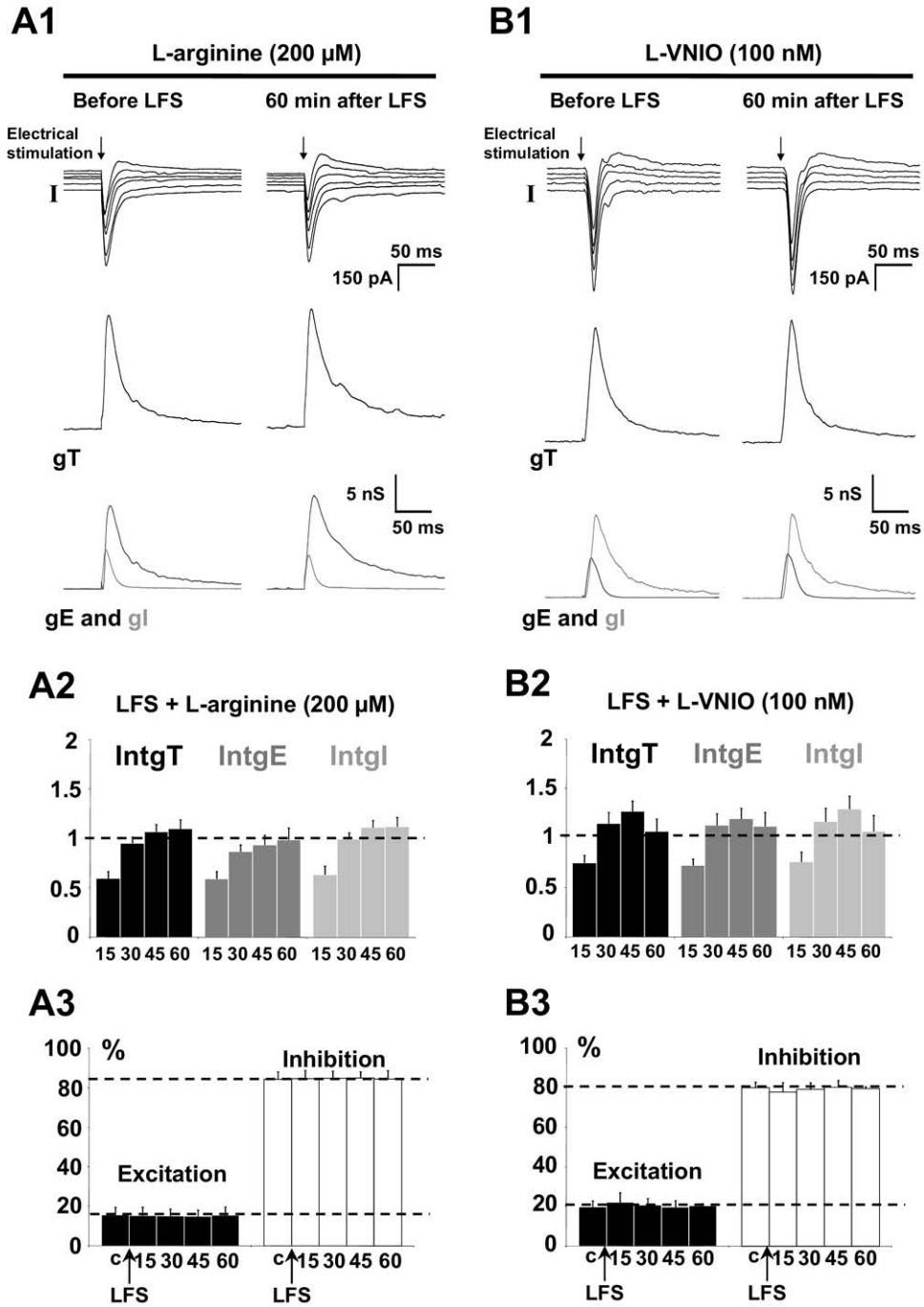


Fig. 4. Involvement of NO in the homeostatic depression of L5-PNs inputs. Representative recordings of L5-PNs after electrical stimulation applied in layer 4 in the presence of 200 μM L-arg (A) or 100 nM L-VNIO (B). The left column shows a representative recording before LFS application, in the presence of the drug at 0.05 Hz, and the right column 60 min after application of LFS in layer 4 with the same condition of stimulation as that in the drug recording. Upper traces: current responses of an L5-PN to electrical stimulation. Imposed Vm ranged from −60 to −80 mV. Medium traces: decomposition of the responses in total conductance change (gT). Lower traces: decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). (A2) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars), and intgI (light grey bars), after LFS in layer 4 (n=13) in the presence of 200 μM of L-arg. (A3) Relative contribution of E and I conductance changes to the total conductance change, after LFS in the presence of 200 μM of L-arg (c, control before LFS protocol). (B2, B3) Application of HFS protocol in the presence of 100 nM of L-VNIO (n=14). Legends are identical to those in A2, A3.

between intracellular Ca^{2+} changes and the synthesis of NO during LTD remains elusive, although a requirement for NO during the induction of cerebellar LTD has been reported elsewhere (Daniel et al., 1998).

A recent work proposes that inhibitory plasticity is crucial for the regulation of the E/I balance in the superior colliculus of hamster (Razak and Pallas, 2007) but mechanisms of this inhibitory plasticity are not well understood. Various effects of NO on GABAergic synapses have been reported: an increase of the release of GABA (Stern and Ludwig, 2001; Li et al., 2002), a reduction of the activity of GABA receptors, in the cerebral cortex (Robello et al., 1996) or in the cerebellum (Wall, 2003). This discrepancy could result from the strong heterogeneity of interneurons. Indeed, recent evidence showed that a retrograde NO signal can modulate by different mechanisms the release of GABA at the synapses of two types of interneurons, CCK or PV basket cells, in the hippocampus (Szabadits et al., 2007). It seems that NO needs the cooperation of endocannabinoïds to modulate GABA release from CCK basket terminals (Makara et al., 2007), whereas in PV-containing interneurons NO might be sufficient (Szabadits et al., 2007).

In our model, in which we looked for a global effect of NO on the network activity, we obtained an increase of inhibition in the presence of high concentrations of NO and a slight decrease of inhibition when NO was lacking. However, under our experimental paradigms, more than 80% of inhibition is disynaptic (Le Roux et al., 2008) and therefore, any modification of the strength of inhibitory inputs can be due to the previous modification of the strength of excitatory inputs. Since HFS or LFS protocols failed to induce LTP or LTD when NMDARs or nNOS were blocked, a direct effect of NO on GABAergic synapses seems unlikely in our experimental conditions. This is corroborated by different observations in which NMDARs are required to induce GABAergic plasticity in visual cortex (Komatsu and Iwakiri, 1993) or in hippocampus (Caillard et al., 1999). This suggests that a major part of the inhibitory plasticity could then arise from a previous excitatory plasticity and thus allow coordinated modification of the strength of E and I.

CONCLUSION

In summary, due to its roles in the induction of homeostatic plasticity processes and in the regulation of the E/I balance of L5-PNs, NO appears as an important regulator of cortical network activity. This regulation occurs through related changes of excitatory and inhibitory inputs, resulting from the recurrent organization of E and I circuits in the cortex to provide a stable level of the E/I balance.

Acknowledgments—The authors are indebted to Dr. S. O'Regan and Dr. E. Benoit for critical reading of the manuscript and Dr. G. Ouanounou for helpful discussions.

REFERENCES

Abbott LF, Chance FS (2005) Drivers and modulators from push-pull and balanced synaptic input. Prog Brain Res 149:147–155.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 357:593–615.

Anderson JS, Carandini M, Ferster D (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. J Neurophysiol 84:909–926.

Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD (1996) Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. Cell 87:1025–1035.

Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. Eur J Pharmacol 199:379–381.

Bon C, Bohme GA, Doble A, Stutzmann JM, Blanchard JC (1992) A role for nitric oxide in long-term potentiation. Eur J Neurosci 4:420–424.

Bon CL, Garthwaite J (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. J Neurosci 23:1941–1948.

Borg-Graham LJ, Monier C, Fregnac Y (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. Nature 393:369–373.

Brenman JE, Bredt DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. Curr Opin Neurobiol 7:374–378.

Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (1999) Mechanisms of induction and expression of long-term depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. J Neurosci 19:7568–7577.

Chung YH, Joo KM, Lee YJ, Shin DH, Cha CI (2004) Postnatal development and age-related changes in the distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the visual system of rats. Neurosci Lett 360:1–4.

Cudeiro J, Rivadulla C, Rodriguez R, Grieve KL, Martinez-Conde S, Acuna C (1997) Actions of compounds manipulating the nitric oxide system in the cat primary visual cortex. J Physiol 504 (Pt 2):467–478.

Daniel H, Levenes C, Crepel F (1998) Cellular mechanisms of cerebellar LTD. Trends Neurosci 21:401–407.

Davis GW, Bezprozvanny I (2001) Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. Annu Rev Physiol 63: 847–869.

Erdal EP, Litzinger EA, Seo J, Zhu Y, Ji H, Silverman RB (2005) Selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. Curr Top Med Chem 5:603–624.

Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. Annu Rev Physiol 57:683–706.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature 336:385–388.

Haghikia A, Mergia E, Friebe A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T (2007) Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. J Neurosci 27:818–823.

Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. J Neurosci 26:4535–4545.

Hawkins RD, Son H, Arancio O (1998) Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. Prog Brain Res 118:155–172.

Higley MJ, Contreras D (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. J Neurosci 26:448–457.

Hopper RA, Garthwaite J (2006) Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. J Neurosci 26:11513–11521.

Ignarro LJ (1990) Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. Hypertension 16:477–483.

Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. J Neurocytol 31:277–287.

Komatsu Y, Iwakiri M (1993) Long-term modification of inhibitory synaptic transmission in developing visual cortex. Neuroreport 4: 907–910.

Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF (1998) NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. Neuron 21:1151–1162.

Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. Cell 112:631–643.

Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. Eur J Neurosci 24:3507–3518.

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Baux G, Fossier P (2008) Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks. Eur J Neurosci 27:3244–3256.

Le Roux N, Amar M, Moreau A, Fossier P (2007) Involvement of NR2A- or NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurone inputs depends on the developmental stage. Eur J Neurosci 26:289–301.

Li DP, Chen SR, Pan HL (2002) Nitric oxide inhibits spinally projecting paraventricular neurons through potentiation of presynaptic GABA release. J Neurophysiol 88:2664–2674.

Li DP, Chen SR, Finnegan TF, Pan HL (2004) Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. J Physiol 554:100–110.

Lucas-Meunier E, Monier C, Amar M, Baux G, Frégnac Y, Fossier P (in press) Involvement of muscarinic and nicotinic receptors in the endogenous cholinergic modulation of the balance between excitation and inhibition in the young rat visual cortex. Cereb Cortex, in press.

Makara JK, Katona I, Nyiri G, Nemeth B, Ledent C, Watanabe M, de Vente J, Freund TF, Hajos N (2007) Involvement of nitric oxide in depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal pyramidal cells during activation of cholinergic receptors. J Neurosci 27:10211–10222.

Malen PL, Chapman PF (1997) Nitric oxide facilitates long-term potentiation, but not long-term depression. J Neurosci 17:2645–2651.

Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron 44:5–21.

Marino J, Schummers J, Lyon DC, Schwabe L, Beck O, Wiesing P, Obermayer K, Sur M (2005) Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. Nat Neurosci 8:194–201.

Monier C, Chavane F, Baudot P, Graham LJ, Fregnac Y (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. Neuron 37:663–680.

Monier C, Fournier J, Fregnac Y (2008) In vitro and in vivo measures of evoked excitatory and inhibitory conductance dynamics in sensory cortices. J Neurosci Methods 169:323–365.

Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. Neuron 9:967–975.

Murphy KP, Bliss TV (1999) Photolytically released nitric oxide produces a delayed but persistent suppression of LTP in area CA1 of the rat hippocampal slice. J Physiol 515 (Pt 2):453–462.

O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. Science 265:542–546.

Razak KA, Pallas SL (2007) Inhibitory plasticity facilitates recovery of stimulus velocity tuning in the superior colliculus after chronic NMDA receptor blockade. J Neurosci 27:7275–7283.

Robello M, Amico C, Bucossi G, Cupello A, Rapallino MV, Thellung S (1996) Nitric oxide and GABAA receptor function in the rat cerebral cortex and cerebellar granule cells. Neuroscience 74:99–105.

Shadlen MN, Newsome WT (1994) Noise, neural codes and cortical organization. Curr Opin Neurobiol 4:569–579.

Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. Nature 423:288–293.

Stern JE, Ludwig M (2001) NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280:R1815–R1822.

Szabadits E, Cserep C, Ludanyi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF, Nyiri G (2007) Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. J Neurosci 27:8101–8111.

Turrigiano G (2004) A competitive game of synaptic tag. Neuron 44:903–904.

Turrigiano GG (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. Trends Neurosci 22:221–227.

Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. Nat Rev Neurosci 5:97–107.

Wall MJ (2003) Endogenous nitric oxide modulates GABAergic transmission to granule cells in adult rat cerebellum. Eur J Neurosci 18:869–878.

Wehr M, Zador AM (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. Nature 426:442–446.

Yousef T, Neubacher U, Eysel UT, Volgushev M (2004) Nitric oxide synthase in rat visual cortex: an immunohistochemical study. Brain Res Brain Res Protoc 13:57–67.

(Accepted 5 July 2009)
(Available online 8 July 2009)

Résumé : Le traitement de l'information sensorielle par le cortex cérébral requiert l'activation harmonieuse de micro-circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs interconnectés, ciblant les neurones pyramidaux de couche 5. Ces derniers élaborent les signaux de sortie corticaux et reçoivent un ratio de 20% d'excitation (E) et 80% d'inhibition (I). La dérégulation de cette balance E-I ou du système sérotoninergique conduit à des neuropathologies telles la dépression et la schizophrénie mais les interrelations entre la sérotonine et la balance E-I sont inconnues. Nous avons montré que la 5-HT endogène module la balance E-I en fonction du type de récepteur 5-HT recruté (1A, 2A, 3, 4, 7) et de sa localisation spécifique dans la colonne corticale. Ces données électrophysiologiques constituent la première évidence pour une action modulatrice fine de la sérotonine corticale sur la balance E-I et révèle la ségrégation fonctionnelle des récepteurs 5-HT dans les réseaux de neurones sensoriels.

Mots Clés : sérotonine, récepteurs 5-HT, balance excitation inhibition, intégration synaptique, neurone pyramidal de couche 5, réseaux neuronaux, cortex visuel, électrophysiologie.

∴

Abstract: Neocortical layer 5 pyramidal neuron (L5PN) activity must be finely tuned in cortical columns to ensure the dynamic integration of sensory inputs and brain responsiveness. This is achieved through the coordinated and balanced activity of wired L5PN-targeting excitatory (E) and inhibitory (I) neurons, leading to a 20%-80% E-I balance set-point. Any deregulation of the E-I balance or of the serotoninergic system both lead to neuronal diseases including depression and schizophrenia, but how serotonin tunes the E-I balance is still unknown. In rat visual cortex, we show that endogenous 5-HT has differential modulatory effects on the E-I balance, both between 5-HT receptors subtypes (1A, 2A, 3, 4, 7) and in relation with their specific localization in the cortical column. We reveal for the first time that serotonin finely tunes the E-I balance while keeping L5PN responsiveness within a functional range. Our results shed new light on the functional segregation of 5-HTR subtypes in sensory circuits.

Key words: serotonin, 5-HT receptors, excitation inhibition balance, synaptic integration, layer 5 pyramidal neuron, neuronal networks, visual cortex, electrophysiology.

Adresse du laboratoire :
CNRS, Institut Alfred Fessard – FRC 2118,
Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR 9040,
1 avenue de la Terrasse, F-91198 Gif sur Yvette